



**HAL**  
open science

# Compréhension des mécanismes lors de la photocatalyse appliquée à la dégradation des microorganismes : application au traitement de l'air et aux textiles auto-décontaminants

Gaëlle Carre

## ► To cite this version:

Gaëlle Carre. Compréhension des mécanismes lors de la photocatalyse appliquée à la dégradation des microorganismes : application au traitement de l'air et aux textiles auto-décontaminants. Autre. Université de Strasbourg, 2013. Français. NNT : 2013STRAF026 . tel-00998196

**HAL Id: tel-00998196**

**<https://theses.hal.science/tel-00998196>**

Submitted on 30 May 2014

**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 STRASBOURG**



**EDSC**  
Ecole Doctorale des  
Sciences Chimiques

**ÉCOLE DOCTORALE DES SCIENCES CHIMIQUES**

**Institut de Chimie et Procédés pour l'Énergie, l'Environnement et la Santé,  
UMR7515, CNRS, STRASBOURG**

**THÈSE** présentée par :

**Gaëlle CARRE**

soutenue le : **30 août 2013**

pour obtenir le grade de : **Docteur de l'université de Strasbourg**

Discipline/Spécialité : chimie/chimie et microbiologie

**Compréhension des mécanismes lors de la  
photocatalyse appliquée à la dégradation  
des microorganismes.**

**Application au traitement de l'air et aux  
textiles auto-décontaminants.**

**THÈSE dirigée par :**

**M. KELLER Nicolas**

**M. ANDRE Philippe**

ICPEES, CNRS, Université de Strasbourg

Faculté de Pharmacie, CNRS, Université de Strasbourg

**RAPPORTEURS :**

**M. PULGARIN César**

**Mme BAUDA Pascale**

Ecole Polytechnique Fédérale de Lausanne

LIEBE, Université de Lorraine

**EXAMINATEURS :**

**Mme GEOFFROY Valérie**

**Mme GUILLARD Chantal**

**Mme GUILLOT-COMBE Emmanuelle**

**Mme KELLER Valérie**

Ecole Supérieure de Biotechnologie de Strasbourg

IRCELYON, CNRS, Université Claude Bernard

Direction Générale de l'Armement

ICPEES, CNRS, Université de Strasbourg

**MEMBRE INVITE :**

**Mme LETT Marie-Claire**

GMGM, CNRS, Université de Strasbourg

*« Nulle pierre ne peut être polie sans friction, nul homme ne peut parfaire son expérience sans épreuve », Confucius*

# Remerciements

*Cette thèse a été réalisée au Laboratoire de Biophotonique et de Pharmacologie sous la direction de M. Philippe ANDRE et à l'Institut de Chimie et des Procédés pour l'Environnement, l'Energie et la Santé, sous la direction de M. Nicolas KELLER.*

*Mes remerciements vont tout naturellement à M. Philippe ANDRE qui au cours de ces quatre années m'a beaucoup apporté. Toujours disponible, son expertise et son implication ont largement contribué au bon déroulement de ce projet. Il a su me transmettre notamment sa passion pour l'enseignement.*

*J'exprime toute ma reconnaissance à M. Nicolas KELLER pour ses conseils avisés, ses explications et son soutien dans la réalisation de ce travail.*

*Je remercie sincèrement Mme Marie-Claire LETT et Mme Valérie KELLER pour leur contribution et leur implication dans le cadre de ce projet.*

*Je remercie les rapporteurs Mme Pascale BAUDA et M. César PULGARIN, ainsi que les examinatrices Mme Valérie GEOFFROY, Mme Chantal GUILLARD, Mme Emmanuelle GUILLOT-COMBE et Mme Valérie KELLER d'avoir accepté de faire partie de ce jury de thèse et pour leur temps dédié à l'évaluation de mes travaux.*

*Mes remerciements vont également à la Direction Générale de l'Armement ainsi qu'à la Région Alsace pour le financement qu'ils m'ont accordé durant trois années.*

*Merci à M. Jean-Pierre GIES de m'avoir accueillie dans son laboratoire et merci également pour sa sympathie.*

*Je voudrais aussi remercier M. Christian D. MULLER et M. Jean PELUSO pour leur aide précieuse lors de la mise au point et de l'interprétation des analyses en cytométrie.*

*Merci également à M. Saïd ENNAHAR et M. Erwann HAMON pour leur contribution et leur disponibilité lors des analyses d'électrophorèse bi-dimensionnelle.*

*Je remercie Mme Janina SIEGERT pour la préparation des échantillons de textiles auto-décontaminants fonctionnalisés. Merci également pour tes explications et ta sympathie.*

*Merci à M. Thierry ROMERO pour les clichés de microscopie électronique à balayage.*

*Merci à Mme Nicole GLASSER pour son aide précieuse quant à l'analyse et l'interprétation des données statistiques.*

*Merci à Mme Séverine SIGRIST et M. William BIETIGER pour leur participation dans l'étude de la peroxydation lipidique. Vos conseils techniques furent bénéfiques dans la réalisation de cette étude.*

*Merci à Mme Valérie GOEPP et Mme Josiane MOREL-JEAN pour leur bonne humeur et leur aide dans la préparation de milieux, nettoyage et décontamination des milieux.*

*Merci également à M. Alain RACH pour la réalisation des dispositifs photocatalytiques et pour son efficacité.*

*J'exprime une profonde reconnaissance envers tous mes stagiaires, Anne, Dounia, Emmanuelle, Florian, Géraldine, Gwenaëlle, Laurent, Maryse, Maxime, Sophie. Merci pour vos travaux, votre investissement et votre sympathie; vous avez largement contribué à l'établissement de ce travail.*

*Enfin je n'oublierai pas mes collègues de travail, Aziz, Anaïs, Anne, Angela, David, Florent, François, Marlène, Natalie, Nathanaëlle, Nazha, Nizar, Olivier, Pierre-Alexandre, Quentin, Romain, Shabnam, Thomas, Yas...*

*Mes sincères remerciements sont également adressés à mes amis et à ma famille pour leur soutien indéfectible.*

*Enfin un grand merci à mon cher et tendre, pour son soutien quotidien et en particulier dans cette tâche.*

*Nombreuses sont les personnes que j'ai rencontrées durant ces quatre ans, ce fut un réel enrichissement personnel tant sur le plan professionnel que sur le plan amical.*

*En définitive, merci à toutes les personnes qui ont contribué à la réalisation de ce travail, de près ou de loin.*

# Liste des abréviations

2D : Bidimensionnel

AFNOR : Association Française de Normalisation

ANSM : Agence Nationale de Sécurité du Médicament et des produits de santé

ATCC : American Type Culture Collection

BLSE : Bactéries à Gram négatif productrice de béta-lactamase

BPF : Bonnes Pratiques de Fabrication

BVNC : Bactéries Viables Non Cultivables

CHU : Centre Hospitalier Universitaire

CIP : Collection de l'Institut Pasteur

CLIN : Centre de Coordination de la Lutte contre les Infections Nosocomiales

COV : Composé Organique Volatil

DO<sub>620</sub> : Densité Optique à 620 nm

Eau  $\phi$  : Eau physiologique

HEPA : High Efficiency Particulate Air

IRH : Institut de Recherche Hydrologique

LB : Luria Bertani

LPS : Lipopolysaccharide

MEB : Microscopie Electronique à Balayage

MH : Mueller Hinton

OMS : Organisation Mondiale de la Santé

PEI : Polyéthylèneimine

PIE : Point isoélectrique

PMT : Photomultiplicateur

PSS : Polystyrène sulfonate

PZC : Point de charge nulle

SARM : *Staphylococcus aureus* résistant à la méticilline

SDP : Sous Produits de Désinfection

SRAS : Syndrome Respiratoire Aigu Sévère

TiO<sub>2</sub> : Dioxyde de Titane

TS : Trypticase Soja

U : Unité Enzymatique

U.A. : Unité Arbitraire

UFC : Unité Formant Colonie

UFP : Unité Formatrice de Plage

UV: rayonnement Ultra-Violet

VRE : Entérocoque Résistant à la Vancomycine

ZAC : Zone à Atmosphère Contrôlée

# Table des matières

<b>Introduction générale.....</b>	<b>1</b>
<b>Chapitre 1 : Revue générale.....</b>	<b>5</b>
<b>I. Contamination biologique multi-environnementale.....</b>	<b>6</b>
1. Préambule sur le monde bactérien .....	7
2. Contamination biologique de l'eau .....	8
3. Contamination biologique à l'interface eau/surface : les biofilms.....	10
4. Contamination biologique des surfaces .....	13
5. Contamination biologique de l'air : les bioaérosols.....	16
<b>II. Les systèmes de désinfection, décontamination, dépollution .....</b>	<b>20</b>
1. Systèmes de désinfection de l'eau.....	20
2. Systèmes de décontamination de l'air .....	21
3. La désinfection des surfaces .....	23
<b>III. La photocatalyse hétérogène : un Procédé d'Oxydation Avancée .....</b>	<b>25</b>
1. Principe de la photocatalyse hétérogène.....	25
2. Les matériaux photocatalytiques.....	27
3. Désinfection/décontamination par photocatalyse .....	33
<b>IV. Aspects mécanistiques de la photocatalyse appliquée à la     dégradation des microorganismes .....</b>	<b>52</b>
1. Effet des rayonnements UV-A sur les microorganismes.....	52
2. Importance du contact entre le TiO <sub>2</sub> et les bactéries .....	53
3. Rôle des ROS sur le mécanisme de destruction bactérien.....	54
4. Principaux composants cellulaires modifiés lors de la photocatalyse.....	55
5. Mécanismes enzymatiques de détoxification des réactifs oxygénés.....	59
6. Influence de la nature du microorganisme : bactéries, spores et champignons .....	62
<b>V. Etude de la toxicité du TiO<sub>2</sub> (sous forme de nanoparticules).....</b>	<b>64</b>
<b>Chapitre 2 : Partie Expérimentale.....</b>	<b>66</b>
<b>I. Photocatalyseur de choix : le TiO<sub>2</sub> P25 Evonik (Degussa) .....</b>	<b>67</b>
<b>II. Dispositifs expérimentaux de test .....</b>	<b>69</b>
1. Système d'irradiation UV-A .....	69
2. Chambre solaire .....	72
3. Réacteurs, surfaces et milieux photocatalytiques.....	74
<b>III. Présentation des bactéries sélectionnées pour notre étude multi-     environnementale .....</b>	<b>75</b>
<b>IV. Préparation d'une suspension bactérienne .....</b>	<b>76</b>
<b>V. Analyse statistique.....</b>	<b>77</b>

<b>Chapitre 3 : Evaluation de l'action antimicrobienne de la photocatalyse sur surface et en milieu liquide .....</b>	<b>78</b>
<b>I. Etude sur surface.....</b>	<b>79</b>
1. Screening de l'effet de différents traitements sur le développement d'une vingtaine de microorganismes avec TiO <sub>2</sub> en milieu nutritif .....	79
2. Etude de la réduction bactérienne avec dépôts de TiO <sub>2</sub> sur verre.....	96
3. Influence et représentativité du mode d'évaluation sur surface.....	106
<b>II. Etude en milieu liquide .....</b>	<b>116</b>
1. Réacteurs photocatalytiques, préparation des tests et modes opératoires .....	117
2. Détermination de l'intégrité membranaire en milieu liquide par cytométrie capillaire .....	121
3. Détermination de la viabilité cellulaire en milieu liquide par dénombrements sur milieux gélosés nutritifs.....	155
4. Comparaison des deux méthodes de détermination de la viabilité cellulaire .....	159
<b>Chapitre 4 : Etude des mécanismes d'oxydation ainsi que leur effet sur les différents composants cellulaires après traitements photocatalytiques .....</b>	<b>165</b>
<b>I. Mise en évidence des radicaux anions superoxydes par Chimiluminescence. Implication dans l'effet antibactérien du TiO<sub>2</sub>...</b>	<b>166</b>
1. Principe de la chimiluminescence .....	167
2. Principe de l'ajout de molécules scavengers .....	169
3. Influence de la durée de vie des ROS photogénérées et prise en considération des limites du système .....	170
4. Préparation du milieu réactionnel et modes opératoires pour le suivi de CL lors des tests.....	171
5. Suivi de CL en absence de microorganisme .....	174
6. Suivi de CL en présence de microorganismes et de SOD et d'O <sub>2</sub> <sup>•-</sup> dans l'effet antibactérien de la photocatalyse sur TiO <sub>2</sub> .....	180
<b>II. Détermination de l'action des ROS sur les lipides.....</b>	<b>185</b>
1. La peroxydation lipidique : généralités .....	185
2. Préparation des tests et modes opératoires .....	186
3. Implication du radical anion superoxyde O <sub>2</sub> <sup>•-</sup> (via l'ajout de SOD) dans les phénomènes de peroxydation lipidique .....	189
4. Peroxydation lipidique et viabilité cellulaire déterminée par cytométrie capillaire et dénombrement sur milieux gélosés .....	192
<b>III. Etude des modifications protéiques par analyse d'électrophorèse bi-dimensionnelle couplée à de la spectrométrie de masse .....</b>	<b>194</b>
1. Préparation des tests et modes opératoires .....	195
2. Résultats.....	199

<b>IV. Confrontation des différentes analyses réalisées (suivi de CL, peroxydation lipidique, modification protéomique, perte de l'intégrité membranaire et mise en évidence de l'effet bactéricide) chez <i>E.coli</i> .....</b>	<b>210</b>
-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------	------------

<b>Chapitre 5 : Mise en œuvre du TiO<sub>2</sub> dans des applications photocatalytiques.....</b>	<b>216</b>
---------------------------------------------------------------------------------------------------	------------

<b>I. Dispositif de traitement de l'air équipé de diodes électroluminescentes (DELs).....</b>	<b>217</b>
-----------------------------------------------------------------------------------------------	------------

1. Description des modules photocatalytiques.....	218
2. Protocole de test sur phages T2 de <i>E.coli</i> .....	222
3. Résultats.....	223

<b>II. Développement de textiles fonctionnalisés photocatalytiques à activité auto-désinfectante sous lumière solaire.....</b>	<b>227</b>
--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------	------------

1. Fonctionnalisation Layer-by-Layer et techniques de caractérisation des textiles.....	228
2. Protocoles des tests.....	232
3. Résultats.....	237
4. Conclusion .....	248

<b>Conclusions et perspectives.....</b>	<b>251</b>
-----------------------------------------	------------

# **Introduction générale**

Les travaux développés dans cette thèse ont pour objectif principal de participer à la compréhension des mécanismes impliqués lors de la dégradation des microorganismes par photocatalyse, et notamment d'étudier l'influence du mode d'évaluation et des protocoles de test sur la détermination des propriétés antimicrobiennes obtenues par photocatalyse sur TiO<sub>2</sub>.

L'utilisation d'agents biologiques comme armes de guerre remonte à l'Antiquité. La contamination intentionnelle des aliments et de l'eau avec des carcasses d'animaux, ou *via* l'utilisation de bioaérosols avaient pour but de rendre malade les adversaires. Bien que la production d'armes biologiques soit dénoncée par la Convention sur l'interdiction des armes biologiques (1972) et que leur utilisation soit interdite par le protocole de Genève (1925), il n'est pas à exclure d'éventuelles attaques bioterroristes générant de multiples effets dévastateurs sur la population (économique, culturel ou médical). Cette crainte a été fortement ravivée en 2001, lors d'attaques bioterroristes avec les enveloppes piégées à l'anthrax. Les voies d'attaques potentielles sont diverses comme par exemple : l'aérosolisation des microorganismes pathogènes, la contamination des eaux, des aliments, les phénomènes de contamination croisée... Ainsi, dans l'objectif d'une meilleure préparation et d'une meilleure réponse à ces attaques, des stratégies doivent être élaborées et développées.

En parallèle, l'émergence des bactéries multi-résistantes (BMR) aux antibiotiques en milieu hospitalier constitue un réel problème de santé publique. L'utilisation intensive et continue des antibiotiques participe à cette pression de sélection des gènes de résistance. Les principaux pathogènes, *Staphylococcus aureus* résistant à la méticilline (SARM), *Pseudomonas aeruginosa*, *Acinetobacter baumannii* et les entérobactéries (*Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*...) sont bien trop souvent incriminés dans les infections nosocomiales. En milieu hospitalier, les règles d'hygiène et de désinfection sont strictes avec des procédures établies. Cependant, dans certains services (grands brûlés, réanimation...), la prévalence des infections nosocomiales reste trop élevée. Afin d'éradiquer ces microorganismes, de nouvelles méthodes de décontamination doivent être envisagées et la photocatalyse hétérogène constitue une alternative prometteuse qui a déjà fait l'objet de nombreux travaux.

La photocatalyse hétérogène fait partie des procédés d'oxydation avancée et peut être appliquée aussi bien à la désinfection de l'eau et de l'air qu'à la mise au point de surfaces, matériaux auto-nettoyants et auto-décontaminants. Relativement non sélective, la photocatalyse est également utilisée pour l'élimination et/ou la dégradation des polluants chimiques (pesticides, colorants, composés organiques volatils (COV)...). Ce procédé de désinfection/dépollution est présenté comme une technologie prometteuse avec un spectre d'applications potentielles ou déjà existantes, très large, et qui bénéficie notamment d'une mise en œuvre douce (à température ambiante et pression atmosphérique), propre et verte (source d'énergie peu ou pas polluante, absence de produits chimiques oxydants et de rejets polluants), peu coûteuse et aisée.

Dans le cadre de cette thèse cofinancée par la Direction Générale de l'Armement (DGA) et la Région Alsace, l'étude de la désinfection par photocatalyse hétérogène a été préférentiellement menée sur des microorganismes pouvant être impliqués lors d'attaques

bioterroristes ainsi que sur des microorganismes fréquemment retrouvés en milieu hospitalier. Ainsi, nous avons sélectionné des microorganismes de classe 2 qui vont simuler les microorganismes de classe 3, à savoir *Bacillus subtilis* (mimant *Bacillus anthracis*), *Yersinia enterocolitica* serotype 1a (*Yersinia pestis*), *Salmonella* Abony (*Salmonella* Typhi ou Paratyphi) ...

Cette étude a également été menée sur d'autres microorganismes que l'on retrouve dans différents milieux ou environnements, aussi bien dans l'eau ou dans l'air que sur les surfaces (*E.coli*, *P.aeruginosa*, *S.aureus*...).

Afin de mieux comprendre les mécanismes sous-jacents au processus de désinfection par photocatalyse et l'importance du mode d'évaluation de l'efficacité antimicrobienne, deux axes de recherches majeurs ont été développés dans cette étude multi-environnementale et multi-paramétrique :

**(A) l'étude de l'effet antimicrobien photocatalytique en fonction des différents modes d'évaluation** et des **protocoles de test**. TiO<sub>2</sub> sera notamment mis en œuvre sur surface (en milieu nutritif « riche » et en surface « sèche »), mais également mis en suspension en milieu liquide. L'influence du mode de test mais aussi la technique de comptage sera étudiée.

**(B) une approche fondamentale de compréhension des mécanismes d'oxydation photocatalytique** en ciblant plus particulièrement l'implication des radicaux anions superoxydes O<sub>2</sub><sup>-</sup> dans les phénomènes de peroxydation lipidique ainsi que leur implication dans l'effet antibactérien. Dans cet axe de recherche, une analyse protéomique réalisée par électrophorèse bi-dimensionnelle couplée à la spectrométrie de masse sera également menée afin de proposer différentes cibles d'action potentielles de la photocatalyse sur les protéines.

Enfin, à **visée applicative**, la mise en œuvre de TiO<sub>2</sub> et de la photocatalyse dans deux applications très différentes a été réalisée, avec le développement d'un dispositif photocatalytique de décontamination de l'air équipé de diodes électroluminescentes et le développement de textiles fonctionnalisés à activité auto-désinfectante sous lumière solaire.

Ce manuscrit est divisé en cinq grands chapitres :

**Une revue bibliographique** constituera le **premier chapitre** de cet ouvrage. Tout d'abord, les microorganismes responsables de la contamination de l'eau, de l'air ou des surfaces seront présentés. L'accent sera préférentiellement mis sur les agents pouvant être utilisés lors d'attaques biologiques ainsi que sur les bactéries fréquemment retrouvées en milieu hospitalier. Les maladies associées à ces agents pathogènes et les moyens d'inactivation actuels pour la potabilisation de l'eau, la purification de l'air et la décontamination des surfaces seront également décrits.

Cependant, pour des enjeux sociétaux et économiques, de nouvelles technologies d'inactivation doivent être mises en œuvre. Parmi les technologies d'oxydation avancée, la photocatalyse, de par ses multiples champs d'application et la formation d'espèces réactives de l'oxygène au pouvoir d'oxydation élevé se présente comme une méthode alternative aux procédés usuels de décontamination/dépollution que ce soit d'ordre biologique ou chimique. Ainsi, le principe de la photocatalyse sera exposé dans cette partie bibliographique. S'ensuivra une présentation du photocatalyseur : le dioxyde de titane (TiO<sub>2</sub>), qui activé sous

rayonnement UV-A, visible ou solaire peut dégrader une large panoplie de microorganismes (virus, bactéries...). Les différents paramètres réactionnels seront présentés et des études relatives à l'utilisation de la photocatalyse pour la désinfection seront également exposées. Les mécanismes proposés à ce jour pour la dégradation des microorganismes par voie photocatalytique seront finalement exposés.

Le **deuxième chapitre** sera consacré au **matériel et aux méthodes**. Les principales techniques communes aux chapitres 3 et 4 de cette thèse seront décrites, tandis que les techniques et protocoles spécifiques à certaines parties de l'étude seront détaillés dans les chapitres correspondants. Les caractéristiques principales du photocatalyseur de référence utilisé (TiO<sub>2</sub> P25 Degussa Evonik) seront tout d'abord présentées, ainsi que les dispositifs expérimentaux de test et la technique de préparation des suspensions bactériennes.

Le **troisième chapitre** s'attachera à la **détermination de l'effet antimicrobien photocatalytique selon des modes d'évaluation et des protocoles de test très différents**, avec la mise en œuvre de TiO<sub>2</sub> sur surface (en milieu nutritif « riche » ou en surface « sèche ») ou en milieu liquide, et l'utilisation de techniques de comptage différentes. Ainsi pour cet axe, les résultats du screening de cet effet sur un panel d'une vingtaine d'espèces microbiennes lorsque TiO<sub>2</sub> est mélangé à une substance nutritive, seront tout d'abord exposés. Sur la base d'observations visuelles, nous définirons différents groupes de réponses aux différents traitements appliqués (effet du rayonnement, effet cytotoxique du TiO<sub>2</sub> et effet photocatalytique). Conjointement à cette étude sur surface nutritive, l'efficacité antimicrobienne photocatalytique sera évaluée dans le cas où TiO<sub>2</sub> est déposé sur surface « sèche » (le verre), mode d'évaluation représentatif de conditions et de revêtements de TiO<sub>2</sub> en milieu pauvre en nutriment (ou « secs »). Une classification des microorganismes selon leur réponse aux différents traitements sera également exposée. Ces études ont pour but de montrer l'influence des modes de test sur les résultats obtenus et leur interprétation.

En parallèle de ces études sur surfaces, nous déterminerons l'effet antibactérien de la photocatalyse en milieu liquide par une analyse de l'intégrité membranaire à l'aide de la cytométrie capillaire. Nous nous intéresserons également aux interactions possibles entre bactéries-TiO<sub>2</sub>. Enfin nous comparerons les résultats d'analyse de l'intégrité membranaire à la technique de dénombrement sur milieux gélosés. Ces études menées dans le cas où TiO<sub>2</sub> est mis en suspension avec les bactéries ont notamment pour but de montrer l'importance du choix de la technique et du mode de comptage dans l'interprétation des résultats obtenus.

Le **quatrième chapitre** est dédié à la **compréhension des mécanismes d'oxydation photocatalytique ainsi que leurs effets sur les différents composants cellulaires**. Ainsi une première étude aura pour but d'évaluer le rôle du radical anion superoxyde O<sub>2</sub><sup>•-</sup> (une des principales espèces réactives de l'oxygène générée lors de l'action photocatalytique), dans l'effet antibactérien de TiO<sub>2</sub> après avoir sélectionné une molécule scavenger efficace pour le piégeage de ces radicaux (détermination de l'efficacité de ces molécules scavengers à l'aide de la technique de chimiluminescence). Nous avons également cherché à savoir quel était le rôle d'O<sub>2</sub><sup>•-</sup> dans les phénomènes de peroxydation lipidique. Cette étude sera réalisée à l'aide de la technique de quantification du malondialdéhyde et de la molécule scavenger spécifique

d' $O_2^{\circ-}$  choisie. Pour terminer cette étude fondamentale, nous réaliserons une analyse protéomique par électrophorèse bi-dimensionnelle couplée à la spectrométrie de masse afin de proposer plusieurs cibles d'action potentielles de  $TiO_2$  sur les protéines. Ces résultats seront confrontés à ceux obtenus lors de la détermination de l'effet antibactérien en milieu liquide.

Le **cinquième chapitre** est à visée très applicative et est consacré à la mise en œuvre de  $TiO_2$  et de la photocatalyse dans deux **applications** très différentes mais qui constituent des applications prometteuses de la photocatalyse. Dans le cadre du traitement de l'air, un dispositif de désinfection de l'air intérieur équipé de diodes électroluminescentes et de mousses à base de carbure de silicium sur lequel est déposé  $TiO_2$  sera présenté, dont l'efficacité de désinfection sera appréciée envers l'inactivation des phages T2 d'*E.coli*.

Enfin dans le cadre du développement de matériaux ou produits auto-désinfectants, de nouveaux textiles photocatalytiques fonctionnalisés ont été élaborés par la technique Layer-by-Layer et leurs propriétés auto-désinfectantes ont été évaluées sous lumière solaire.

Enfin nous **conclurons** en reprenant les points majeurs de ce travail. Un certain nombre de perspectives qu'ouvre ce travail seront présentées.

# **Chapitre 1 : Revue générale**

Le premier chapitre de ce manuscrit de thèse est une étude bibliographique relative au contexte et à la problématique de l'étude réalisée, et aux différentes notions abordées. Il est donc subdivisé en cinq sous-chapitres, de taille et d'importance inégales. Le premier aborde les aspects relatifs **aux contaminations et aux pollutions d'ordre biologique que ce soit pour la pollution de l'eau, de l'air ou la contamination des surfaces**. La complexité et la diversité des microorganismes impliqués dans la contamination de ces différents environnements seront exposées.

Dans le cadre de cette thèse cofinancée par la Région Alsace et la DGA (Direction Générale de l'Armement), deux grands domaines seront préférentiellement abordés : la contamination en milieu médical et l'implication potentielle des microorganismes comme arme biologique de destruction massive.

Dans un deuxième sous-chapitre, nous nous intéresserons ensuite aux différentes techniques de **désinfection/décontamination/dépollution** utilisées afin d'éliminer ces pathogènes pour la potabilisation de l'eau, la dépollution de l'air ou la désinfection des surfaces. Le développement de résistance suite à l'utilisation continue de ces procédés ainsi que la génération de sous produits de désinfection aux propriétés nocives concourent au besoin de développer de nouvelles techniques de désinfection plus respectueuses de l'environnement et moins onéreuses.

Le troisième sous-chapitre est consacré à la présentation de la **photocatalyse hétérogène** comme procédé d'oxydation avancée (AOP). Après une description de son principe et des principaux paramètres physiques influants, l'accent sera mis sur les principaux travaux réalisés en **désinfection/potabilisation de l'eau**, en **désinfection de l'air** et en **décontamination des surfaces**, avec le cas particulier des textiles fonctionnalisés.

Nous terminerons cette étude bibliographique par un quatrième sous-chapitre consacré aux aspects mécanistiques de la photocatalyse appliquée aux microorganismes et donc à la **compréhension de l'action photocatalytique du TiO<sub>2</sub> sur les bactéries**. Sont abordés l'effet du rayonnement UV, l'importance du contact bactéries-TiO<sub>2</sub>, le rôle des espèces réactives de l'oxygène (ROS), les principaux composants cellulaires modifiés lors de la photocatalyse, ainsi que les mécanismes de détoxification des ROS et l'influence de la nature du microorganisme. C'est par la compréhension des mécanismes sous-jacents lors de la photocatalyse appliquée aux microorganismes que nous pourrons optimiser le développement de systèmes de décontamination (dispositifs de traitement, surfaces actives) et limiter les phénomènes de résistance.

Enfin, quelques données liées à la **toxicité des nanoparticules de TiO<sub>2</sub>** sont rassemblées dans un court cinquième sous-chapitre.

## I. Contamination biologique multi-environnementale

Les sources de pollution, de contamination environnementale sont multiples. Les effets sur l'environnement et sur la santé humaine (maladies respiratoires, gastro-entérites, risques de cancers...) de ces pollutions, qu'elles soient de natures chimiques (pesticides, composés organiques volatils (COV), métaux lourds...) ou biologiques (bactéries, moisissures, levures, parasites, virus) sont préoccupants (figure 1).

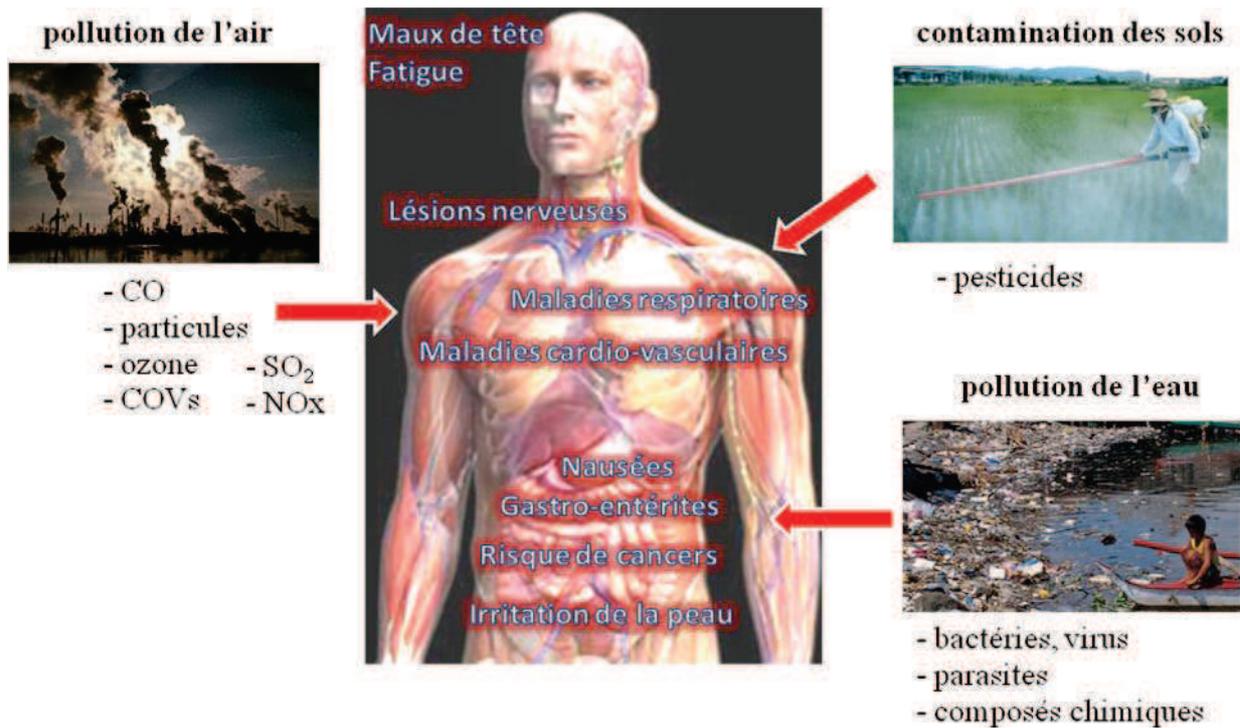


Figure 1 Types de pollution et de contamination et leurs effets sur la santé humaine, adapté de <sup>1</sup>

Dans le cadre de ce travail, nous nous sommes principalement focalisés sur les **contaminations d'origine bactérienne** et dans une moindre proportion sur quelques autres agents biologiques non bactériens comme les virus, les levures et les moisissures.

<sup>1</sup> [http://depssa.ignou.ac.in/wiki/images/0/0b/Effects\\_of\\_Pollution.pdf](http://depssa.ignou.ac.in/wiki/images/0/0b/Effects_of_Pollution.pdf) consulté le 3 septembre 2012.

## 1. Préambule sur le monde bactérien

### 1.1. Définition

Les bactéries sont des microorganismes **procaryotes**. Les procaryotes sont des organismes unicellulaires dépourvus de noyau. Il existe des milliers d'espèces bactériennes qui peuvent être classées en différents taxons. Cette taxonomie est établie à l'aide de caractéristiques morphologiques, biochimiques, physiologiques et/ou génomiques.<sup>2</sup>

### 1.2. Bactéries à Gram positif *versus* bactéries à Gram négatif

Historiquement, on distingue les bactéries à Gram négatif des bactéries à Gram positif. Cette classification a été élaborée en raison de différences de composition de la paroi bactérienne comme présenté dans la figure 2.

Les **bactéries à Gram négatif** sont composées, de l'extérieur vers l'intérieur, d'une membrane externe (épaisseur d'environ 8 nm) séparée de la membrane cytoplasmique (épaisseur d'environ 10 nm) par une fine couche de peptidoglycane (épaisseur d'environ 3 nm) (figure 2 (a)).

Le **peptidoglycane** est un polymère formé de sous-unités répétées d'acide N-acétylmuramique et de N-acétylglucosamine et d'un certain nombre d'acides aminés. Il constitue un réseau maillé tridimensionnel rigide mais poreux et extensible.

La **membrane cytoplasmique** permet d'isoler le compartiment intracellulaire du milieu extracellulaire. Elle est composée d'une double couche phospholipidique dans laquelle sont enchâssées des protéines et des glycoprotéines.

La **membrane externe** des bactéries à Gram négatif est composée principalement de :

- **phospholipides** (phosphatidyl éthanolamine, phosphatidyl glycérol, diphosphatidyl glycérol...) organisés en une bicouche phospholipidique, dans laquelle sont insérées des protéines, dont certaines forment des canaux traversant le feuillet de phospholipides, appelées porines ; les **porines** permettent le passage de petites molécules hydrophiles ainsi que des antibiotiques.
- **lipopolysaccharides** (LPS) ou endotoxine composé du lipide A, du polysaccharide central et d'un saccharide terminal appelé antigène O.

En revanche, chez les **bactéries à Gram positif**, il n'y a pas de membrane externe et la couche de peptidoglycane est beaucoup plus épaisse (épaisseur de 20 nm à 80 nm). Dans cette couche de peptidoglycane sont insérées des molécules d'acides teichoïques ou lipoteichoïques. Comme les bactéries à Gram négatif, les bactéries à Gram positif possèdent une membrane cytoplasmique (figure 2 (b)).

---

<sup>2</sup> Brenner DJ, Staley JT, Krieg N: **Bergey's Manual of Systematic Bacteriology**, vol. 1; 2001.

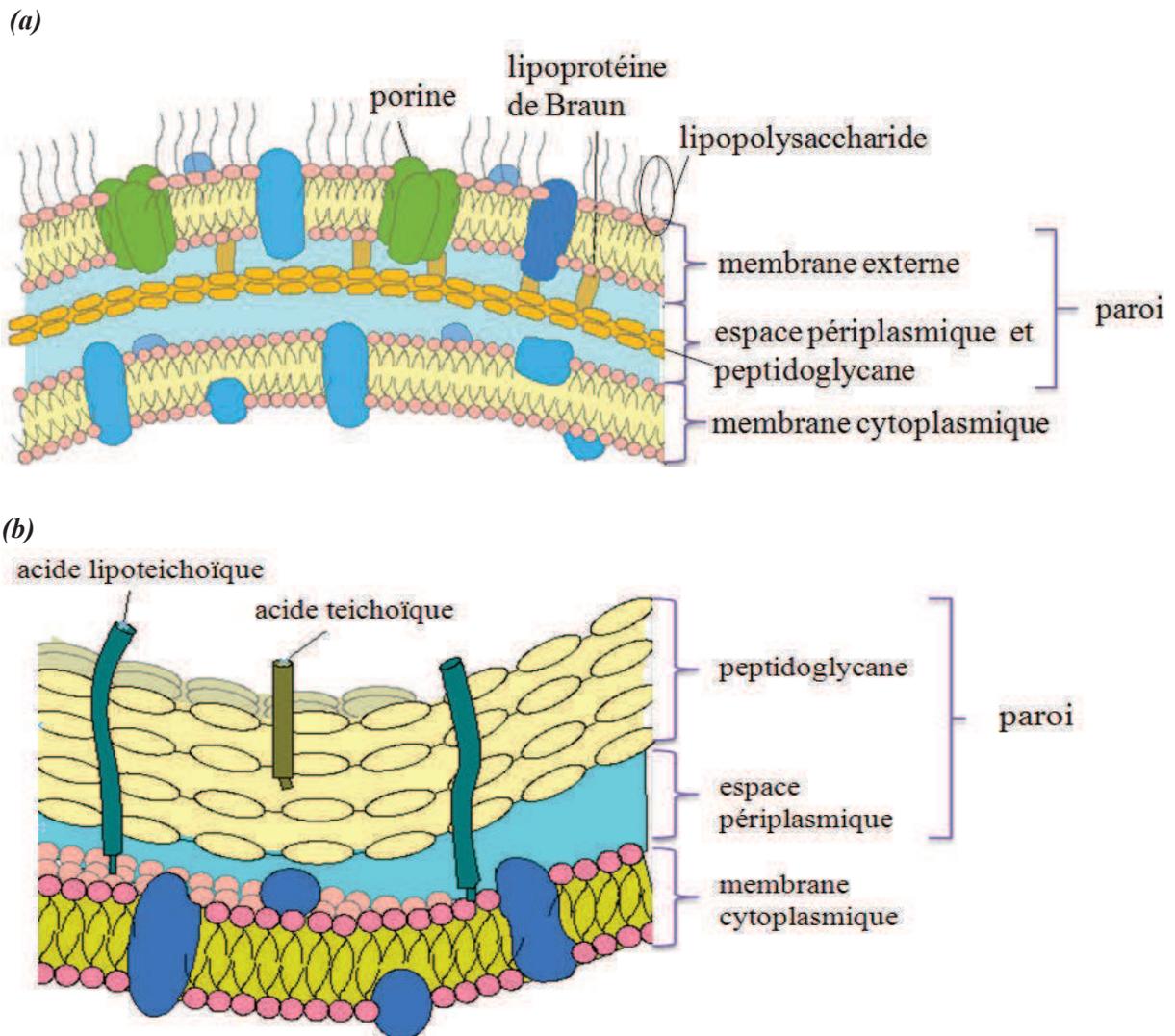


Figure 2 Composition de la paroi chez les bactéries à Gram négatif (a) et à Gram positif (b), adapté de <sup>3</sup>

## 2. Contamination biologique de l'eau

Dans ce chapitre, il sera d'abord question de la contamination des eaux de consommation qui reste à l'heure actuelle un réel enjeu de santé publique. Dans un second temps, nous mentionnerons également quelques études sur la contamination des eaux de baignade et de détente.

### 2.1. L'eau de boisson

En 2012, il est estimé que plus d'un milliard de personnes n'ont pas accès à l'eau potable.<sup>4</sup> Certaines régions de la planète sont plus touchées que d'autres : c'est par exemple le cas du

<sup>3</sup> [http://faculty.ksu.edu.sa/shoeib/Pictures%20Library/w/GramPositiveEnvelope\\_gif.jpg](http://faculty.ksu.edu.sa/shoeib/Pictures%20Library/w/GramPositiveEnvelope_gif.jpg) consulté le 10 janvier 2013

<sup>4</sup> Ede S, Hafner L, Dunlop P, Byrne J, Will G: **Photocatalytic Disinfection of Bacterial Pollutants Using Suspended and Immobilized TiO<sub>2</sub> Powders.** *Photochemistry and photobiology* 2012, **88**(3):728-735.

Moyen-Orient, de l'Afrique Sub-Saharienne, de l'Asie...<sup>5</sup> Cependant les maladies d'origine hydriques ne sont pas limitées aux pays en voie de développement. Les eaux naturelles peuvent véhiculer multitudes de microorganismes dont certains peuvent être pathogènes. Ces germes peuvent être impliqués dans diverses infections sans gravité telles que les gastro-entérites, mais parfois il peut s'agir d'infections graves voire fatales comme le choléra, les fièvres typhoïdes, paratyphoïdes...

Selon l'OMS en 2008, 88% des cas de diarrhées dans le monde sont attribuées à une eau insalubre ou à des défauts d'hygiène, entraînant la mort de plus de 1,5 millions de personnes par an la plupart étant des enfants.<sup>6</sup>

Le tableau 1 présente les principales bactéries pathogènes véhiculées par l'eau ainsi que les maladies associées à ces pathogènes.<sup>7</sup>

**Tableau 1 Principales bactéries pathogènes véhiculées par l'eau**

<b>Organismes</b>	<b>Maladies</b>
<b><i>Enterobacteriaceae</i></b>	
<i>Salmonella</i> Typhi et <i>Salmonella</i> Paratyphi	Fièvres typhoïdes et paratyphoïdes
<i>Shigella dysenteriae</i>	Dysenterie bacillaire
<i>Escherichia coli</i> entéropathogène	Gastro-entérites et diarrhées
<i>Yersinia enterocolitica</i>	Gastro-entérites et diarrhées
<b><i>Vibrionaceae</i></b>	
<i>Vibrio cholerae</i>	Choléra
<i>Vibrio parahaemolyticus</i>	Gastro-entérites, septicémies
<i>Vibrio vulnificus</i>	Infections fulminantes systémiques
<b><i>Aeromonadaceae</i></b>	
<i>Aeromonas hydrophila</i>	Gastro-entérites et diarrhées
<b>Autres espèces bactériennes</b>	
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Surinfections
<i>Campylobacter jejuni</i>	Campylobactériose, gastro-entérites, syndrome de Guillain-Barré
<i>Legionella pneumophila</i>	Légionellose
<i>Enterococcus faecalis</i>	Infections
<i>Mycobacterium xenopi</i>	Infections broncho-pulmonaires

Des directives de qualité pour l'eau de boisson ont été rédigées par l'OMS, afin d'informer et de protéger la santé publique. Ces directives ont pour but d'assurer la salubrité des approvisionnements en eau de boisson.<sup>8</sup> Cependant, de nombreux pays ont peu de ressources et bien souvent l'accès à ces informations reste limité. L'accès à l'eau potable reste toujours un réel problème de santé publique à l'échelle mondiale.

<sup>5</sup> McCullagh C, Robertson JMC, Bahnemann DW, Robertson PKJ: **The application of TiO<sub>2</sub> photocatalysis for disinfection of water contaminated with pathogenic micro-organisms: a review.** *Res Chem Intermed* 2007, **33**(3-5):359-375.

<sup>6</sup> Prüss-Ustün A, Bos R, Gore F, Bartram J: **Safer water, better health: costs, benefits and sustainability of interventions to protect and promote health.** In: Edited by Organization WH; 2008.

<sup>7</sup> Moles J: **Eaux de distribution, désinfection.** In: *Les techniques de l'ingénieur.* vol. W 5500; 2007.

<sup>8</sup> Organisation Mondiale de la Santé Directives de qualité pour l'eau de boisson. Troisième édition, 2004, vol.1.

## 2.2. Les eaux de baignades et de détente

Outre les problèmes d'accès à l'eau potable qui sont des préoccupations majeures sur la planète, nous pouvons nous intéresser à la contamination de certains environnements aquatiques publics comme les plans d'eau, les piscines naturelles ou les spas.

Les plans d'eau artificiels, en constante augmentation notamment dans les pays méditerranéens, peuvent être contaminés par des coliformes fécaux, *E.coli*, des entérocoques et *P.aeruginosa*. Lors d'une étude menée en 2012, trois piscines naturelles sur les quatre testées présentaient une contamination en *E.coli* et en entérocoques supérieure aux recommandations européennes.<sup>9,10,11</sup>

Une étude réalisée au Québec en 2008 a par ailleurs mis en évidence une contamination de 26% des spas testés avec une prévalence de *Legionella* spp. à 23 % (> 500 UFC/L), *P.aeruginosa* à 41 % (> 50 UFC/100 mL) et *E.coli* à hauteur de 2 % (> 1 UFC/100 mL).<sup>12</sup>

## 3. Contamination biologique à l'interface eau/surface : les biofilms

L'importance et la diversité des contaminations d'origine hydrique sur la santé humaine ont été illustrées succinctement dans les sections précédentes. Il n'en reste pas moins que d'autres environnements humides peuvent être propices au développement de microorganismes : il s'agit des biofilms. En effet, la présence d'eau sur une surface humide peut entraîner la formation d'un agglomérat de microorganismes appelé biofilm. Il s'agit d'une structure organisée, formée progressivement suivant différentes étapes. Le rôle des biofilms dans les infections en milieu hospitalier ainsi que leur participation dans les phénomènes de résistance aux antibiotiques sont abordés ici.

### 3.1. Présentation des biofilms

Les microorganismes sont couramment étudiés, caractérisés et identifiés en tant que cellules seules. On parle alors d'état planctonique. Cependant, les microorganismes sont plus fréquemment retrouvés au sein d'une matrice hautement hydratée, complexe : le biofilm. Ils se présentent alors sous l'état sessile. Ces biofilms peuvent se développer et adhérer sur des surfaces inertes ou biologiques, comme les environnements aquatiques, le sol, les tissus vivants, les dispositifs médicaux (prothèses, cathéters...)... Cette communauté microbienne peut être composée de bactéries, champignons ou protozoaires.<sup>13</sup> La figure 3 présente les grandes étapes impliquées dans la création dynamique de cette structure.

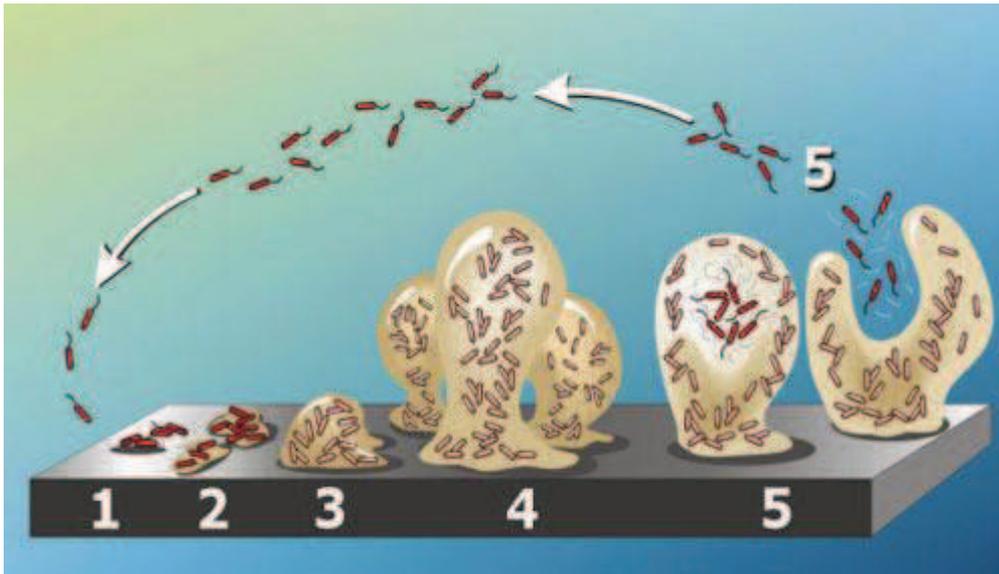
<sup>9</sup> Casanovas-Massana A, Blanch AR: **Characterization of microbial populations associated with natural swimming pools.** *International journal of hygiene and environmental health* 2013, 216(2):132-7.

<sup>10</sup> French Agency for Environmental and Occupational Health Safety: **Opinion of the French Agency for Environmental and Occupational Health Safety.** In: 2006/SA/011. AFSSET; 2009.

<sup>11</sup> Office Fédéral de la Santé Publique: **Recommandations pour l'évaluation hygiénique des étangs de baignade publique aménagés artificiellement.** In.; 2004.

<sup>12</sup> Brousseau N, Levesque B, Guillemet TA, Cantin P, Gauvin D, Giroux JP, Gingras S, Proulx F, Cote PA, Dewailly E: **Contamination of public whirlpool spas: factors associated with the presence of *Legionella* spp., *Pseudomonas aeruginosa* and *Escherichia coli*.** *International journal of environmental health research* 2013, 23(1):1-15.

<sup>13</sup> Lebeaux D, Ghigo J-M: **Infections associées aux biofilms. Quelles perspectives thérapeutiques issues de la recherche fondamentale?** *Médecine/sciences* 2012, 28(8-9):727-739.



**Figure 3 Développement et conceptualisation des biofilms dans une structure dynamique : adhésion réversible (1), adhésion irréversible (2) colonisation et maturation de premier stade (3), colonisation et maturation de deuxième stade (4), détachement (5), adapté de <sup>14</sup>**

Les cinq grandes étapes que nous pouvons retenir dans la formation des biofilms sont :

- 1- l'adhésion réversible où les microorganismes entrent en contact avec le support
- 2- l'adhésion irréversible où les microorganismes sont ancrés à la surface et s'organisent en amas
- 3- le premier stade de maturation qui est marqué par une croissance en surface (pluri-stratification cellulaire, épaisseur d'environ 10 µm)
- 4- le deuxième stade de maturation où il y a croissance en multi-couches et maturation du biofilm (épaisseur pouvant aller jusqu'à 100 µm)
- 5- le détachement.

Ce processus est partiellement contrôlé par le quorum sensing qui est un mécanisme de communication entre les bactéries, régulé entre autre par la densité de population. Différents types de molécules de signalisation interviennent dans le quorum sensing : chez les bactéries Gram négatif, il s'agit des homosérines lactones, tandis que chez les bactéries Gram positif, il s'agit de petits peptides.<sup>15</sup>

Ces systèmes très sophistiqués produisent des substances polymériques extracellulaires (EPS) contenant des polysaccharides, des protéines ou des acides nucléiques.<sup>16,17</sup> De par cette architecture, les biofilms sont des **formes de résistance aux stress environnementaux** (désinfectants...) et aux **phénomènes de déshydratation**.

<sup>14</sup> Jouenne T: **Biofilms bactériens**. In: *Techniques de l'ingénieur*. 2008.

<sup>15</sup> Camara M, Williams P, Hardman A: **Controlling infection by tuning in and turning down the volume of bacterial small-talk**. *The Lancet infectious diseases* 2002, 2(11):667-676.

<sup>16</sup> Vu B, Chen M, Crawford RJ, Ivanova EP: **Bacterial extracellular polysaccharides involved in biofilm formation**. *Molecules* 2009, 14(7):2535-2554.

<sup>17</sup> Leslie A: **Preventing biofilm formation using microbes and their enzymes**. *Basic biotechnology* 2011(7):6-11.

### 3.2. Rôle des biofilms dans les infections multiples

Selon le Center for Disease Control (CDC), **65 % des infections dans les pays développés sont causées par les biofilms**.<sup>18</sup> Cela inclut aussi bien les infections des oreilles des enfants, les gingivites, la fibrose kystique (mucoviscidose par *P.aeruginosa*<sup>19,20</sup>) que les infections liées à l'utilisation de dispositifs médicaux comme les cathéters, les prothèses orthopédiques, les valves cardiaques.

#### Colonisation bactérienne des dispositifs médicaux et des implants

Les infections nosocomiales sont fréquemment associées à la colonisation bactérienne des dispositifs médicaux ou des implants.<sup>21</sup> En effet en milieu hospitalier, les tubes médicaux et les cathéters sont couramment utilisés pour l'administration intraveineuse de fluides, de produits sanguins, de médicaments... ou bien l'évacuation de fluides ou d'urine au niveau de l'urètre ou du tractus gastro-intestinal. Cependant ces dispositifs intra-vasculaires peuvent être responsables de diverses complications comme la thrombose, les infections (bactériémie ou infections de poches sous-cutanée)...<sup>22</sup> Ainsi, le Centre Européen de Prévention et de Contrôle des maladies (ECDC) a indiqué en 2008, qu'annuellement environ 4 100 000 patients hospitalisés ont développé une infection associée aux soins (Health Care-Associated Infections, H.A.I.) reçus dans les hôpitaux Européens. Le nombre de décès en liaison directe avec ces infections est estimé au moins à 37 000.<sup>23</sup> De même, en 2002, le nombre de H.A.I. dans les hôpitaux Etats-Uniens a été estimé à environ 1,7 millions (dont 400 000 au sein des unités de soins intensifs) avec environ 100 000 décès.<sup>24</sup> Le principal site d'infections nosocomiales répertorié est le tractus urinaire. Les principaux microorganismes retrouvés au sein des cathéters urinaires sont *P.aeruginosa*, *E.faecalis*, *E.coli* et *P.mirabilis*.

#### Rôle des biofilms dans l'acquisition de la résistance aux antibiotiques

L'utilisation intensive des antibiotiques a favorisé l'acquisition des gènes de résistance. Les bactéries au sein des biofilms présentent une très grande hétérogénéité en termes de résistance aux antibiotiques.<sup>25</sup> Les gènes codant ces mécanismes de défense sont localisés au niveau des chromosomes bactériens ou sur les plasmides, et sont transmis à la génération suivante (transfert de gène vertical). Ces plasmides peuvent être aussi échangés entre les bactéries

<sup>18</sup> Hall-Stoodley L, Costerton JW, Stoodley P: **Bacterial biofilms: from the natural environment to infectious diseases**. *Nature reviews Microbiology* 2004, **2**(2):95-108.

<sup>19</sup> Lewis K: **Multidrug tolerance of biofilms and persister cells**. *Current topics in microbiology and immunology* 2008, **322**:107-131.

<sup>20</sup> Singh PK, Schaefer AL, Parsek MR, Moninger TO, Welsh MJ, Greenberg EP: **Quorum-sensing signals indicate that cystic fibrosis lungs are infected with bacterial biofilms**. *Nature* 2000, **407**(6805):762-764.

<sup>21</sup> Mack D, Becker P, Chatterjee I, Dobinsky S, Knobloch JK, Peters G, Rohde H, Herrmann M: **Mechanisms of biofilm formation in Staphylococcus epidermidis and Staphylococcus aureus: functional molecules, regulatory circuits, and adaptive responses**. *Int J Med Microbiol* 2004, **294**(2-3):203-212.

<sup>22</sup> Kim JT, Oh TY, Chang WH, Jeong YK: **Clinical review and analysis of complications of totally implantable venous access devices for chemotherapy**. *Medical oncology* 2012, **29**(2):1361-1364.

<sup>23</sup> Francolini I, Donelli G: **Prevention and control of biofilm-based medical-device-related infections**. *FEMS immunology and medical microbiology* 2010, **59**(3):227-238.

<sup>24</sup> Klevens RM, Edwards JR, Richards CL, Jr., Horan TC, Gaynes RP, Pollock DA, Cardo DM: **Estimating health care-associated infections and deaths in U.S. hospitals, 2002**. *Public health reports* 2007, **122**(2):160-166.

<sup>25</sup> Fux CA, Costerton JW, Stewart PS, Stoodley P: **Survival strategies of infectious biofilms**. *Trends in microbiology* 2005, **13**(1):34-40.

d'affiliations taxonomiques différentes (transfert de gène horizontal). Les transferts de gène horizontal par conjugaison sont répandus dans la nature, et plus particulièrement au sein des environnements où la densité bactérienne est élevée, comme c'est le cas pour les biofilms. Au sein des réseaux de distribution d'eau potable, il a été montré que des gènes de résistance aux antibiotiques présents chez les entérocoques (résistance à la vancomycine) et les entérobactéries (résistance aux bêta-lactamines) avaient été transférés aux bactéries hétérotrophes sans plus préciser les germes impliqués.<sup>26</sup> Ces transferts de gènes participent ainsi à la dissémination des gènes de résistance aux antibiotiques au sein des diverses populations bactériennes.

## **4. Contamination biologique des surfaces**

Les bactéries ne colonisent pas seulement les environnements hydriques puisque tout type de surface est susceptible d'être contaminé. Intéressons nous maintenant à la contamination microbienne des surfaces. Ainsi dans cette section sont reprises des études récentes relatives à la contamination des surfaces, que ce soit dans les habitats, les lieux publics ou plus particulièrement en environnement médical.

### **4.1. Les zones humides des habitats**

Les pathogènes peuvent survivre de quelques heures à plusieurs semaines sur des surfaces humides. C'est ce qui est notamment décrit dans une étude de 2010 où est présentée la contamination bactérienne de différentes surfaces dans des cuisines et des salles de bains aux Etats-Unis (tableau 2).<sup>27</sup> D'après ces données, nous pouvons constater que l'ensemble des surfaces peut être contaminé avec des taux en coliformes parfois relativement élevés (jusqu'à 35 UFC recueillies pour 1 cm<sup>2</sup> sur la surface des toilettes).

**Tableau 2 Contamination bactérienne en coliformes thermotolérants, coliformes totaux et bactéries hétérotrophes de différentes surfaces (dans les cuisines ou les salles de bains aux Etats-Unis) en UFC/cm<sup>2</sup>, adapté de <sup>27</sup>**

Types de surfaces	Coliformes thermotolérants	Coliformes totaux	Bactéries hétérotrophes
Poignée du robinet	3	24	35 500
Plan de travail	9	1	269
Planche à découper	1	33	9550
Poignée de chasse d'eau	2	5	8130
Dessus des toilettes	35	10	186
Surface du sol autour des toilettes	21	3	2880

<sup>26</sup> Schwartz T, Kohnen W, Jansen B, Obst U: **Detection of antibiotic-resistant bacteria and their resistance genes in wastewater, surface water, and drinking water biofilms.** *FEMS microbiology ecology* 2003, **43**(3):325-335.

<sup>27</sup> Sinclair RG, Gerba CP: **Microbial contamination in kitchens and bathrooms of rural Cambodian village households.** *Letters in applied microbiology* 2011, **52**(2):144-149.

## 4.2. Les surfaces en environnement hospitalier

La plupart des agents pathogènes nosocomiaux peuvent survivre ou persister pendant des mois sur des surfaces, qui peuvent ainsi être une source de transmission si aucune désinfection préventive n'est effectuée. Le tableau 3 présente les principaux microorganismes retrouvés en milieu hospitalier avec leur durée de vie sur surface inerte.

**Tableau 3** Durée de survie des principaux microorganismes hospitaliers retrouvés sur surface sèche inerte, adapté de <sup>28</sup>

Microorganismes	Durée de survie sur surfaces
<b>Bactéries à Gram positif non sporulées</b>	
<i>Enterococcus spp</i> (dont les Entérocoques Résistants à la Vancomycine (VRE))	mois
<i>S.aureus</i> (dont les Staphylocoques Résistants à la Métiline (SARM))	
<i>Streptococcus pyogenes</i>	
<b>Bactéries à Gram positif sporulées</b>	
<i>C.difficile</i>	mois
<b>Bactéries à Gram négatif</b>	
<i>Acinetobacter spp.</i>	mois
<i>E.coli</i>	
<i>Klebsiella spp.</i>	
<i>P.aeruginosa</i>	
<i>S.marcescens</i>	
<i>Shigella spp.</i>	
<b>Mycobactéries</b>	
<i>Mycobacterium tuberculosis</i>	mois
<b>Levure</b>	
<i>C.albicans</i>	jusqu'à 4 mois
<b>Virus gastro-intestinaux</b>	
astrovirus	2 mois
virus de l'hépatite A	
polio ou rota virus	
<b>Virus à diffusion hématogène</b>	
Virus de l'hépatite B, VIH	plus d'1 semaine
<b>Virus de l'herpès</b>	quelques heures jusqu'à 7 jours

## 4.3. La transmission manuportée

Que ce soit dans les hôpitaux (sur les gants lors d'opération chirurgicale,<sup>29</sup> à la surface des téléphones portables,<sup>30</sup> ...), les maisons de retraite (de par les activités sociales,<sup>31</sup> ou lors des

<sup>28</sup> Kramer A, Schwebke I, Kampf G: **How long do nosocomial pathogens persist on inanimate surfaces? A systematic review.** *BMC infectious diseases* 2006, **6**:130.

<sup>29</sup> Beldame J, Lagrave B, Lievain L, Lefebvre B, Frebourg N, Dujardin F: **Surgical glove bacterial contamination and perforation during total hip arthroplasty implantation: when gloves should be changed.** *Orthopaedics & traumatology, surgery & research : OTSR* 2012, **98**(4):432-440.

<sup>30</sup> Ustun C, Cihangiroglu M: **Health care workers' mobile phones: a potential cause of microbial cross-contamination between hospitals and community.** *Journal of occupational and environmental hygiene* 2012, **9**(9):538-542.

<sup>31</sup> Chamchod F, Ruan S: **Modeling the spread of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in nursing homes for elderly.** *PloS one* 2012, **7**(1):e29757.

poses de sondes naso-gastriques,<sup>32</sup>...) ou les espaces publics... les surfaces en contact avec la peau et les mains sont contaminées et peuvent servir de vecteur de transmission. Dans la figure 4 sont schématisées deux voies de transmission des microorganismes au sein des milieux hospitaliers, la transmission directe des surfaces inertes contaminées au patient ou bien *via* les mains du personnel hospitalier. Comme les patients hospitalisés sont le plus souvent des personnes fragiles, les règles d'hygiène, d'asepsie, de décontamination doivent être scrupuleusement respectées.

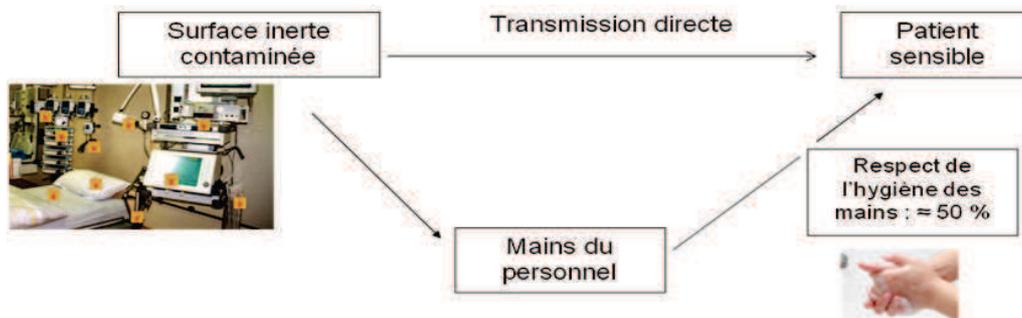


Figure 4 Schéma des voies de transmission des microorganismes, adapté de <sup>28</sup>

#### 4.4. Contamination des surfaces dans l'industrie pharmaceutique

Lors de la production des médicaments tout particulièrement, il est important de contrôler le niveau de contamination et ces normes très strictes sont établies en France par l'Agence Nationale de Sécurité du Médicament et des produits de santé (ANSM). Dans le guide officiel des Bonnes Pratiques de Fabrication (BPF) sont présentées les limites de contamination microbiologique devant être respectées dans les différentes Zones à Atmosphère Contrôlée (ZAC) durant la production (tableau 4).<sup>33</sup> Pour l'analyse de la contamination des surfaces, les géloses contact Rodac (gélose légèrement bombée permettant un dénombrement d'environ 25 cm<sup>2</sup>) sont souvent utilisées. Cette analyse peut également être effectuée *via* l'analyse des gants (données microbiologiques fournies en UFC/gant). L'analyse de l'air peut être effectuée soit à l'aide d'un collecteur d'air (données microbiologiques en UFC/m<sup>3</sup>), soit par dénombrement sur milieu gélosé (boîte ouverte durant 4 h, données microbiologiques en UFC pour 4 h). Ces zones sont notées de A à D en fonction des différents niveaux de contamination particulière et microbiologique, la zone A étant réservée pour les opérations à hauts risques pour la fabrication de produits aseptiques et la zone D pour les étapes moins critiques de la fabrication des médicaments non stériles.

Tableau 4 Limite de contamination microbiologique autorisée pour les surfaces et l'air définie pour les différentes Zones à Atmosphère Contrôlée en activité

Classe ZAC	Surfaces		Air	
	Géloses contact Rodac (dm <sup>2</sup> )	Empreintes de gant (UFC/gant)	Echantillon d'air (UFC/m <sup>3</sup> )	Sédimentation sur boîte de Pétri (UFC/4 h)
A	<1	<1	<1	<1
B	<5	<5	<10	<5
C	<25	-	<100	<50
D	<50	-	<200	<100

<sup>32</sup> Ho SS, Tse MM, Boost MV: **Effect of an infection control programme on bacterial contamination of enteral feed in nursing homes.** *The Journal of hospital infection* 2012, **82**(1):49-55.

<sup>33</sup> Agence Française de Sécurité Sanitaire des Produits de Santé: **Bonnes pratiques de fabrication.** In.; 2011.

## **5. Contamination biologique de l'air : les bioaérosols**

Les microorganismes ne sont pas seulement retrouvés au niveau des surfaces et/ou de l'eau. En effet, ils peuvent très bien survivre dans l'air et être aéroportés. Ainsi dans cette section, il sera tout d'abord question de la pollution intérieure par les bioaérosols pouvant être à l'origine de nombreux symptômes. Nous aborderons ensuite le rôle de la contamination de l'air lors des épisodes d'épidémies. Il sera ensuite question de l'utilisation potentielle de quelques microorganismes comme armes de destruction massive et enfin nous terminerons par la contamination aéroportée en milieu hospitalier.

### **5.1. Définition des bioaérosols**

Les aérosols sont des suspensions de particules dans un gaz ; les bioaérosols sont donc des aérosols contenant des particules aéroportées d'origine biologique comme les bactéries, les spores de champignons ou les virus. La taille de ces particules varie typiquement de moins de 1  $\mu\text{m}$  à 100  $\mu\text{m}$ .<sup>34</sup> Plus précisément, les bactéries et les spores de champignons ont une taille allant de 0,3  $\mu\text{m}$  à 30  $\mu\text{m}$  tandis que les virus sont beaucoup plus petits avec une taille allant de 20 nm à 300 nm.

Par l'aérosolisation, de grandes quantités de microorganismes peuvent être rapidement dispersées sur une vaste zone dans un court laps de temps. L'émission d'agents biologiques aéroportés, que ce soit de manière intentionnelle ou non, constitue donc une crainte indéniable dans le domaine de la santé publique et de la sécurité.

### **5.2. Rôle des bioaérosols dans la pollution intérieure**

Les environnements confinés (bureaux, maisons, moyens de transport...) dans lesquels il est estimé que nous passons environ 80 % de notre temps, ont tendance à présenter des concentrations élevées en COV et en microorganismes (bactéries, champignons, virus...). Ces pollutions peuvent être à l'origine du « Sick Building Syndrome (SBS) » (en français : « Syndrome du Bâtiment Malsain ») qui est un terme utilisé pour caractériser une multitude de symptômes (maux de tête, problèmes respiratoires, fatigue...) évoquant des étiologies différentes mais étant associés à un environnement particulier.<sup>35</sup>

En général, des dysfonctionnements de ventilation sont à l'origine de cette augmentation de pollution intérieure, mais diverses sources d'émissions de COV peuvent être également incriminées (peintures, colles, produits d'entretien...). Les microorganismes sont présentés comme étant le deuxième type de polluant impliqué dans cette pollution intérieure. Ils se développent plutôt sur des endroits humides, typiquement dans les systèmes de ventilation ou de climatisation ce qui participe à leur dispersion.

<sup>34</sup> Moon H-S, Lee JH, Kwon K, Jung HI: **Review of recent progress in micro-systems for the detection and analysis of airborne microorganisms.** *Analytical letters* 2012, **45**:113-129.

<sup>35</sup> Wang BL, Takigawa T, Yamasaki Y, Sakano N, Wang DH, Ogino K: **Symptom definitions for SBS (sick building syndrome) in residential dwellings.** *International journal of hygiene and environmental health* 2008, **211**(1-2):114-120.

Ces microorganismes présents dans l'air peuvent entraîner des allergies ou diverses infections.<sup>36,37</sup> Les principaux microorganismes associés à une voie d'exposition aérienne pouvant être à l'origine d'effets néfastes sur la santé sont répertoriés dans le tableau 5.

**Tableau 5 Principaux microorganismes associés à une voie d'exposition aérienne engendrant des effets sur la santé, adapté de**<sup>38,39</sup>

Organismes	Effets sur la santé	Voie d'exposition
<b>Moisissures</b>		
<i>Aspergillus fumigatus</i>	Infection respiratoire, allergie	Contamination par les moisissures dans les bâtiments
<i>Aspergillus versicolor</i>	Allergie, toxicose	Contamination par les moisissures dans les bâtiments
<i>Chaetomium species</i>	Toxicose	Contamination par les moisissures dans les bâtiments
<i>Penicillium species</i>	Allergie	Contamination par les moisissures dans les bâtiments
<b>Bactéries</b>		
<i>Bacillus anthracis</i>	Infection respiratoire	Animaux ou aérosolisation intentionnelle
<i>Legionella pneumophila</i>	Pneumonie	Aérosol (eau)
<i>Mycobacterium tuberculosis</i>	Tuberculose	Personne à personne
<i>Corynebacterium diphtheriae</i>	Diphthérie	Personne à personne
<b>Virus</b>		
<i>Virus respiratoire syncytiale</i>	Infection respiratoire	Personne à personne
<i>Virus parainfluenza type 3</i>	Infection respiratoire	Personne à personne

### 5.3. Implication des bioaérosols dans diverses épidémies

Au cours des siècles, l'humanité a du faire face à de multiples pandémies dont les plus connues sont la peste noire (agent responsable *Yersinia pestis*), le choléra (*Vibrio cholerae*) et la grippe espagnole (virus H1N1).

De nos jours, beaucoup de personnes vivent, travaillent et pratiquent diverses activités dans des environnements densément peuplés, ce qui accentue les risques d'exposition aux pathogènes. Outre ces changements de mode de vie, l'augmentation de la mobilité peut favoriser la dissémination rapide de nouvelles maladies et augmenter les risques de pandémies comme le Syndrome Respiratoire Aigu Sévère (SRAS) ou la tuberculose. De plus certaines souches peuvent muter et être plus virulentes comme les souches H5N1 de la grippe aviaire...<sup>40,41</sup>

<sup>36</sup> Paschoalino MP, Jardim WF: **Indoor air disinfection using a polyester supported TiO<sub>2</sub> photo-reactor**. *Indoor air* 2008, **18**:473-479.

<sup>37</sup> Vohra A, Goswami DY, Deshpandes DA, Block SS: **Enhanced photocatalytic disinfection of indoor air**. *Applied Catalysis B: Environmental* 2006, **65**:57-65.

<sup>38</sup> Stetzenbach LD, Buttner MP, Cruz P: **Detection and enumeration of airborne biocontaminants**. *Current opinion in biotechnology* 2004, **15**(3):170-174.

<sup>39</sup> Terrier O, Essere B, Yver M, Barthelemy M, Bouscambert-Duchamp M, Kurtz P, VanMechelen D, Morfin F, Billaud G, Ferraris O *et al*: **Cold oxygen plasma technology efficiency against different airborne respiratory viruses**. *Journal of clinical virology : the official publication of the Pan American Society for Clinical Virology* 2009, **45**(2):119-124.

<sup>40</sup> Bolashikov ZD, Melikov AK: **Methods for air cleaning and protection of building occupants from airborne pathogens**. *Building and Environment* 2009, **44**:1378-1385.

<sup>41</sup> Yong E: **Influenza: Five questions on H5N1**. *Nature* 2012, **486**(7404):456-458.

## 5.4. Utilisation des bioaérosols comme armes de destructions massives humaines

Les risques biologiques induits par les bioaérosols ont concouru au développement d'armes de destruction massive. En 2001 aux Etats-Unis, les lettres piégées à l'anthrax ont ravivé les craintes liées à de potentielles menaces bioterroristes *via* l'aérosolisation de pathogènes. Dans le tableau 6 sont présentés les principaux microorganismes pathogènes et toxines microbiennes pouvant être utilisés comme armes de destruction massive (ADM).

**Tableau 6 Microorganismes associés à une voie d'exposition aérienne pouvant générer des destructions massives, adapté de<sup>38,42</sup>**

Organisme	Pathologie	Voie d'exposition
<i>Bacillus anthracis</i>	anthrax	bioterrorisme
<i>Francisella tularensis</i>	tularémie	potentielles ADM, rongeurs infectés
<i>Variola virus</i>	varirole	potentielles ADM
<i>Yersinia pestis</i>	peste	potentielles ADM, puces infectées
SRAS-CoV	détresse respiratoire	

A l'heure actuelle, la dose infectieuse de ces agents biologiques de guerre, c'est-à-dire le nombre de cellules/particules nécessaires pour infecter l'Homme et entraîner une maladie n'est pas connu. En théorie, un seul microorganisme est suffisant pour induire une maladie s'il échappe au système immunitaire et est capable de se multiplier. De plus, la virulence de ces agents est également dépendante des conditions environnementales durant l'exposition (température, mouvement d'air, humidité...), ainsi que de l'individu exposé. Tous ces paramètres incontrôlables influent donc sur la difficulté d'estimation de la dose infectieuse.<sup>43</sup>

## 5.5. Microorganismes aéroportés retrouvés en milieu hospitalier

Certains microorganismes impliqués dans les maladies nosocomiales peuvent être véhiculés par l'air. C'est notamment le cas des coronavirus SRAS,<sup>44</sup> de *M.tuberculosis* (avec des souches résistantes aux antibiotiques),<sup>45,46</sup> d'*Aspergillus brasiliensis* (anciennement *A.niger*) ou *A.fumigatus*, de *P.aeruginosa*.<sup>47</sup> Que ce soit de manière directe ou indirecte, l'air peut être un vecteur dans la diffusion et la propagation de *Staphylococcus aureus* résistant à la

<sup>42</sup> Li Y, Leung GM, Tang JW, Yang X, Chao CYH, Lin JZ, Lu JW, Nielsen PV, Niu J, Qian h *et al*: **Role of ventilation in airborne transmission of infectious agents in the built environment - a multidisciplinary systematic review.** *Indoor air* 2007, **17**:2-18.

<sup>43</sup> Sabelnikov A, Zhukov V, Kempf CR: **Airborne exposure limits for chemical and biological warfare agents: is everything set and clear?** *International journal of environmental health research* 2006, **16**(4):241-253.

<sup>44</sup> Tong TR: **Airborne severe acute respiratory syndrome coronavirus and its implications.** *The Journal of infectious diseases* 2005, **191**(9):1401-1402.

<sup>45</sup> Memarzadeh F, Olmsed R, Bartley J: **Applications of ultraviolet germicidal irradiation disinfection in health care facilities: effective adjunct, but not stand-alone technology.** *Am J Infect Control* 2010, **38**:S13-24.

<sup>46</sup> Ko G, First MW, Burge HA: **Influence of relative humidity on particle size and UV sensitivity of *Serratia marcescens* and *Mycobacterium bovis* BCG aerosols.** *Tubercle and Lung disease* 2000, **80**(4/5):217-228.

<sup>47</sup> Jones AM, Govan JR, Doherty CJ, Dodd ME, Isalska BJ, Stanbridge TN, Webb AK: **Identification of airborne dissemination of epidemic multiresistant strains of *Pseudomonas aeruginosa* at a CF centre during a cross infection outbreak.** *Thorax* 2003, **58**(6):525-527.

méticilline (SARM), ainsi que dans la diffusion des norovirus ou de *C.difficile*<sup>48</sup> ou d'*Acinetobacter* spp.<sup>49,50</sup>

---

<sup>48</sup> Griffiths WD, Bennett A, Speight S, Parks S: **Determining the performance of a commercial air purification system for reducing airborne contamination using model micro-organisms: a new test methodology.** *Journal of Hospital infection* 2005, **61**:242-247.

<sup>49</sup> Kerr KG, Beggs CB, Dean SG, Thornton J, Donnelly JK, Todd NJ, Sleigh PA, Qureshi A, Taylor CC: **Air ionisation and colonisation/infection with methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* and *Acinetobacter* species in an intensive care unit.** *Intensive care medicine* 2006, **32**(2):315-317.

<sup>50</sup> Navon-Venezia S, Ben-Ami R, Carmeli Y: **Update on *Pseudomonas aeruginosa* and *Acinetobacter baumannii* infections in the healthcare setting.** *Current opinion in infectious diseases* 2005, **18**(4):306-313.

## **II. Les systèmes de désinfection, décontamination, dépollution**

Après avoir exposé la diversité et la complexité des contaminations de différents environnements, intéressons nous aux systèmes de désinfection couramment utilisés afin d'éliminer ces microorganismes. Ce chapitre sera consacré aux techniques de désinfection utilisées pour la potabilisation de l'eau, la dépollution/désinfection de l'air ou encore la désinfection des surfaces.

### **1. Systèmes de désinfection de l'eau**

Parmi les **traitements physico-chimiques** utilisés pour éliminer les germes indésirables dans l'eau, la chloration et l'ozonation sont de loin les procédés les plus utilisés. Ces techniques sont décrites ci-dessous. L'efficacité de ces traitements est fonction de différents paramètres dont la dose, le temps de contact, la température, le pH...

#### **1.1. La chloration**

Le chlore est utilisé pour la désinfection de l'eau. Il est employé sous forme de chlore gazeux ou d'hypochlorite de sodium. Dans l'eau, le chlore libre est présent sous trois formes : l'acide hypochloreux, l'ion hypochlorite et l'ion chlorure. L'hypochlorite de sodium agit en dégradant les acides gras et en neutralisant les acides aminés. L'acide hypochloreux relargue du chlore qui réagit avec les groupes amines des protéines formant des chloramines.<sup>51</sup> De plus, lors de la chloration, il y a une destruction des phospholipides et une altération du métabolisme conduisant à la mort bactérienne. 0,08 mg de chlore/minute/L peuvent éliminer 99% des bactéries (à une température de 1-2°C et à pH neutre).<sup>52</sup>

Ces méthodes présentent néanmoins quelques désavantages, puisqu'elles peuvent générer des sous-produits de désinfection aux propriétés mutagènes ou cancérogènes.<sup>53,54</sup> Par exemple, le chlore peut réagir avec des composés organiques pour produire des sous produits toxiques comme les trihalométhanes ou les composés chlorés de l'acide acétique.

#### **1.2. L'ozonation**

La technique d'ozonation est basée principalement sur la formation, lors de la décomposition de l'ozone au contact de l'eau, d'espèces actives oxydantes telles que les radicaux hydroxyles OH°. L'ozone est au préalable produit dans des générateurs d'ozone par décharge électrique

<sup>51</sup> Estrela C, Estrela CR, Barbin EL, Spano JC, Marchesan MA, Pecora JD: **Mechanism of action of sodium hypochlorite**. *Brazilian dental journal* 2002, **13**(2):113-117.

<sup>52</sup> Malato S, Fernandez-Ibanez P, Maldonado MI, Blanco J, Gernjak W: **Decontamination and disinfection of water by solar photocatalysis: recent overview and trends**. *Catalysis Today* 2009, **147**:1 - 59.

<sup>53</sup> Bond T, Goslan EH, Parsons SA, Jefferson B: **Treatment of disinfection by-product precursors**. *Environmental technology* 2011, **32**(1-2):1-25.

<sup>54</sup> Richardson SD, Plewa MJ, Wagner ED, Schoeny R, Demarini DM: **Occurrence, genotoxicity, and carcinogenicity of regulated and emerging disinfection by-products in drinking water: a review and roadmap for research**. *Mutation research* 2007, **636**(1-3):178-242.

au contact de l'air. Ainsi, avec 0,02 mg d'ozone/L/minute (à une température de 5°C et pour un pH allant de 6 à 7), 99% des bactéries peuvent être éliminées.<sup>52</sup>

## **2. Systèmes de décontamination de l'air**

Les méthodes les plus utilisées pour décontaminer/désinfecter l'air sont : la filtration (adsorption sur charbon actif ou filtres HEPA),<sup>55</sup> la ventilation, l'utilisation en faible quantité d'ozone et les rayonnements UV germicides. Toutes ces techniques décrites ci-dessous nécessitent un confinement de la zone contaminée.<sup>56,57</sup>

### **2.1. La désinfection physique**

En ce qui concerne, les techniques de désinfection physique, en l'occurrence la filtration et la ventilation, les microorganismes ne sont pas détruits mais ils sont simplement évacués.

#### **La filtration**

La filtration de l'air consiste à retenir les particules de toute nature en suspension dans l'air avec une efficacité déterminée. A l'heure actuelle, plusieurs systèmes de filtration sont disponibles : les **pré-filtres**, les **filtres HEPA** (High Efficiency Particulate Air) ou les **filtres ULPA** (Ultra-Low Penetration Air). Les filtres HEPA doivent retenir en un passage unique 99,97 % des particules de diamètre supérieur ou égal à 0,3 µm, tandis que les filtres ULPA doivent retenir plus de 99,999 % des particules de diamètre supérieur à 0,1 µm.<sup>58</sup> La filtration implique généralement des coûts élevés.<sup>59</sup> De plus, les filtres utilisés voient souvent leurs performances évoluer, et en fait diminuer, au cours du temps. Ils introduisent également des pertes de charge importantes, coûteuses d'un point de vue énergétique. La filtration nécessite souvent la mise en œuvre de systèmes de post-dégradation pour éliminer les bactéries, d'où un coût de fonctionnement assez élevé. Ainsi, afin d'inactiver les microorganismes piégés à la surface du filtre, cette technique est souvent couplée à des rayonnements UV-C germicides.

#### **La ventilation**

Le renouvellement de l'air d'une pièce avec de l'air propre est une des méthodes les plus efficaces pour éliminer les pathogènes, permettant de diminuer les risques d'infection dans une pièce. Le taux de renouvellement d'air est le rapport entre le volume d'air neuf renouvelé pendant une heure et le volume du local, c'est donc le nombre de fois que l'air d'un local a été renouvelé (il s'exprime en h<sup>-1</sup>).

<sup>55</sup> Goswami DY, Vijayaraghavan S, Lu SY, Tamm G: **New and emerging developments in solar energy**. *Solar energy* 2004, **76**:33-43.

<sup>56</sup> Pal A, Pehkonen SO, Yu LE, Ray MB: **Photocatalytic inactivation of Gram-positive and Gram-negative bacteria using fluorescent light**. *Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry* 2007, **186**:335-341.

<sup>57</sup> Sanchez B, Sanchez-Munoz M, Munoz-Vicente M, Cobas G, Portera R, Suarez S, Gonzalez A, Rodriguez N, Amils R: **Photocatalytic elimination of indoor air biological and chemical pollution in realistic conditions**. *Chemosphere* 2012, **87**:625-630.

<sup>58</sup> Memarzadeh F, Olmsed R, Bartley J: **Applications of ultraviolet germicidal irradiation disinfection in health care facilities: effective adjunct, but not stand-alone technology**. *Am J Infect Control* 2010, **38**:S13-24.

<sup>59</sup> Keller V, Keller N, Ledoux MJ, Lett MC: **Biological agent inactivation in a flowing air stream by photocatalysis**. *Chemical communications (Cambridge, England)* 2005(23):2918-2920.

## 2.2. La désinfection chimique

Dans le cas de la désinfection chimique de l'air, que ce soit par les rayonnements ultra-violets germicides, l'ozonation, l'action du peroxyde d'hydrogène sous forme gazeuse ou le plasma froid, les microorganismes sont détruits.

### Les rayonnements ultra-violets germicides

La désinfection/purification de l'air peut être réalisée par l'action de rayonnements **ultra-violets germicides** (UV-C de longueur d'onde de l'ordre de 253 nm) qui permettent la destruction des agents pathogènes (bactéries, virus) *via* des dommages aux acides nucléiques (ADN/ARN). Les effets germicides des UV sur les pathogènes dépendent entre autre de l'intensité, de la longueur d'onde, de la durée d'exposition aux UV, de la présence ou non d'une membrane cellulaire et de son épaisseur.

Il est important de préciser que ces rayonnements UV ne sont pas sans conséquence pour l'Homme, puisqu'ils peuvent induire des mutations de l'ADN et être à l'origine de cancers. Ces systèmes de décontamination doivent donc avoir lieu en absence du personnel.

### L'ozonation

L'**ozone** est un puissant oxydant pouvant inactiver efficacement les microorganismes. Il est surtout utilisé pour le traitement de l'eau (voir Chapitre 1 II.1.2) mais quelques études relatent son efficacité pour la désinfection de l'air. Des générateurs d'ozone portatifs ont été notamment développés au Canada et ont montré une efficacité antimicrobienne en environnement hospitalier.<sup>60</sup>

### Le peroxyde d'hydrogène sous forme gazeuse

Grâce à son potentiel d'oxydo-réduction élevé, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> est un excellent agent d'oxydation qui peut être utilisé sous forme gazeuse pour désinfecter l'air ainsi que les surfaces. H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> génère la formation de radicaux hydroxyles OH° qui attaquent les lipides membranaires et les autres composants cellulaires. Il a une action aussi bien sur les endospores bactériennes, les bactéries sous formes végétatives et les virus.<sup>61</sup> Cette technique est notamment employée pour la désinfection des isolateurs, des salles blanches, des équipements techniques selon des cycles maîtrisés (taux d'humidité relative, injection de la bonne quantité d'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>...) et ne laisse aucun résidu.<sup>62,63</sup>

<sup>60</sup> Sharma M, Hudson JB: **Ozone gas is an effective and practical antibacterial agent.** *Applied epidemiology in health care settings and the community* 2008, **36**(8).

<sup>61</sup> Otter JA, French GL: **Survival of nosocomial bacteria and spores on surfaces and inactivation by hydrogen peroxide vapor.** *Journal of clinical microbiology* 2009, **47**(1):205-207.

<sup>62</sup> Doriath C: **La mesure de l'humidité relative lors de la décontamination à l'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.** In: *Salles Propres Le magazine de la maîtrise de la contamination.* 2012.

<sup>63</sup> French GL, Otter JA, Shannon KP, Adams NM, Watling D, Parks MJ: **Tackling contamination of the hospital environment by methicillin-resistant Staphylococcus aureus (MRSA): a comparison between conventional terminal cleaning and hydrogen peroxide vapour decontamination.** *The Journal of hospital infection* 2004, **57**(1):31-37.

## Le plasma froid

Les plasmas froids sont des gaz ionisés créés par décharge électrique dans un gaz à basse pression ou à pression atmosphérique. Le plasma est composé d'ions, d'électrons et d'espèces neutres : atomes, radicaux et molécules qui peuvent être dans leur état fondamental ou dans un état excité. Le flux de plasma doit avoir une vitesse assez élevée afin qu'il y ait une projection des particules actives dont les ROS (atome d'oxygène O, l'ozone O<sub>3</sub>, le radical hydroxyle OH<sup>°</sup>) et les espèces réactives de l'azote (l'atome d'azote N, le monoxyde d'azote NO et le dioxyde d'azote NO<sub>2</sub>), sur les cibles microbiennes. Les microorganismes sont ainsi détruits, *via* l'oxydation ou la peroxydation des lipides ou des modifications protéiques.

Le principal inconvénient de ces systèmes est le fait qu'ils ne peuvent être utilisés qu'en absence du personnel ; il ne s'agit donc pas d'une désinfection continue mais d'une désinfection qui est assurée et maîtrisée pour un temps donné.

## 3. La désinfection des surfaces

### 3.1. Les principaux désinfectants

Les désinfectants chimiques traditionnellement couramment utilisés pour traiter les surfaces sont les alcools, les aldéhydes, l'iode, les dérivés phénoliques,<sup>64</sup> les ammoniums quaternaires... Pour qu'un désinfectant soit considéré comme bactéricide, il faut qu'il y ait une réduction de 5 log en 20 min. Le tableau 7 présente les principaux désinfectants chimiques avec leurs cibles d'action. Nous pouvons remarquer que ces désinfectants agissent pour la plupart sur une inhibition des fonctions enzymatiques ou bien sur l'intégrité membranaire.

**Tableau 7 Principaux désinfectants chimiques et les cibles d'action sur la cellule, extrait de <sup>65</sup>**

	<b>Cible microbienne et type d'interaction</b>	<b>Effet sur la cellule</b>
<b>Aldéhydes</b>	Alkylation des groupes NH <sub>2</sub> des protéines et acides nucléiques	Inhibition des fonctions enzymatiques et de la synthèse des acides nucléiques
<b>Dérivés phénoliques, alcools</b>	Dénaturation des protéines	Inhibition enzymatique, altération de la membrane, coagulation cytoplasmique
<b>Chlore, iode, peroxyde d'hydrogène</b>	Oxydation des groupes –SH des protéines	Inhibition enzymatique, modification de protéines structurales
<b>Ammoniums quaternaires</b>	Liaison aux groupes phosphates et chaînes d'acides gras des lipides de la membrane cellulaire	Altération de la membrane, fuite de constituants cellulaires

### 3.2. La résistance des microorganismes aux désinfectants

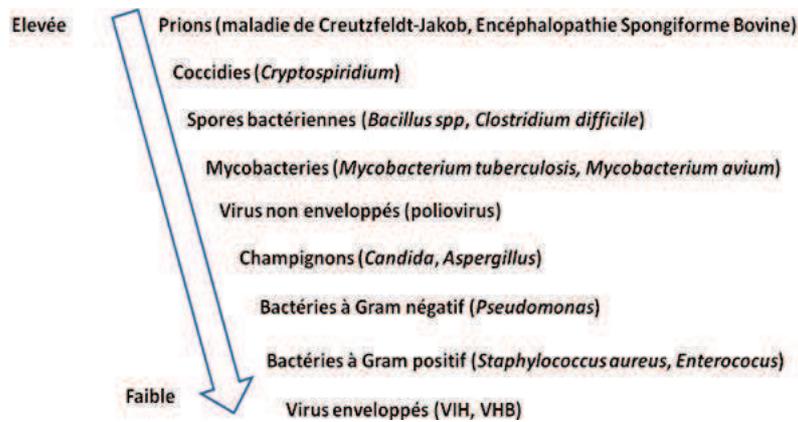
Bien que les systèmes de désinfection soient divers, certains microorganismes de par leur composition et leur structure présentent une résistance aux désinfectants. Cette résistance est déterminée par la perméabilité, la taille et la complexité de la membrane. La figure 5 présente

<sup>64</sup> Liou JW, Chang HH: **Bactericidal Effects and Mechanisms of Visible Light-Responsive Titanium Dioxide Photocatalysts on Pathogenic Bacteria**. *Archivum immunologiae et therapeuticae experimentalis* 2012.

<sup>65</sup> Fonze-Christe C, Guignard B: **Désinfectants et antiseptiques**. In.; 2012.

[http://pharmacie.hug-ge.ch/ens/conferences/bgcf\\_2012desinfection.pdf](http://pharmacie.hug-ge.ch/ens/conferences/bgcf_2012desinfection.pdf) consulté le 8 janvier 2013

les principaux agents infectieux classés en fonction de leur résistance aux désinfectants : les prions sont considérés comme les plus résistants tandis que les virus enveloppés présentent la plus faible résistance.



**Figure 5** Classification des principaux agents infectieux en fonction de leur résistance aux agents désinfectants.<sup>66,67</sup>

Après avoir décrit succinctement les différentes techniques de désinfections physiques et chimiques pour l'eau, l'air et les surfaces et exposé les principaux inconvénients de chacune d'entre elles, nous allons mettre en avant un procédé d'oxydation avancée relativement récent : la photocatalyse hétérogène.

<sup>66</sup> Malato S, Fernandez-Ibanez P, Maldonado MI, Blanco J, Gernjak W: **Decontamination and disinfection of water by solar photocatalysis: recent overview and trends.** *Catalysis Today* 2009, **147**:1 - 59.

<sup>67</sup> McDonnell G, Russell AD: **Antiseptics and disinfectants: activity, action, and resistance.** *Clinical microbiology reviews* 1999, **12**(1):147-179.

### **III. La photocatalyse hétérogène : un Procédé d'Oxydation Avancée (AOP)**

En plein essor, depuis une vingtaine d'années, les Procédés d'Oxydation Avancée (AOP) sont présentés comme étant des méthodes de **traitements chimiques conçus pour éliminer les polluants organiques** considérés comme bio-récalcitrants et/ou pour la désinfection d'agents pathogènes émergents. Ces technologies peuvent être aussi bien utilisées pour la **dépollution de l'eau, de l'air**<sup>68</sup> ou la mise au point de **surfaces auto-nettoyantes**. Les AOP sont basés sur la formation d'une espèce oxydante très réactive : le **radical hydroxyle OH<sup>•</sup>**. La génération de ces radicaux peut être induite par une activation de nature catalytique, électrochimique et/ou photochimique. Dès lors, une dizaine de procédés d'oxydation se sont développés parmi lesquels, la **photocatalyse hétérogène**, la photolyse de l'ozone (O<sub>3</sub>/UV) ou de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, la radio-ou sonolyse de l'eau, la peroxonation et la photo-peroxonation (O<sub>3</sub>/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>/UV) ainsi que les procédés Fenton et photo-Fenton. Du fait de leur faible sélectivité, les radicaux hydroxyles très réactifs avec un potentiel d'oxydation de + 2,80 V (/ENH), peuvent oxyder de nombreuses molécules organiques et inorganiques, ce qui peut *in fine* conduire à leur minéralisation, avec la formation de CO<sub>2</sub> et d'ions inorganiques.<sup>69</sup>

#### **1. Principe de la photocatalyse hétérogène**

La photocatalyse hétérogène implique la photoexcitation d'un semi-conducteur par absorption de la lumière et la réaction avec une molécule en phase adsorbée. Elle peut être décrite comme la catalyse d'une réaction photochimique et met en jeu une interface solide/gaz ou solide/liquide.<sup>68</sup> Le processus photocatalytique peut être divisé en cinq étapes indépendantes:

1. migration diffusionnelle des réactifs de la phase fluide vers la surface du photocatalyseur, y compris dans la porosité du photocatalyseur
2. adsorption d'au moins un réactif à la surface du catalyseur
3. **réaction en phase adsorbée** (étape où se déroule la réaction photocatalytique à proprement parlé)
4. désorption des produits
5. migration diffusionnelle des produits de la surface du catalyseur vers la phase fluide.

<sup>68,70</sup>

Quand un catalyseur semi-conducteur (TiO<sub>2</sub>, ZnO, Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub>, ZnS, CdS...) est illuminé par des photons d'énergie égale ou supérieure à l'énergie de sa bande interdite, ou band gap, (E<sub>g</sub> < hv), il y a ainsi absorption de ces photons et création de paires électron (e<sup>-</sup>) - trou (h<sup>+</sup>) avec transfert d'un électron de la bande de valence à celle de conduction (Figure 6 (a) et **Eq.1**). Il y a alors création d'une lacune électronique (h<sup>+</sup>) au niveau de la bande de valence (**Eq.1**).

<sup>68</sup> Herrmann J-M: **Environmental photocatalysis: perspectives for China**. *Science China Chemistry* 2010, **53**(9):1831-1843.

<sup>69</sup> Malato S, Fernandez-Ibanez P, Maldonado MI, Blanco J, Gernjak W: **Decontamination and disinfection of water by solar photocatalysis: recent overview and trends**. *Catalysis Today* 2009, **147**:1 - 59.

<sup>70</sup> Scacchi G, Bouchy M, Foucaut J-F, Zahraa O: **Cinétique et catalyse**; 1996.

Simultanément, en présence d'une phase fluide (gaz ou liquide), une adsorption spontanée se produit et selon le potentiel redox de chaque adsorbat, un transfert d'électron peut s'opérer vers les molécules de caractère électro-accepteur (A) (Figure 6 (d) et **Eq.2**), tandis que les photo-trous positifs sont transférés vers les molécules de caractère électro-donneur (D) (Figure 6 (e) et **Eq.3**).

Enfin, une recombinaison électron-trou reste possible. Elle peut avoir lieu dans le volume (Figure 6 (b)) ou en surface du semi-conducteur (Figure 6 (c)) et s'accompagne d'un dégagement de chaleur **Eq.4**.<sup>71</sup>

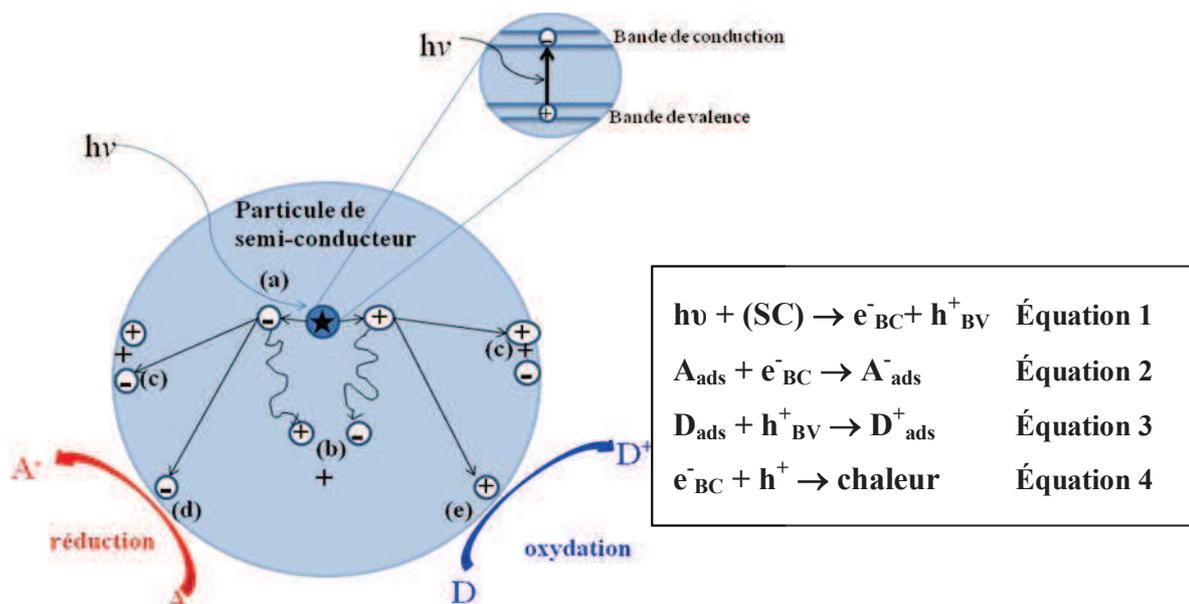
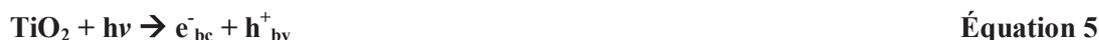


Figure 6 Principe général de la photocatalyse. Absorption de photon et génération de paire électron-trou (a); recombinaison en volume (b) ; recombinaison en surface (c); réduction d'un accepteur d'électron (d) ; oxydation d'un donneur d'électron (e).

Dans le cas de  $\text{TiO}_2$ , on écrit alors :



Dans le cas d'une migration des charges photogénérées à la surface de la particule, les photoélectrons réduisent l'oxygène moléculaire adsorbé à la surface du  $\text{TiO}_2$  pour former les ions (radicaux) superoxydes ( $\text{O}_2^{\circ-}$ ) (**Eq.6**):



Cette réaction permet à la fois de générer une espèce active oxydante, mais contribue aussi à la séparation des charges. Les trous photogénérés ( $h^+_{\text{bv}}$ ) peuvent eux réagir avec l'eau adsorbée ou les espèces  $\text{OH}^-$  pour former des radicaux hydroxyles très réactifs ( $\text{OH}^\circ$ ), de courte durée de vie comparés à  $\text{O}_2^{\circ-}$  (**Eq.7-8**) :



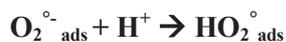
<sup>71</sup> Bahnemann D: **Photocatalytic water treatment: solar energy applications**. *Solar energy* 2004, 77(5):445-459.

Ils peuvent aussi oxyder directement une molécule adsorbée (Eq.9) :

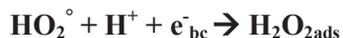


Équation 9

D'autres réactions secondaires peuvent aussi avoir lieu en phase adsorbée, parmi lesquelles on peut citer celles conduisant à la formation du radical hydroperoxyde ou du peroxyde d'hydrogène (Eq.10-11)



Équation 10



Équation 11



Équation 12<sup>72</sup>

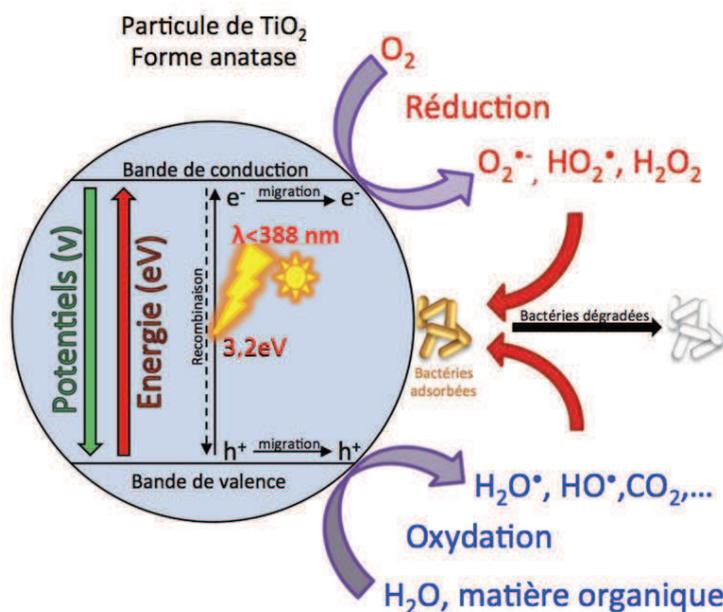


Figure 7 Réactions d'oxydo-réduction au cours du processus photocatalytique sur TiO<sub>2</sub>, adapté de<sup>73</sup>

Les molécules adsorbées peuvent donc réagir (*i.e.* être oxydées) directement par les trous photogénérés, ou indirectement par les espèces radicalaires ou plus généralement oxygénées.

## 2. Les matériaux photocatalytiques

Plusieurs critères doivent être retenus pour la sélection d'un matériau semi-conducteur utilisé en tant que photocatalyseur :

- l'énergie des photons incidents (radiations UV ou visible) doit être supérieure à l'énergie de la bande interdite, pour permettre l'activation du semi-conducteur. La figure 8 présente les bandes interdites de différents semi-conducteurs pouvant être utilisés en photocatalyse

le potentiel redox de la bande de conduction doit être plus négatif que le potentiel de réduction des espèces chimiques (cas d'une réaction  $A + e^- \rightarrow A^-$ , par exemple

$O_{2ads} + e^-_{bc} \rightarrow O_2^\circ_{ads}$ ); et le potentiel redox de la bande de valence doit être plus positif que le potentiel d'oxydation des espèces chimiques (cas d'une oxydation  $D \rightarrow D^+ + e^-$ )

<sup>72</sup> Guillard C, Bui T-H, Felix C, Moules V, Lina B, Lejeune P: **Microbiological disinfection of water and air by photocatalysis**. *CR Chimie* 2008, **11**:107-113.

<sup>73</sup> Guillard C, Kartheuser B, Lacombe S: **La photocatalyse: dépollution de l'eau ou de l'air et matériaux autonettoyants**. In: *techniques de l'ingénieur*. 2012.

- il doit présenter une inertie chimique et être photo-stable, dans l'air ou dans l'eau selon l'application
- sa toxicité doit être faible voire nulle.

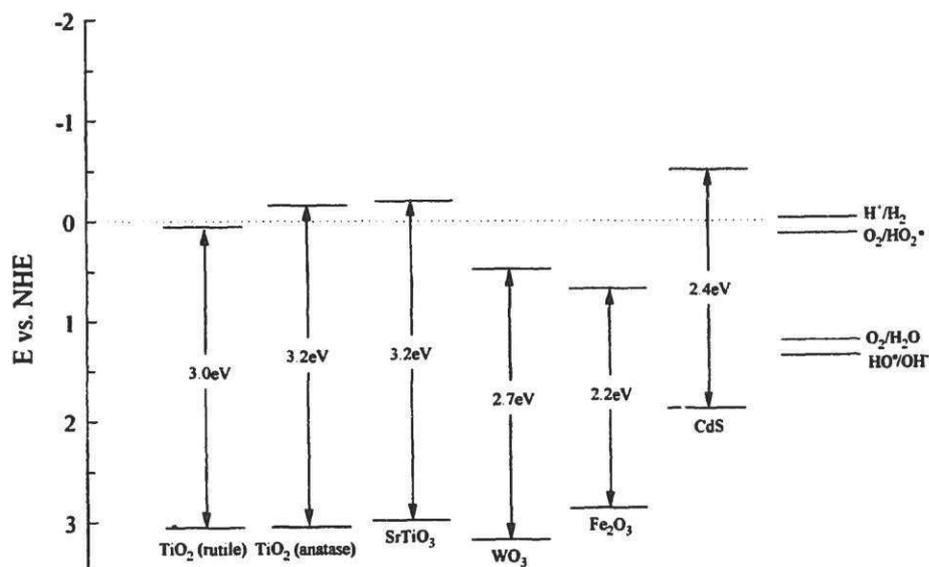


Figure 8 Position des bandes de conduction et de valence de différents semi-conducteurs étudiés en photocatalyse<sup>74</sup>

Parmi, les nombreux semi-conducteurs connus, le  $\text{TiO}_2$  est le plus souvent utilisé pour des applications environnementales. Le  $\text{TiO}_2$  est un **oxyde métallique** relativement peu abondant mais aisément productible, selon les procédés chlorures et sulfates, à partir de minerais d'ilménite ( $\text{FeOTiO}_2$ ) et de rutile ( $\text{TiO}_2$ ).<sup>75</sup> Sous forme de poudre de (nano)particules ou de solution colloïdale, il est utilisé dans les médicaments en tant que pigment blanc (excipient de gélules par exemple), dans les produits cosmétiques, le dentifrice, les peintures, les filtres de cigarettes, les colorants alimentaires (E171)...

Le  $\text{TiO}_2$  est **chimiquement stable**, possède un **rendement quantique élevé** sous sa forme anatase ainsi qu'un fort indice de réfraction.<sup>76</sup> Les produits  $\text{TiO}_2$  commerciaux sont bon marché car le titane est un élément très abondant sur Terre et les voies de synthèse sont éprouvées à l'échelle industrielle à ce jour.

Sous sa forme anatase, il peut être activé par le rayonnement UV et la position de ces bandes d'énergie confère aux porteurs de charge photogénérés l'énergie nécessaire à de nombreuses réactions d'oxydation et de réduction de surface. Sous sa forme rutile, il peut par ailleurs être activé par les rayonnements UV et du début du visible ( $\lambda < 413 \text{ nm}$ ), ce qui le rend intéressant pour les applications sous irradiation solaire.

A titre de comparaison, les autres photocatalyseurs souffrent pour la plupart d'au moins un inconvénient qui limite leur utilisation hors des laboratoires. CdS et ZnS sont instables dans l'eau, sujets à l'oxydation en sulfate ; ZnO est moins stable que  $\text{TiO}_2$  en phase liquide et la

<sup>74</sup> Mills A, Le Hunte S: **An overview of semiconductor photocatalysis**, *Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry* 1997, **108**:1-35

<sup>75</sup> Lu SY, Wu D, Wang QL, Yan J, Buekens AG, Cen KF: **Photocatalytic decomposition on nano-TiO<sub>2</sub>: destruction of chloroaromatic compounds**. *Chemosphere* 2011, **82**(9):1215-1224.

<sup>76</sup> Carp O, Huisman CL, Reller A: **Photoinduced reactivity of titanium dioxide**. *Progress in solid state chemistry* 2004, **32**:33-177.

position des bandes de  $\text{WO}_3$  ne lui permet pas de former  $\text{O}_2^{\cdot-}$ .  $\text{Ga}_2\text{O}_3$  quant à lui nécessite une activation UV-C et ne convient pas aux applications solaires. C'est pourquoi, hors du laboratoire, le photocatalyseur le plus utilisé est le  $\text{TiO}_2$  et ce, depuis la découverte de la photoélectrolyse de l'eau par Fujishima et Honda en 1972.<sup>77</sup> En quelque sorte, même si certains travaux antérieurs existent, cette découverte fut à l'origine de l'utilisation de  $\text{TiO}_2$  comme photocatalyseur pour l'oxydation des polluants<sup>78,79</sup> ainsi que pour la dégradation des microorganismes.<sup>80</sup> Ainsi, en 2011, il est rapporté que plus de 11.000 publications relatives à la photocatalyse étaient parues.<sup>81</sup>

## 2.1. Structures cristallines du $\text{TiO}_2$

Le  $\text{TiO}_2$  se présente sous différentes formes allotropiques ou polymorphiques et dont les principales phases utilisées en photocatalyse sont l'**anatase**, le **rutile** et le **brookite**. Le tableau 8 présente ces différentes formes allotropiques. L'unité de base de la structure cristalline du  $\text{TiO}_2$  est un octaèdre de formule  $\text{TiO}_6^{2-}$  avec en son centre un atome de titane. L'anatase et le rutile partagent le même système cristallin (quadratique), mais ils diffèrent par l'arrangement des octaèdres et leur distorsion. Ces différences interfèrent sur la structure électronique de ces deux formes allotropiques, puisque la largeur de la bande interdite de l'anatase est de 3,2 eV et celle du rutile est de 3 eV. A partir de ces valeurs, il est alors possible de calculer la longueur d'onde maximale d'excitation du semi-conducteur *via* la relation de Planck :

$$\text{Largeur bande interdite} = h\nu = hc/\lambda$$

Équation 13

soit  $\lambda = 388$  nm pour l'anatase et  $\lambda = 413$  nm pour le rutile

<sup>77</sup> Fujishima A, Honda K: **Electrochemical photolysis of water at a semiconductor electrode**. *Nature* 1972, **238**(5358):37-38.

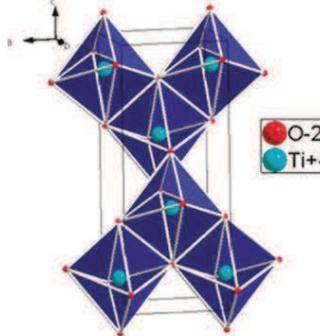
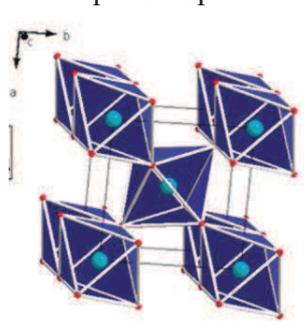
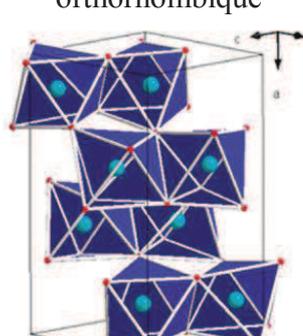
<sup>78</sup> Carey J, Lawrence J, Tosine H: **Photodechlorination of PCB's in the Presence of Titanium Dioxide in Aqueous Suspensions**. *Bulletin of Environmental Contamination & Toxicology* 1976, **16**(6):691-701.

<sup>79</sup> Frank SN, Bard AJ: **Heterogeneous Photocatalytic Oxidation of Cyanide Ion in Aqueous Solutions at  $\text{TiO}_2$  Powder**. *J Am Chem Soc* 1977, **99**(1):303-304.

<sup>80</sup> Matsunaga T, Tomoda R, Nakajima T, Wake H: **Photoelectrochemical sterilization of microbial cells by semiconductor powders**. *FEMS Microbiol Lett* 1985, **29**(1-2):211-214.

<sup>81</sup> Foster HA, Ditta IB, Varghese S, Steele A: **Photocatalytic disinfection using titanium dioxide: spectrum and mechanism of antimicrobial activity**. *Appl Microbiol Biotechnol* 2011, **90**:1847-1868.

Tableau 8 Caractéristiques cristallographiques des principales formes de TiO<sub>2</sub>

Nom	dioxyde de titane, titania		
Formule chimique	TiO <sub>2</sub>		
Masse molaire g/mol	79,890		
Apparence	solide blanc		
Phase cristalline	anatase	rutile	brookite
Système cristallin <sup>82</sup>	quadratique	quadratique	orthorhombique
			
Gap (eV)	3,2	3	3,4

La Figure 9 présente le spectre d'irradiance solaire reçue au niveau du sol de la Terre, et montre que seule une faible proportion de la lumière solaire, correspondant à la gamme des UV est utilisable pour l'activation du TiO<sub>2</sub>. Les rayonnements UV représentent environ 5% du rayonnement solaire.

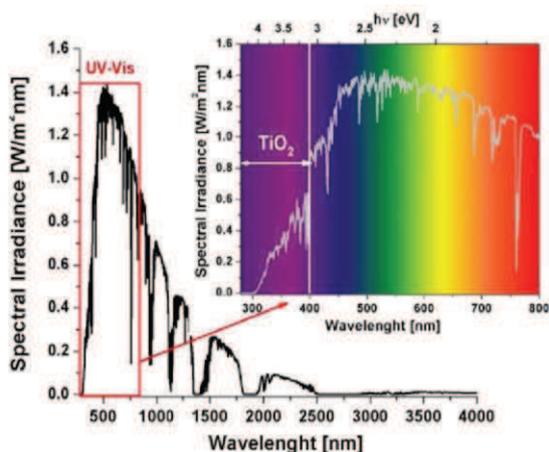


Figure 9: Relation entre le spectre d'irradiance (particulièrement de la lumière ultraviolette et visible) et l'absorption du TiO<sub>2</sub><sup>83</sup>

<sup>82</sup> Dambournet D, Belharouak I, Amine K: **Tailored Preparation Methods of TiO<sub>2</sub> Anatase, Rutile, Brookite: Mechanism of Formation and Electrochemical Properties.** *Chemistry of materials* 2010, **22**:1173 -1179.

<sup>83</sup> <http://www.hausarbeiten.de/faecher/vorschau/175947.html> consulté le 5 mars 2013.

## 2.2. Le TiO<sub>2</sub> de référence : P25 Degussa-Evonik

Le matériau photocatalytique de référence dans la plupart des études réalisées en laboratoire est le TiO<sub>2</sub> commercial P25 (Aeroxide TiO<sub>2</sub> P25), synthétisé par Evonik-Degussa selon la voie chlorure.<sup>84</sup> Il est constitué d'un mélange d'environ 80 % d'anatase et 20 % de rutile pour les phases cristallisées et d'une faible fraction de TiO<sub>2</sub> sous forme amorphe.<sup>85</sup> Il est souvent cité comme TiO<sub>2</sub> de référence en raison de son activité photocatalytique élevée sous irradiation UV-A et donc aussi sous illumination solaire naturelle (« héliophotocatalyse »).

Le TiO<sub>2</sub> PC500 de Cristal-Millénum, obtenu selon la voie sulfate et constitué de 100 % d'anatase comme phase cristallisée, est également cité comme produit commercial de référence. Il est intégré dans les papiers cellulosiques non tissés de la société Ahlstrom.

Les raisons pour lesquelles le TiO<sub>2</sub> P25 montre une activité si importante par rapport à d'autres TiO<sub>2</sub> commerciaux qui possèdent pourtant une surface spécifique nettement plus élevée (de l'ordre de 300 m<sup>2</sup>/g pour les TiO<sub>2</sub> commerciaux Hombikat UV100, PC500 ou ST01 constitués seulement d'anatase, contre 50 m<sup>2</sup>/g pour le TiO<sub>2</sub> P25) sont encore sujettes à débat. Il a par exemple été proposé qu'il existerait une synergie entre les phases anatase et rutile, avec un transfert électronique de la bande de conduction de l'anatase vers celle du rutile, qui permettrait une meilleure séparation des charges et réduirait les phénomènes de recombinaison.<sup>86</sup> La présence de la phase rutile permet aussi d'étendre le spectre d'absorption du photocatalyseur dans le début du domaine du visible ce qui pourrait améliorer les performances sous irradiation solaire.

Tableau 9 Propriétés du TiO<sub>2</sub> P25 Degussa-Evonik (données fournisseur)<sup>87</sup>

Propriétés	Aeroxide <sup>®</sup> TiO <sub>2</sub> P25 (poudre)
Surface spécifique	50 ± 15 m <sup>2</sup> .g <sup>-1</sup>
pH dans une suspension à 4 %	3,5 – 4,5
Taille des cristaux	21 nm
Densité (selon la DIN EN ISO 787/11, août 1983)	~130 g/L
Humidité (2 h à 105°C)	≤ 1,5 % (masse)
Perte à la chaleur (2 h à 1 000°C sur un matériel séché 2 h à 105°C)	≤ 2,0 % (masse)
Teneur en TiO <sub>2</sub>	≥ 99,5 % (masse)

<sup>84</sup> Ohtani B: **Preparing articles on photocatalysis. Beyond the illusions, misconceptions, and speculation.** *Chemistry letters* 2008, **37**(3):217-229.

<sup>85</sup> Ohtani B, Prieto-Mahaney OO, Li D, Abe R: **What is Degussa (Evonik) P25? Crystalline composition analysis, reconstruction from isolated pure particles and photocatalytic activity test.** *Journal of Photochemistry and Photobiology A* 2010, **216**(2-3):179-182.

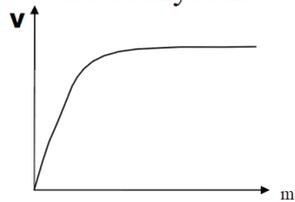
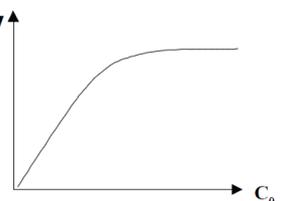
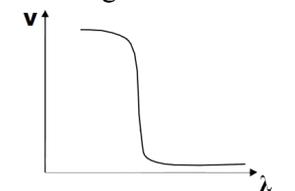
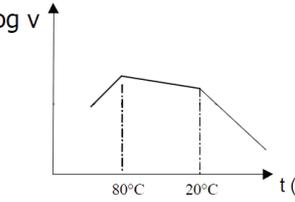
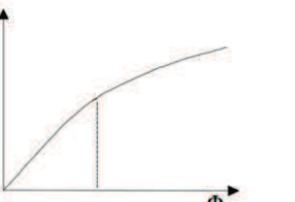
<sup>86</sup> Li G, Gray K: **The solid–solid interface: Explaining the high and unique photocatalytic reactivity of TiO<sub>2</sub>-based nanocomposite materials.** *Chemical physics* 2007, **337**:173-187.

<sup>87</sup> <http://www.aerosil.com/product/aerosil/en/effects/photocatalyst/pages/default.aspx> consulté le 5 mars 2013.

### 2.3. Paramètres physiques influençant la cinétique de la réaction photocatalytique

Aussi bien à l'échelle du laboratoire qu'à l'échelle industrielle, les cinétiques des réactions photocatalytiques dépendent de cinq principaux facteurs présentés dans le tableau 10 :<sup>68</sup>

Tableau 10 Paramètres physiques influençant la cinétique des réactions photocatalytiques

<p>Influence de la masse du catalyseur</p> 	<p>La vitesse initiale de la réaction est directement proportionnelle à la masse du catalyseur en raison d'une plus grande surface irradiée disponible pour l'adsorption et la dégradation. Cependant, au dessus d'une certaine masse de catalyseur <math>m</math>, la vitesse de réaction devient indépendante de la masse du catalyseur. Ce palier est dû à un effet d'écrantage du photocatalyseur, ce qui entraîne l'existence d'une masse optimale qui dépend des conditions opératoires et des propriétés du photocatalyseur.</p>
<p>Influence de la concentration du réactif</p> 	<p>Généralement, il est admis que la vitesse de la réaction est fonction de la concentration en réactifs et suit le mécanisme de Langmuir-Hinshelwood. En négligeant en première approximation l'adsorption des produits et des intermédiaires, la vitesse de dégradation est proportionnelle au taux de recouvrement des sites actifs. Ainsi, à faible concentration, la vitesse est directement proportionnelle à la concentration en réactif, alors qu'à forte concentration (sites actifs saturés), la vitesse de réaction est indépendante de la concentration.</p>
<p>Influence de la longueur d'onde</p> 	<p>La vitesse de réaction est fonction de la longueur d'onde utilisée et dépend donc du spectre d'absorption du catalyseur, avec un seuil correspondant à l'énergie de la bande interdite. Le gap du <math>\text{TiO}_2</math> est d'environ 3,2 eV pour l'anatase (<math>\lambda \leq 388 \text{ nm}</math>) et de 3,02 eV pour le rutile (<math>\lambda \leq 413 \text{ nm}</math>)</p>
<p>Influence de la température</p> 	<p>De par l'activation photonique du photocatalyseur, le système photocatalytique ne nécessite pas d'apport énergétique sous forme de chaleur. Toutefois, la température agit sur les propriétés d'adsorption et de désorption des composés à la surface du catalyseur et sur la mobilité des porteurs de charge. Il est ainsi généralement admis qu'un optimum de température existe entre 20 °C et 80°C : à basse température, la désorption des produits demeure l'étape limitante, tandis que l'adsorption des réactifs est défavorisée à haute température.</p>
<p>Influence du flux lumineux</p> 	<p>Les photons sont la source d'énergie responsable de l'activité photocatalytique et influent donc directement sur la vitesse de réaction. A faible irradiance, les paires <math>e^-/h^+</math> sont consommés plus rapidement par les réactions chimiques que par les phénomènes de recombinaison d'où une relation linéaire (le trou est l'espèce limitante dans le cas du <math>\text{TiO}_2</math>). A irradiance plus forte, les phénomènes de recombinaison consomment plus rapidement les charges que les réactions en surface, car la vitesse de formation des paires <math>e^-/h^+</math> devient trop importante. A très forte irradiance, la vitesse est alors indépendante de l'irradiance et on atteint un plateau.</p>

## **2.4. Applications photocatalytiques**

A l'heure actuelle, la majeure partie des applications photocatalytiques concerne le développement de surfaces, revêtements et matériaux (notamment de construction) auto-nettoyants, auto-désinfectants ou épurants ainsi que la mise en œuvre de procédés de traitement de l'air et de l'eau. D'autres applications potentielles existent comme la production d'hydrogène par photodissociation de l'eau, la fonctionnalisation de surfaces (tissus...). Ces applications sont à des stades de recherche et développement plus ou moins avancés et certaines sont actuellement mises en œuvre commercialement.

Actuellement, la principale réussite en matière de transfert de technologie photocatalytique des laboratoires académiques vers les industriels est le verre autonettoyant, commercialisé en France par Saint-Gobain et en Grande Bretagne par Pilkington. Dans le domaine des surfaces, il existe également des matériaux de construction (acier, béton, ciment), des revêtements routiers, des peintures incorporant une fonction photocatalytique (et super-hydrophile). Des dispositifs de traitement de l'air intérieur sont également disponibles sur le marché, mais leur efficacité a été relativement peu mesurée de manière systématique.

Il faut préciser que l'efficacité des produits commercialement disponibles est très variable, et que pour certains, elle est même sujette à caution. C'est pourquoi un important travail de standardisation (normalisation) des procédures d'évaluation, des performances des matériaux ou des systèmes a été entrepris à l'échelle française, européenne et mondiale.

A l'avenir, la capacité de la photocatalyse à dégrader des molécules faiblement concentrées (rejets hospitaliers, polluants émergents...) devrait être de plus en plus exploitée, en post-traitement ou en couplage avec d'autres techniques de traitement.

## **3. Désinfection/décontamination par photocatalyse**

La photocatalyse sera mise en œuvre dans trois milieux différents, en phase liquide et en phase gazeuse, correspondant respectivement aux applications en désinfection/potabilisation de l'eau et en désinfection/décontamination de l'air, mais également sur surface, avec comme applications les surfaces et textiles auto-nettoyants/biocides. De ce fait, une étude bibliographique relative à ces différents milieux a été réalisée.

### **3.1. Désinfection/potabilisation de l'eau par photocatalyse**

Il s'agit là d'une étude bibliographique bien évidemment non exhaustive relative aux travaux réalisés en photocatalyse hétérogène pour la désinfection de l'eau. Nous allons notamment présenter l'influence de paramètres environnementaux tels que la nature de l'eau, puis comparer brièvement photocatalyseurs pulvérulents en suspension et immobilisés sur l'efficacité d'inactivation antimicrobienne. Nous terminerons par la présentation de la technique SODIS utilisée à ce jour pour la désinfection de l'eau par plus de 5 millions de personnes et mentionnerons brièvement certaines limites à considérer.

Bien que les techniques traditionnelles pour la désinfection de l'eau telles que l'ozone ou le chlore soient très efficaces, la génération de sous-produits de désinfection (SDP) aux propriétés mutagènes et/ou cancérigènes (comme les trihalométhanes) est un réel inconvénient. L'utilisation de la photocatalyse pour le traitement de l'eau présente ainsi un intérêt grandissant, puisque ce procédé permet aussi **bien l'élimination des composés chimiques que des microorganismes pathogènes** sans génération de SDP. Seules les radiations UV à fortes irradiances peuvent induire la mort des microorganismes (les rayonnements UV-A ayant moins d'effets néfastes que les UV-C),<sup>88,89</sup> tandis que la photocatalyse *via* la génération de molécules au pouvoir oxydant élevé, permet une inactivation des microorganismes avec des irradiances UV-A beaucoup plus faibles.<sup>90</sup>

Ainsi dès 1985, Matsunaga *et al.* se sont intéressés à l'inactivation bactérienne en utilisant des particules de Pt/TiO<sub>2</sub> sous irradiation UV pendant 120 min avec une lampe aux halogénures métalliques, et ont montré qu'il était ainsi possible de tuer différentes espèces bactériennes et fongiques (*Lactobacillus acidophilus*, *Saccharomyces cerevisiae* et *E.coli*).<sup>91</sup>

Par la suite, les propriétés bactéricides de TiO<sub>2</sub> (sous forme anatase et avec des longueurs d'onde d'excitation comprises entre 300 nm et 400 nm) ont été mises en évidence sur *E.coli* et sur la flore hétérotrophe d'une eau naturelle lors de tests réalisés dans un réacteur de type flux traversant.<sup>92</sup> L'étude de Wei *et al.* réalisée l'année suivante toujours chez *E.coli*, a notamment mis en exergue le rôle majeur de l'oxygène lors de l'action photocatalytique et montré que l'intensité lumineuse et la dose de TiO<sub>2</sub> utilisée sont deux paramètres importants pouvant influencer sur l'efficacité bactéricide en phase liquide.<sup>93</sup>

En 1995, Watts *et al.* ont étudié l'inactivation des coliformes (population d'environ 5.10<sup>7</sup> UFC/mL) et des poliovirus 1 (3.10<sup>3</sup> virus/ mL) ajoutés artificiellement dans les effluents secondaires des eaux usées en présence de TiO<sub>2</sub> anatase (Fisher Scientific) à 0,25 g/L. Approximativement 150 min ont été nécessaires pour induire une inactivation de 2 log pour les coliformes, tandis que seulement 30 min ont été nécessaires pour obtenir une réduction de 2 log pour les poliovirus. Il faut savoir que pour les effluents des eaux usées contenant de l'ordre de 10<sup>3</sup> à 10<sup>6</sup> UFC/mL de bactéries et virus, une inactivation de plus de 4 log est

<sup>88</sup> Hassen A, Mahrouk M, Ouzari H, Cherif M, Boudabous A, Damelincourt J-J: **UV disinfection of treated wastewater in a large-scale pilot plant and inactivation of selected bacteria in a laboratory UV device.** *Bioresource Technology* 2000, **74**:141-150.

<sup>89</sup> Swetha S, Santhosh SM, Geetha Balakrishna R: **Synthesis and comparative study of nano-TiO<sub>2</sub> over Degussa P-25 in disinfection of water.** *Photochemistry and photobiology* 2010, **86**(3):628-632.

<sup>90</sup> Lin CH, Yu RF, Cheng WP, Liu CR: **Monitoring and control of UV and UV-TiO<sub>2</sub> disinfections for municipal wastewater reclamation using artificial neural networks.** *Journal of hazardous materials* 2012, **209-210**:348-354.

<sup>91</sup> Matsunaga T, Tomoda R, Nakajima T, Wake H: **Photoelectrochemical sterilization of microbial cells by semiconductor powders.** *FEMS Microbiol Lett* 1985, **29**(1-2):211-214.

<sup>92</sup> Ireland JC, Klostermann P, Rice EW, Clark RM: **Inactivation of *Escherichia coli* by titanium dioxide photocatalytic oxidation.** *Applied and environmental microbiology* 1993, **58**:1668-1670.

<sup>93</sup> Wei C, Lin WY, Zainal Z, Williams NE, Zhu K, Kruzic AP, Smith RL, Rajeshwar K: **Bactericidal activity of TiO<sub>2</sub> photocatalyst in aqueous medio: toward a solar assisted water disinfection system.** *Environmental Science and Technology* 1994, **28**:934-938.

indispensable, afin de répondre aux exigences réglementaires et pouvoir réutiliser les effluents.<sup>94</sup>

Les premiers essais de désinfection par photocatalyse UV-C et solaire (TiO<sub>2</sub> P25, 0,25 g/L) d'eau usée contenant des coliformes et *Enterococcus faecalis* ont été réalisés en 2000 par Herrera Melian *et al.*, et comparés à l'effet du rayonnement (UV-C/solaire seul). Les auteurs ont notamment mis en évidence l'influence du pH sur les performances photocatalytiques, et ont montré qu'une recroissance bactérienne plus lente se produisait après le traitement photocatalytique. De ce fait, ils ont conclu que la désinfection à grande échelle ne pourrait se faire qu'avec des temps d'exposition longs et pour de petits volumes faiblement contaminés.<sup>95</sup> On peut cependant noter que ces tests ont été réalisés à une concentration faible en TiO<sub>2</sub>, et que les résultats auraient pu être plus encourageants pour des concentrations plus élevées en TiO<sub>2</sub>. En effet, Rahmani *et al.* ont obtenu une inactivation des coliformes en eau naturelle pour une concentration en TiO<sub>2</sub> P25 optimale de 0,8 g/L et avec un rayonnement UV de 0,9 W/m<sup>2</sup>.<sup>96</sup>

Plus récemment Benabbou *et al.* ont pris en considération l'influence de différents paramètres inhérents au traitement photocatalytique comme la concentration en TiO<sub>2</sub> (concentration en TiO<sub>2</sub> P25 de 0,1 à 2,5 g/L), l'intensité et le type de rayonnement UV (irradiances UV-A, UV-B et UV-C respectivement de 3,9 ; 4 et 3,6 mW/cm<sup>2</sup>) sur l'inactivation bactérienne d'*E.coli*. Quel que soit le taux de contamination initial (10<sup>5</sup> à 10<sup>8</sup> UFC/mL), les auteurs ont déterminé une concentration en TiO<sub>2</sub> optimale de 0,25 g/L, sous irradiation UV-A, et ont observé – à intensité de rayonnement identique – que le système UV-C/TiO<sub>2</sub> induisait un effet bactéricide beaucoup plus important que les systèmes UV-A/TiO<sub>2</sub> et UV-B/TiO<sub>2</sub>, cet effet bactéricide des UV-C étant observé même en absence de TiO<sub>2</sub>. En termes de durabilité et de mise en œuvre du traitement photocatalytique, étant donné qu'une réduction de 3 log de la viabilité d'*E.coli* a été obtenue après 10 min de rayonnement dans le cas du système UV-A/TiO<sub>2</sub>, ils concluent que l'utilisation de l'énergie solaire et de TiO<sub>2</sub> serait un système adéquat pour désinfecter l'eau.<sup>97</sup>

L'efficacité photocatalytique en phase liquide a également été étudiée sur des microorganismes plus résistants. Par exemple, *E.cloacae*, une entérobactérie résistante au rayonnement UV-A, a pu être inactivée par photocatalyse UV-A (TiO<sub>2</sub> P25, 0,1 g/L) (365 nm, 5,5 mW/cm<sup>2</sup>), avec une réduction de 4 log en 40 min de rayonnement.<sup>98</sup> Seven *et al.* ont eux étudié l'inactivation par photocatalyse (TiO<sub>2</sub> P25 et ZnO à 0,01 g/mL avec une lampe à vapeur de sodium à 400 W) de *C.albicans* et d'*A.brasiliensis* -des champignons relativement résistants aux

<sup>94</sup> Watts RJ, Kong S, Orr MP, Miller GC, Henry BE: **Photocatalytic inactivation of coliform bacteria and viruses in secondary wastewater effluent.** *Water research* 1995, **29**(1):95-100.

<sup>95</sup> Herrera Melian H, Dona Rodriguez JM, Viera Suarez A, Tello Rendon ET, Valdes do Campo C, Arana J, Perez Pena J: **The photocatalytic disinfection of urban waste waters.** *Chemosphere*, 2000, **41**(3):323-327.

<sup>96</sup> Rahmani AR, Samarghandi MR, Samadi MT, Nazemi F: **Photocatalytic disinfection of coliform bacteria using UV/TiO<sub>2</sub>.** *Journal of research in health sciences* 2009, **9**(1):1-6.

<sup>97</sup> Benabbou AK, Derriche Z, Felix C, Lejeune P, Guillard C: **Photocatalytic inactivation of *Escherichia coli*. Effect of concentration of TiO<sub>2</sub> and microorganism, nature, and intensity of UV irradiation.** *Applied catalysis B: Environmental* 2007, **76**:257-263.

<sup>98</sup> Ibanez J, Litter M, Pizarro R: **Photocatalytic bactericidal effect of TiO<sub>2</sub> on *Enterobacter cloacae*: Comparative study with other Gram (-) bacteria.** *Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry* 2003, **157**(1):81-85.

antiseptiques et désinfectants<sup>99</sup>- et ont montré, alors qu'une réduction de 5 log a été obtenue pour *C.albicans* après 120 min de traitement, aucune inactivation n'a été observée pour *A.brasiliensis*.<sup>100</sup>

A ce jour, aucune corrélation n'a été observée entre la surface spécifique, la taille des particules et la taille des agrégats des différents échantillons de TiO<sub>2</sub>, et la cinétique d'inactivation des microorganismes. Ceci diffère des études réalisées jusqu'ici sur les composés chimiques, qui montrent par exemple que la surface spécifique est généralement un des paramètres clés du système photocatalytique (parmi d'autres). Il est probable que cette différence de comportement provienne notamment des différences de taille entre les deux types de cibles, de quelques angströms pour une molécule chimique à quelques microns pour les microorganismes, qui ont comme conséquence que l'adsorption/le contact des cibles à la surface des particules élémentaires (primaires) ou des agrégats de TiO<sub>2</sub> est fortement fonction du type de cible. Pour la même raison, il est probable également que la morphologie des particules élémentaires ou des agrégats de TiO<sub>2</sub> de même que leur porosité aient un rôle nettement plus important lors de la dégradation des microorganismes qu'elles n'en ont pour celle des molécules chimiques.

Ainsi, bien que l'activation soit basée principalement sur les mêmes phénomènes physico-chimiques, il existerait de réelles différences entre l'oxydation photocatalytique des composés chimiques et la désinfection photocatalytique. Par exemple, en comparaison avec l'oxydation des composés chimiques, il s'avèrerait que les **réactions de désinfection soient plus complexes à comprendre et à interpréter du fait de l'influence de nombreux paramètres** intervenant dans la cinétique de réaction comme un potentiel stress osmotique, les mécanismes de réparation ou bien l'adhésion des bactéries à la surface du TiO<sub>2</sub>.<sup>101</sup>

### **Paramètres environnementaux influençant l'efficacité d'inactivation**

La majorité des études de désinfection de l'eau par photocatalyse sont réalisées avec de l'eau distillée ou des solutions tampons (avec une agitation continue afin de faciliter les contacts entre le TiO<sub>2</sub> et les espèces cibles),<sup>102</sup> même si l'utilisation de l'eau naturelle comme l'eau de puits, les eaux d'égout ou l'eau de rivière donne une prédiction plus fiable de l'inactivation bactérienne en conditions réelles.<sup>103</sup> En effet, ces eaux contiennent généralement une multitude de composés organiques et inorganiques altérant dans la majorité des cas l'efficacité d'inactivation.

<sup>99</sup> McDonnell G, Russell AD: **Antiseptics and disinfectants: activity, action, and resistance.** *Clinical microbiology reviews* 1999, **12**(1):147-179.

<sup>100</sup> Seven O, Dindar B, Aydemir S, Metin D, Ozinel MA, Icli S: **Solar photocatalytic disinfection of a group of bacteria and fungi aqueous suspensions with TiO<sub>2</sub>, ZnO and Sahara desert dust.** *Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry* 2004, **165**:103-107.

<sup>101</sup> Ochiai T, Fujishima A: **Photoelectrochemical properties of TiO<sub>2</sub> photocatalyst and its applications for environmental purification.** *Journal of Photochemistry and photobiology C: Photochemistry reviews*, 2012, **13**:247-262.

<sup>102</sup> McCullagh C, Robertson JMC, Bahnemann DW, Robertson PKJ: **The application of TiO<sub>2</sub> photocatalysis for disinfection of water contaminated with pathogenic micro-organisms: a review.** *Res Chem Intermed* 2007, **33**(3-5):359-375.

<sup>103</sup> Wist J, Sanabria J, Dierolf C, Torres W, Pulgarin C: **Evaluation of photocatalytic disinfection of crude water for drinking-water production.** *Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry* 2002, **147**(3):241-246.

A titre d'exemple, le tableau 11 présente l'efficacité d'élimination d'une population de *S.aureus* et de *E.coli* (population initiale de  $10^7$  UFC/mL) obtenue en eau physiologique (solution iso-osmotique calibrée à 0,9 % de NaCl) ou en eau naturelle (eau d'un ruisseau de Taïwan) avec ou sans TiO<sub>2</sub> (sous la forme d'un revêtement de TiO<sub>2</sub> sol-gel). Après dénombrements réalisés à t<sub>24h</sub>, il s'avère qu'en absence de TiO<sub>2</sub>, le pourcentage d'inactivation bactérienne est plus élevé en eau physiologique qu'en eau naturelle (que cela soit pour *S.aureus* ou *E.coli*). L'addition de TiO<sub>2</sub> induit une réduction de 100 % de la viabilité cellulaire chez *S.aureus* et *E.coli* en eau physiologique tandis que cette réduction est plus faible en eau naturelle, en étant respectivement de 94 % pour *S.aureus* et de 93 % pour *E.coli*. Cette différence d'inactivation en eau dite naturelle *versus* eau physiologique est entre autres expliquée par les principaux paramètres décrits ci-dessous.

**Tableau 11 Inactivation de *S.aureus* et *E.coli* en eau physiologique (0,9 % de NaCl) et en eau naturelle (eau d'un ruisseau de Taïwan) avec ou sans TiO<sub>2</sub> sous irradiation UV-A pendant 30 min, adapté de<sup>104</sup>**

Souche	Condition du traitement	Efficacité d'élimination (comptage après 24h d'incubation)
<i>S.aureus</i>	TiO <sub>2</sub> et eau physiologique	100 %
	Eau physiologique	96 %
	TiO <sub>2</sub> et eau naturelle	94 %
	Eau naturelle	73 %
<i>E.coli</i>	TiO <sub>2</sub> et eau physiologique	100 %
	Eau physiologique	89 %
	TiO <sub>2</sub> et eau naturelle	93 %
	Eau naturelle	69 %

#### ✓ La composition chimique

La présence dans l'eau de matière d'origine minérale (argile, limon, sable...), animale, de microparticules, de microorganismes... induit une diminution de l'efficacité de l'action photocatalytique.<sup>105,106</sup> Plusieurs hypothèses non exclusives ont pu être proposées:

- la croissance bactérienne serait stimulée par la présence de nutriments, absents dans l'eau distillée
- ces « particules » entreraient en compétition avec les bactéries à la surface des agrégats de TiO<sub>2</sub>, réduisant de fait l'efficacité générale
- ces mêmes « particules » pourraient absorber une partie du rayonnement et de fait réduire la transmission de la lumière dans le système et donc l'irradiance reçue par le TiO<sub>2</sub>
- l'agrégation des particules de TiO<sub>2</sub> en milieu aqueux pourrait être favorisée par la présence de telles « particules », ce qui affecterait négativement l'efficacité de désinfection.<sup>107,108</sup>

<sup>104</sup> Chen C-Y, Wu L-C, Chen H-Y, Chung Y-C: **Inactivation of *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli* in water using photocatalysis with fixed TiO<sub>2</sub>.** *Water air soil pollut* 2010, **212**:231-238.

<sup>105</sup> Malato S, Fernandez-Ibanez P, Maldonado MI, Blanco J, Gernjak W: **Decontamination and disinfection of water by solar photocatalysis: recent overview and trends.** *Catalysis Today* 2009, **147**:1 - 59.

<sup>106</sup> Van Grieken R, Marugan J, Sordo C, Pablos C: **Comparison of the photocatalytic disinfection of *E.coli* suspensions in slurry, wall and fixed-bed reactors.** *Catalysis Today* 2009, **144**:48-54.

<sup>107</sup> Rincon AG, Pulgarin C: **Photocatalytic inactivation of *E.coli*: effect of (continuous-intermittent) light intensity and of (suspended-fixed) TiO<sub>2</sub> concentration.** *Applied Catalysis B: Environmental* 2003, **44**:263-284.

<sup>108</sup> Alrousan DM, Dunlop PS, McMurray TA, Byrne JA: **Photocatalytic inactivation of *E. coli* in surface water using immobilised nanoparticle TiO<sub>2</sub> films.** *Water research* 2009, **43**(1):47-54.

- il est possible que ces effets soient accentués par la turbidité de l'eau causée par la présence de ces nombreuses « particules ».

De plus, la dégradation de la matière organique peut entraîner la libération d'éléments complexes, comme les éléments phosphoreux, la silice, le fer, le manganèse...qui selon leur forme peuvent servir d'éléments nutritifs et favoriser la survie bactérienne,<sup>109</sup> ou encore entraîner la désactivation du photocatalyseur.

Certains ions ( $\text{HCO}_3^-$ ,  $\text{SO}_4^{2-}$ ,  $\text{Cl}^-$ ,  $\text{HPO}_4^{2-}$ ,  $\text{NO}_3^-$ ,  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ ) sont par exemple naturellement présents dans l'eau de source et entrent dans les cycles biologiques de l'agriculture, des activités domestiques et industrielles. L'effet de ces ions sur l'efficacité d'inactivation d'*E.coli* a été évalué. Ainsi, il a été montré que la présence, même en faible concentration, de  $\text{HPO}_4^{2-}$  et  $\text{HCO}_3^-$  interfère négativement sur le taux d'inactivation, étant donné qu'ils bloquent les sites actifs de la surface du photocatalyseur.<sup>110</sup>

De même, la présence d'ions sulfates induit une diminution de l'efficacité de désinfection photocatalytique sur *E.coli* car l'adsorption des ions sulfates à la surface du  $\text{TiO}_2$  bloque les sites actifs du  $\text{TiO}_2$ .<sup>111</sup>

#### ✓ Le pH

Certains oxydes, dont le  $\text{TiO}_2$ , possèdent des propriétés amphotères, qui se traduisent par une charge de surface et une surface possédant un caractère acide ou basique selon le pH de la solution. Ces variations de charge de surface en fonction du pH influent sur l'agglomération du  $\text{TiO}_2$  et sur ses propriétés d'adsorption. Pour un pH inférieur au point de zéro charge (PZC, pH pour lequel les charges de surface sont nulles), la surface de  $\text{TiO}_2$  est chargée positivement, tandis que pour un pH supérieur au PZC, la surface de  $\text{TiO}_2$  est chargée négativement.



Tandis qu'à l'opposé :



Rincon et Pulgarin indiquent également que le  $\text{TiO}_2$  illuminé induit une acidification du pH par l'intermédiaire des réactions suivantes:



<sup>109</sup> Corin N, Backlund P, Wiklund T: **Bacterial growth in humic waters exposed to UV-radiation and simulated sunlight.** *Chemosphere* 1998, **36**(9):1947-1958.

<sup>110</sup> Rincon AG, Pulgarin C: **Effect of pH, inorganic ions, organic matter and  $\text{H}_2\text{O}_2$  on *E.coli* K12 photocatalytic inactivation by  $\text{TiO}_2$ . Implications in solar water disinfection.** *Applied Catalysis B: Environmental* 2004, **51**:283-302.

<sup>111</sup> Alrousan DM, Dunlop PS, McMurray TA, Byrne JA: **Photocatalytic inactivation of *E. coli* in surface water using immobilised nanoparticle  $\text{TiO}_2$  films.** *Water research* 2009, **43**(1):47-54.

<sup>112</sup> Guillard C, Lachheb H, Houas A, Ksibi M, Elaloui E, Herrmann J-M: **Influence of chemical structure of dyes, of pH and of inorganic salts on their photocatalytic degradation by  $\text{TiO}_2$  comparison of the efficiency of powder and supported  $\text{TiO}_2$ .** *Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry* 2003, **158**:27-36.

Théoriquement, une augmentation de pH au dessus de 6,5 (PZC pour le TiO<sub>2</sub> P25 Degussa) devrait diminuer la vitesse d'inactivation en raison de l'augmentation des répulsions électrostatiques entre les cellules d'*E.coli* et les particules de TiO<sub>2</sub> (les 2 entités étant chargées négativement). Cependant ce comportement n'a pas été observé par Cho *et al.*, et ces auteurs indiquent que ces interactions électrostatiques doivent être trop faibles, et que d'autres facteurs doivent être à l'origine de leurs observations.<sup>113</sup>

En revanche, les études réalisées par Rincon et Pulgarin en 2004 ainsi que par Alrouzan *et al.* en 2009, sur la souche d'*E.coli* K12 pour des pH compris entre 4 et 9, ont conclu que le pH n'influencait pas l'efficacité d'inactivation dans cette gamme.<sup>110,111</sup> Des conclusions similaires avaient par ailleurs été obtenues dans l'étude de Watt *et al.*, en 1995, étude réalisée sur le poliovirus 1 et les coliformes pour des pH compris entre 5 et 8.<sup>114</sup> Toutefois, il ne faut pas oublier que surtout pour les bactéries des pH trop éloignés du pH optimal bactérien (5 à 7,5) peuvent influencer négativement le développement microbien.

### **Photocatalyseurs pulvérulents en suspension versus photocatalyseurs supportés**

Lors de la désinfection de l'eau, d'un point de vue réactionnel, il est nécessaire que le photocatalyseur soit en contact avec les microorganismes afin que la génération de ROS en surface du TiO<sub>2</sub> puisse induire une inactivation cellulaire.

Ainsi, la comparaison entre catalyseurs en suspension et catalyseurs supportés a montré que les systèmes avec TiO<sub>2</sub> en suspension sont beaucoup **plus efficaces** pour l'inactivation bactérienne, bien que la séparation nécessaire de l'eau et du catalyseur après le traitement représente un désavantage économique par rapport à l'utilisation d'un catalyseur fixé sur un support.<sup>115</sup>

Cette augmentation d'efficacité d'inactivation lorsque le TiO<sub>2</sub> est en suspension résulte :

- d'une augmentation de la surface géométrique du réacteur accessible à la lumière et aux bactéries
- d'une augmentation de la probabilité de contact entre les réactifs (dans ce cas les bactéries) et le photocatalyseur
- de la pénétration possible des plus petites particules de TiO<sub>2</sub> à l'intérieur de la bactérie, engendrant ainsi des dommages intra-cellulaires.<sup>116</sup>

On peut noter que seul le dernier point est spécifique à la dégradation photocatalytique des microorganismes tandis que les deux premiers s'appliquent également dans le cas de molécules chimiques.

Cette comparaison d'efficacité entre les modes « slurry » ou supporté est également illustrée dans l'article de Ede *et al.*, 2012. Pour le réacteur en mode « slurry », la quantité de TiO<sub>2</sub> P25 Degussa utilisée est de l'ordre de 0,15 g/L et pour le mode supporté, le dépôt est estimé à 1 mg/cm<sup>2</sup>. Des réductions de plus de 99 % de la population initiale d'*E.cloacae* ont été obtenues

<sup>113</sup> Cho M, Chung H, Choi W, Yoon J: **Linear correlation between inactivation of *E.coli* and OH radical concentration in TiO<sub>2</sub> photocatalytic disinfection.** *Water research* 2004, **38**:1069-1077.

<sup>114</sup> Watts RJ, Kong S, Orr MP, Miller GC, Henry BE: **Photocatalytic inactivation of coliform bacteria and viruses in secondary wastewater effluent.** *Water research* 1995, **29**(1):95-100.

<sup>115</sup> Van Grieken R, Marugan J, Sordo C, Pablos C: **Comparison of the photocatalytic disinfection of *E.coli* suspensions in slurry, wall and fixed-bed reactors.** *Catalysis Today* 2009, **144**:48-54

<sup>116</sup> Rincon AG, Pulgarin C: **Photocatalytic inactivation of *E.coli*: effect of (continuous-intermittent) light intensity and of (suspended-fixed) TiO<sub>2</sub> concentration.** *Applied Catalysis B: Environmental* 2003, **44**:263-284.

en mode slurry après 30 min de traitement photocatalytique sous UV-A, tandis que la réduction sur films supportés n'a été que de 87 %.<sup>117</sup>

### **Désinfection de l'eau par irradiation solaire (SODIS : Solar Water Disinfection)**

La désinfection solaire n'est pas une technologie récente : en effet, dès 1877 l'effet bactéricide du soleil a été décrit par Downes et Blunt. Mais ce n'est que plus d'un siècle plus tard que l'on trouve les premières publications relatives à l'utilisation du soleil pour décontaminer l'eau.<sup>118</sup> En 1994, Wegelin *et al.* se sont intéressés à la désinfection solaire de l'eau en étudiant l'effet bactéricide des rayonnements UV-A. Des réductions de l'ordre de 3 log ont été obtenues pour *E.coli*, les bactériophages f2 et les rotavirus avec des énergies incidentes de l'ordre de 2000 kJ/m<sup>2</sup> dans les longueurs d'onde allant de 350 nm à 450 nm (soit environ 555 Wh/m<sup>2</sup>, correspondant à environ 5 h de soleil estival à midi). De même, le traitement thermique de l'eau entre 20°C et 50°C augmente cet effet d'inactivation.<sup>119</sup>

En 1996, Joyce *et al.* mettent en avant que l'augmentation de température *via* la lumière solaire, induirait une inactivation complète de microorganismes tels que les indicateurs fécaux. Cette étude a été menée sur *E.coli* (avec une population initiale de 2.10<sup>6</sup> UFC/mL) contenue dans une bouteille de 2 L d'eau très trouble, exposée pendant 7 h au soleil au Kenya à une température d'au moins 55°C. Dès lors, la mise en évidence de l'effet antibactérien lié à l'utilisation de températures élevées a conduit au développement de systèmes en plastique transparent pour la décontamination de l'eau.<sup>120</sup> L'utilisation de bouteilles en plastique exposées aux rayonnements solaires a notamment contribué à la réduction des épidémies de choléra au Kenya en 1997 et particulièrement chez les jeunes enfants.<sup>121</sup> En 2008, Ubomba-Jaswa *et al.* se sont intéressés à l'inactivation de souches d'*E.coli* K12 dispersées dans de l'eau naturelle contenue dans des tubes en verre (volume total de 2,3 L) exposés aux rayonnements solaires. Les auteurs ont notamment montré que cette inactivation bactérienne (contamination initiale de l'ordre de 10<sup>6</sup> UFC/mL) est fonction de la dose de rayonnement UV avec une dose minimale de 108 kJ/m<sup>2</sup>, et que l'effet biocide observé résulte d'une synergie entre les effets de la température et du rayonnement UV.<sup>122</sup>

<sup>117</sup> Ede S, Hafner L, Dunlop P, Byrne J, Will G: **Photocatalytic Disinfection of Bacterial Pollutants Using Suspended and Immobilized TiO<sub>2</sub> Powders.** *Photochemistry and photobiology* 2012, **88**(3):728-735.

<sup>118</sup> Acra A, Jurdi M, Mu'Allem H, Karahagopian Y, Raffoul Z: **Sunlight as disinfectant.** *Lancet* 1989, **333**(8632):280.

<sup>119</sup> Wegelin M, Canonica S, Mechsner K, Fleischmann T, Pesaro F, Metzler A: **Solar water disinfection: scope of the process and analysis of radiation experiments.** *J water SRT- Aqua* 1994, **43**(3):154-169.

<sup>120</sup> Joyce TM, McGuigan KG, Elmore-Meegan M, Conroy RM: **Inactivation of fecal bacteria in drinking water by solar heating.** *Appl Environ Microbiol* 1996, **62**(2):399-402.

<sup>121</sup> Conroy RM, Meegan ME, Joyce T, McGuigan K, Barnes J: **Solar disinfection of drinking water protects against cholera in children under 6 years of age.** *Archives of disease in childhood* 2001, **85**(4):293-295.

<sup>122</sup> Ubomba-Jaswa E, Navntoft C, Polo-Lopez MI, Fernandez-Ibanez P, McGuigan KG: **Solar disinfection of drinking water (SODIS): an investigation of the effect of UV-A dose on inactivation efficiency.** *Photochem Photobiol Sci* 2009, **8**(5):587-595.

La technique SODIS qui est utilisée à l'heure actuelle quotidiennement par plus de 5 millions de personnes pour la désinfection de l'eau sous rayonnements solaires repose sur l'utilisation de bouteilles en polyéthylène téréphtalate (PET) transparentes aux UV.<sup>123</sup>

Cette technique comporte plusieurs avantages par rapport aux méthodes traditionnelles : coût modéré, durabilité (ou soutenabilité) et absence de post-traitement après la désinfection. Cette méthode est cependant limitée par les faibles volumes traités (de 1,5 L à 2 L par bouteille), ainsi que par la durée du processus.<sup>124</sup> On peut noter que le concept SODIS peut également être décliné sous la forme de sachets en PET pouvant être plus facilement transportables et plus facilement stockables que les bouteilles en plastiques.<sup>125</sup>

La revue de Malato *et al.* résume en 2009 différentes études menées sur la détermination des temps d'exposition nécessaires pour induire une inactivation de 4-5 log selon la nature des microorganismes testés sous une irradiance de l'ordre de 1000 W/m<sup>2</sup> (tableau 12).<sup>126</sup>

**Tableau 12 Temps d'inactivation des microorganismes à l'aide de la technique SODIS pour obtenir une réduction d'environ 4-5 log, adapté de**<sup>126</sup>

Microorganisme	Temps d'inactivation sous une irradiance d'environ 1000 W/m <sup>2</sup>
Spores de <i>B.subtilis</i>	Pas d'inactivation après 8 h
<i>Y.enterocolitica</i>	3 h
<i>E.coli</i> enteropathogène	1,5 h
<i>S.epidermidis</i>	35 min
<i>C.jejuni</i>	20 min <sup>127</sup>
<i>E.coli</i> DH5 $\alpha$	2,5 h
<i>P.aeruginosa</i>	2 h
<i>C.albicans</i>	6 h <sup>128</sup>

L'article de Gelover *et al.* montre que la technique SODIS (en bouteille PET) utilisée pour une eau contaminée entraîne après une exposition de 60 min au rayonnement solaire (irradiance de plus de 1000 W/m<sup>2</sup>) la non-détection de certains microorganismes dont les coliformes. Cependant un ou deux jours après l'exposition une recroissance bactérienne a été constatée. De ce fait, les auteurs suggèrent que les rayonnements UV ont créé un stress mais que les microorganismes ont pu réparer ces lésions créées grâce aux divers systèmes de réparation dont ils sont équipés. A l'inverse, un effet bactéricide a été observé lorsque des

<sup>123</sup> McGuigan KG, Conroy RM, Mosler HJ, du Preez M, Ubomba-Jaswa E, Fernandez-Ibanez P: **Solar water disinfection (SODIS): a review from bench-top to roof-top.** *Journal of hazardous materials* 2012, **235-236**:29-46.

<sup>124</sup> Polo-Lopez MI, Fernandez-Ibanez P, Ubomba-Jaswa E, Navntoft C, Garcia-Fernandez I, Dunlop PS, Schmid M, Byrne JA, McGuigan KG: **Elimination of water pathogens with solar radiation using an automated sequential batch CPC reactor.** *Journal of hazardous materials*, **196**:16-21.

<sup>125</sup> Lawand TA, Ayoub J, Gichenje H: **Solar disinfection of water using transparent plastic bags.** *RERIC International Energy Journal* 1997, **19**(1):37-44.

<sup>126</sup> Malato S, Fernandez-Ibanez P, Maldonado MI, Blanco J, Gernjak W: **Decontamination and disinfection of water by solar photocatalysis: recent overview and trends.** *Catalysis Today* 2009, **147**:1 - 59.

<sup>127</sup> Boyle M, Sichel C, Fernandez-Ibanez P, Arias-Quiroz GB, Iriarte-Puna M, Mercado A, Ubomba-Jaswa E, McGuigan KG: **Bactericidal effect of solar water disinfection under real sunlight conditions.** *Appl Environ Microbiol* 2008, **74**(10):2997-3001.

<sup>128</sup> Lonnen J, Kilvington S, Kehoe SC, Al-Touati F, McGuigan KG: **Solar and photocatalytic disinfection of protozoan, fungal and bacterial microbes in drinking water.** *Water research* 2005, **39**(5):877-883.

cylindres en Pyrex recouverts de TiO<sub>2</sub> sol-gel ont été introduits dans la bouteille exposée au rayonnement solaire et il n'a pas été constaté de recroissance bactérienne 7 jours après le traitement photocatalytique. Par ailleurs dans ce cas, le temps d'inactivation a été réduit significativement, de 60 min à 15 min.<sup>129</sup>

C'est pourquoi, afin de diminuer le temps d'inactivation et d'éviter ces phénomènes de recroissance bactérienne, TiO<sub>2</sub> peut être immobilisé sous forme de film mince sur la surface interne des bouteilles de PET, et les bouteilles en PET imprégnées de TiO<sub>2</sub> sont assimilées à des réacteurs photocatalytiques efficaces pour la désinfection de l'eau.<sup>123</sup>

### **Limites de l'utilisation des nanotechnologies telles que la photocatalyse pour le traitement de l'eau**

Plusieurs problématiques sont cependant soulevées quand à l'utilisation des nanotechnologies/nanoparticules pour le traitement de l'eau notamment en ce qui concerne la rétention/la fixation de ces nanomatériaux sur une surface. Du fait de leur petite taille et du manque de recul sur leur potentiel impact sur la santé humaine et sur l'environnement, il est primordial que ces nanoparticules soient fixées. Des progrès doivent donc être réalisés afin d'améliorer l'accroche du catalyseur sur un support.<sup>130</sup>

### **3.2. Désinfection de l'air par photocatalyse**

La majorité des purificateurs d'air développés sont des dispositifs basés sur les technologies de filtration et d'adsorption pour l'élimination des particules aéroportées, des bioaérosols et des mauvaises odeurs. La photocatalyse hétérogène sous illumination UV-A est néanmoins une technologie prometteuse pour la désinfection/décontamination de l'air, notamment en raison de sa soutenabilité et de son action globale, à la fois pour l'élimination des molécules chimiques (COVs,...) et des cibles biologiques aéroportées (bactéries, virus, spores). Malgré l'impact important en termes de santé publique, les travaux sur la désinfection des bioaérosols par photocatalyse sont nettement moins nombreux que ceux réalisés en phase liquide ou sur des surfaces, probablement en raison de la complexité de travailler avec des bioaérosols, qui combinent les difficultés liées à différents domaines.

Les premiers travaux dans le domaine de la désinfection de l'air intérieur par photocatalyse datent de 1997.<sup>131</sup> Goswami *et al.* ont ainsi mis au point un système photocatalytique (TiO<sub>2</sub>/UV-A) permettant d'obtenir une destruction de *Serratia marcescens* en 600 min de recirculation. En 1999, la durée de traitement a été réduite à moins de 3 min grâce à une amélioration du design du réacteur photocatalytique.<sup>132,133</sup> En 2002, Greist *et al.* se sont

<sup>129</sup> Gelover S, Gomez LA, Reyes K, Leal MT: **A practical demonstration of water disinfection using TiO<sub>2</sub> films and sunlight.** *Water research* 2006, **40**:3274-3280.

<sup>130</sup> Li Q, Mahendra S, Lyon DY, Brunet L, Liga MV, Li D, Alvarez PJ: **Antimicrobial nanomaterials for water disinfection and microbial control: potential applications and implications.** *Water research* 2008, **42**(18):4591-4602.

<sup>131</sup> Goswami DY, Trivedi D, Block SS: **Photocatalytic disinfection of indoor air.** *Journal of Solar Energy Engineering* 1997, **119**(1):92-96.

<sup>132</sup> Goswami TK, Hingorani S, Greist H, Goswami DY, Block SS: **Photocatalytic system to destroy bioaerosols in air.** *Journal of Advanced Oxidative Technology* 1999, **4**(2):185-188.

<sup>133</sup> Goswami DY, Vijayaraghavan S, Lu SY, Tamm G: **New and emerging developments in solar energy.** *Solar energy* 2004, **76**:33-43.

intéressés à l'activité photocatalytique envers les spores de *B.subtilis*, simulant de *B.anthraxis*, en réalisant notamment une étude en microscopie électronique à balayage afin de suivre le processus de destruction cellulaire.<sup>134</sup> On peut également citer les travaux de Vohra *et al* sur la promotion du photocatalyseur TiO<sub>2</sub> par des ions argents avec comme cibles *B.cereus*, *S.aureus*, *E.coli*, *A.brasiliensis* et les bactériophages MS2.<sup>135</sup>

Dès 2005, le LMSPC a étudié le traitement par photocatalyse UV-A de bioaérosols d'*E.coli* dans un réacteur mono-passage de type « colonne vigreux »,<sup>136</sup> puis de *L.pneumophila*, pathogène fréquemment retrouvé dans l'air des tours aérorefrigérantes, dans un réacteur dit « réacteur tangentiel » fonctionnant en mode mono-passage et développé avec la société Recyclanet/Biowind.<sup>137</sup> Ces travaux se sont poursuivis en 2010 avec la détermination en mode de recirculation à un débit de 140 m<sup>3</sup>/h des constantes de temps apparentes lors de la décontamination de bioaérosols de *L.pneumophila*, de virus bactériophage T2 et de spores de *B.atropheus*, respectivement à 17 min, 24 min et 57 min. L'importance des considérations aérodynamiques en décontamination de l'air a été proposée pour expliquer cet ordre de sensibilité, les agents microbiologiques se différenciant des molécules chimiques par leur masse non nulle.<sup>138</sup> Enfin, *L.pneumophila* a été utilisée comme bactérie modèle pour l'élaboration d'un média photocatalytique permettant le fonctionnement des réacteurs photocatalytiques en mode traversant, et consistant en une structure tridimensionnelle de type mousse alvéolaire solide en polyuréthane utilisée après passivation comme support de nanoparticules de TiO<sub>2</sub> P25.<sup>139,140</sup>

D'autres réacteurs annulaires composés de TiO<sub>2</sub> déposé sur des filtres en fibres de verre, fonctionnant en flux continu, ont été testés pour leur capacité à inactiver la souche d'*E.coli* K12, le suivi de l'inactivation étant réalisé par impactage des microorganismes sur milieux gélosés. L'influence de différents paramètres opératoires a été étudiée, comme l'intensité de rayonnement UV-A (0,5 à 3,4 mW/cm<sup>2</sup>), le taux d'humidité relative (de 51 à 85 %) et la charge du dépôt en TiO<sub>2</sub> (960 et 1516 mg/cm<sup>2</sup>). Il a ainsi été montré qu'après 15 min de traitement avec une irradiance UV-A de 3,4 mW/cm<sup>2</sup>, il était possible de traiter environ 1,1 L/min de volume d'air avec un temps de résidence de l'ordre de 1 min, avec une inactivation complète du bioaérosol.<sup>141</sup>

<sup>134</sup> Greist HT, Hingorani SK, Kelley K, Goswami DY: **Using scanning electron microscopy to visualize photocatalytic mineralization of airborne microorganisms**. In: *9th international conference of indoor air quality and climate 2002; Monterey, California*; 2002: 712-717.

<sup>135</sup> Vohra A, Goswami DY, Deshpandes DA, Block SS: **Enhanced photocatalytic disinfection of indoor air**. *Applied Catalysis B: Environmental* 2006, **65**:57-65.

<sup>136</sup> Keller V, Keller N, Ledoux MJ, Lett MC: **Biological agent inactivation in a flowing air stream by photocatalysis**. *Chemical communications* 2005(23):2918-2920.

<sup>137</sup> Josset S, Taranto J, Keller N, Keller V, Lett MC, Ledoux MJ, Bonnet V, Rougeau S: **UV-A photocatalytic treatment of high flow rate air contaminated with Legionella pneumophila**. *Catalysis Today* 2007, **129**:215-222.

<sup>138</sup> Josset S, Taranto J, Keller N, Keller V, Lett MC: **Photocatalytic treatment of bioaerosols: impact of the reactor design**. *Environmental science & technology* 2010, **44**(7):2605-2611.

<sup>139</sup> Josset S, Hajiesmaili S, Begin D, Edouard D, Pham-Huu C, Lett MC, Keller N, Keller V: **UV-A photocatalytic treatment of Legionella pneumophila bacteria contaminated airflows through three-dimensional solid foam structured photocatalytic reactors**. *Journal of hazardous materials* 2010, **175**(1-3):372-381.

<sup>140</sup> Josset S: **Décontamination photocatalytique d'un bioaérosol contaminé par Legionella pneumophila et autres agents biologiques**. Thèse de l'Université de Strasbourg, 2008.

<sup>141</sup> Pal A, Pehkonen SO, Yu LE, Ray MB: **Photocatalytic inactivation of airborne bacteria in a continuous-flow reactor**. *Industrial and Engineering Chemistry Research* 2008, **47**(20):7580-7585.

Face à l'épizootie d'influenza aviaire en 2008, l'équipe de photocatalyse de l'Ircelyon a testé un prototype d'épurateur d'air photocatalytique développé par la société Buxair pour l'élimination du virus A/H5N2 comme modèle de la souche pathogène A/H5N1. Ce système était composé d'une source UV-C et d'un média photocatalytique développé avec la société Ahlstrom. Une réduction de  $10^{3.2}$  UFC/mL a été obtenue en mode mono-passage avec un débit d'air de  $40 \text{ m}^3/\text{h}$ .<sup>142</sup>

Plus récemment, en 2011, Yao et Yeung ont développé des prototypes de purificateurs d'air intérieur fonctionnant sous UV et dans lesquels des plaques d'acier inoxydable servent de support à  $\text{TiO}_2$ . La contamination en bactéries (*Micrococcus* sp, *S.epidermidis*) et en champignons (*Penicillium* sp) était de l'ordre de  $800 \text{ UFC}/\text{m}^3$  (tests réalisés dans une pièce avec une contamination naturelle), et des réductions de 36 % de la contamination ont été obtenues pour les bactéries et 60 % pour les champignons, pour un débit de  $28,3 \text{ L}/\text{min}$  pendant 10 min.<sup>143</sup>

Les travaux de thèse de M. Faure ont notamment montré que des dispositifs photocatalytiques conçus et optimisés pour la dégradation de polluants, comme l'éthanol, ne sont pas forcément adéquats pour l'élimination d'un bioaérosol bactérien (comme dans le cas d'*E.coli*). En effet, les bactéries contrairement aux polluants chimiques, ne possèdent pas de propriétés diffusives. Partant de ce constat, elle a étudié des réacteurs photocatalytiques en flux traversant avec rétention des microorganismes sur filtres. De ce fait, différents supports photocatalytiques ont été testés [un support commercial Ahlstrom et des filtres en fibres de Quartz (modèle QMA) soient imprégnées soient mises en suspension avec du  $\text{TiO}_2$  (P25 ou PC 500)] et placés perpendiculairement par rapport au flux à traiter dans des réacteurs batchs équipés d'une lampe UV-A. Au vu des résultats d'efficacité de filtration obtenus, les fibres de Quartz constitueraient un support de choix pour ce type de réacteur dans l'optique d'une purification de l'air ambiant.<sup>144</sup>

Dernièrement, Guillard *et al.* ont comparé l'efficacité d'inactivation des spores d'*A.brasiliensis* pour trois filtres non tissés composés de polyester et de cellulose commercialisés par la société Ahlstrom. Deux des filtres incorporent une couche interne de charbon actif localisée entre deux couches de fibres non tissées, tandis que le troisième qui est plus fin n'en contenait pas. Un des deux filtres contenant du charbon actif et le troisième exempt de charbon actif sont enduits d'une couche de  $\text{TiO}_2$  PC 500. Deux types de rayonnement UV ont été testés : les rayonnements UV-A (irradiance de  $3,6 \text{ mW}/\text{cm}^2$ ) et les rayonnements UV- C (irradiance de  $3,35 \text{ mW}/\text{cm}^2$ ). Les meilleurs résultats d'inactivation et d'incapacité des spores à germer ont été obtenus pour les filtres photocatalytiques exempts de

<sup>142</sup> Guillard C, Bui T-H, Felix C, Moules V, Lina B, Lejeune P: **Microbiological disinfection of water and air by photocatalysis**. *CR Chimie* 2008, **11**:107-113.

<sup>143</sup> Yao N, Yeung KL: **Investigation of the performance of  $\text{TiO}_2$  photocatalytic coatings**. *Chemical engineering journal* 2011, **167**:13-21.

<sup>144</sup> Faure M: **Purification de l'air ambiant par l'action bactericide de la photocatalyse**. Thèse de l'Université de Nancy; 2010.

charbon actif tandis qu'il s'avèrerait que la présence de charbon actif dans les filtres induirait la persistance de ces spores à l'intérieur de la couche interne épaisse de charbon actif.<sup>145</sup>

### 3.3. Décontamination des surfaces par photocatalyse

#### Les surfaces auto-décontaminantes

Le TiO<sub>2</sub> est utilisé depuis plusieurs années dans la construction et l'aménagement urbain (vitres auto-nettoyantes, enduits de façades, béton, dalles céramiques, peintures...).<sup>146</sup> Développées entre autre pour leurs propriétés auto-nettoyantes, les surfaces photocatalytiques superhydrophiles permettent un entraînement des salissures et facilitent ainsi leur nettoyabilité. En plus de leur activité auto-nettoyante, les matériaux photocatalytiques ont été optimisés pour leur pouvoir antibactérien.

#### ✓ Les matériaux

Ainsi dès 1992, Watanabe, Hashimoto et Fujishima ont été les premiers à démontrer ce concept de surfaces auto-nettoyantes sur du carrelage en céramique recouvert de TiO<sub>2</sub>.<sup>147</sup> En 1998, Jacoby *et al* ont travaillé sur un dépôt de TiO<sub>2</sub> sur du verre : ils ont observé à l'aide de différentes techniques (MEB, marquage au <sup>14</sup>C et suivi de l'évolution du CO<sub>2</sub> en réacteur batch) une destruction et une minéralisation d'*E.coli*.<sup>148</sup> Similairement, du plexiglas transparent aux UV-A avec dépôt de TiO<sub>2</sub> P25 a permis d'obtenir en 60 min d'irradiation UV-A, une réduction de 3 à 6 log pour *E.coli*, *P.aeruginosa*, *S.aureus* et *E.faecium*, et une réduction de 2 log pour *C.albicans*.<sup>149</sup>

Plus récemment, Yao et Yeung ont synthétisé du TiO<sub>2</sub> qu'ils ont déposé sur de l'acier inoxydable et des plaques d'aluminium, dont les performances photocatalytiques envers différents microorganismes ont été évaluées avec un dépôt initial de 10<sup>4</sup> UFC/mL pour les bactéries (*B.cereus*, *B.subtilis*, *E.coli*, *P.aeruginosa*, *S.marcescens* et *S.epidermidis*) et le champignon (*A.brasiliensis*) et de 10<sup>3</sup> UFC/mL pour les phages T2 d'*E.coli*. Avec une dose d'UV-A totale de 5 J/cm<sup>2</sup> des réductions de plus de 98 %, 84 % et 99,9 % ont été obtenues respectivement pour les bactéries, *A.brasiliensis* et les phages.<sup>143</sup>

En 2012, des dépôts de TiO<sub>2</sub> par spin-coating sur du verre (TiO<sub>2</sub> présentant une surface spécifique de l'ordre de 300 m<sup>2</sup>/g) ont été testés pour l'inactivation du virus de la grippe. La

<sup>145</sup> Pigeot-Remy S, Real P, Simonet F, Hernandez C, Vallet C, Lazzaroni JC, Vacher S, Guillard C: **Inactivation of *Aspergillus niger* spores from indoor air by photocatalytic fibers.** *Applied Catalysis B: Environmental* 2013, **134-135**:167-173.

<sup>146</sup> Chen J, Poon C-S: **Photocatalytic construction and building materials: From fundamentals to applications.** *Building and Environment* 2009, **44**:1899-1906.

<sup>147</sup> Watanabe T, Hashimoto K, Fujishima A: In: *1st International conference on TiO<sub>2</sub> photocatalytic purification and treatment of water and air: 1992; 1992.*

<sup>148</sup> Jacoby W, Maness P-C, Wolfrum E, Blake D, Fennell JA: **Mineralization of bacterial cell mass on a photocatalytic surface in air.** *Environmental Science and Technology* 1998, **32**(17):2650-2653.

<sup>149</sup> Kuhn KP, Chaberny IF, Massholder K, Stickler M, Benz VW, Sonntag HG, Erdinger L: **Disinfection of surfaces by photocatalytic oxidation with titanium dioxide and UVA light.** *Chemosphere* 2003, **53**(1):71-77.

réduction virale a été environ de 4 log pour 16 h de rayonnement même en présence d'une faible irradiance UV-A (0,01 mW/cm<sup>2</sup>).<sup>150</sup>

✓ Les peintures

Le dioxyde de titane est utilisé pour son opacité et sa blancheur dans de nombreux produits et formulations (peintures, plastiques, papier...). Pour ses propriétés uniquement blanchissantes, il est nécessaire d'intégrer à la peinture un TiO<sub>2</sub> non photocatalytique qui ne dégrade pas les autres composants contenus dans la peinture. Récemment, les industriels se sont tournés vers l'élaboration de peinture aux propriétés auto-nettoyantes mais aussi antimicrobiennes. Dans le but de protéger le TiO<sub>2</sub> et ainsi la décomposition du média, des espaceurs tels que l'apatite peuvent être utilisés.<sup>151</sup> Ce type de peinture permettrait ainsi de contrôler le développement microbien des surfaces, tel que par exemple en chambres opératoires.<sup>152</sup> Néanmoins, même si certains produits commerciaux existent, la formulation et la mise en œuvre de peintures photocatalytiques (antimicrobiennes) stables et réellement efficaces nécessitent encore aujourd'hui des études en laboratoire et un transfert de technologie vers l'industrie.

✓ L'amélioration des propriétés antibactériennes des surfaces par modification du TiO<sub>2</sub>

• Les ions argent

Les ions argent sont connus pour posséder des propriétés antimicrobiennes<sup>153</sup> permettant ainsi d'améliorer l'efficacité d'inactivation, comme cela a été montré sur *E.coli* en phase liquide dans des systèmes Ag/TiO<sub>2</sub> activés sous rayonnement UV.<sup>154</sup> Citons par exemple le cas de substrats en aluminium et en polyester recouverts de TiO<sub>2</sub> modifié à Ag qui développent sous rayonnement UV-A une activité antimicrobienne de sorte qu'une irradiance de l'ordre de 50 W/m<sup>2</sup> permette l'inactivation des spores de *B.cereus*. Une destruction totale des spores contre seulement 80 % pour TiO<sub>2</sub> non modifié a été obtenue après 4 h d'irradiance.<sup>155</sup>

<sup>150</sup> Nakano R, Ishiguro H, Yao Y, Kajioka J, Fujishima A, Sunada K, Minoshima M, Hashimoto K, Kubota Y: **Photocatalytic inactivation of influenza virus by titanium dioxide thin film.** *Photochem Photobiol Sci* 2012, **11**(8):1293-1298.

<sup>151</sup> Nonami T, Hase H, Funakoshi K: **Apatite-coated titanium dioxide photocatalyst for air purification.** *Catalysis Today* 2004, **96**(3):113-118.

<sup>152</sup> Sousa V, Manaia C, Mendes A, Nunes O: **Photoinactivation of various antibiotic resistant strains of *Escherichia coli* using a paint coat.** *Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry* 2013, **251**:148-153.

<sup>153</sup> Radzig MA, Nadtochenko VA, Koksharova OA, Kiwi J, Liposava VA, Khmel IA: **Antibacterial effects of silver nanoparticles on gram-negative bacteria: influence on the growth and biofilms formation, mechanisms of action.** *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* 2013, **102**:300-306.

<sup>154</sup> Sökmen M, Candan F, Sümer Z: **Disinfection of *E.coli* by the Ag-TiO<sub>2</sub>/UV system: lipidperoxidation.** *Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry* 2001, **143**(2-3):241-244.

<sup>155</sup> Vohra A, Goswami DY, Deshpande DA, Block SS: **Enhanced photocatalytic inactivation of bacterial spores on surfaces in air.** *Journal of industrial microbiology & biotechnology* 2005, **32**(8):364-370.

- **Les ions cuivre**

Tout comme les ions argent, les ions cuivre présentent aussi des propriétés antimicrobiennes.<sup>156</sup> En coopération avec TOTO Ltd, Fujishima *et al.* ont développé dès 1995 des carrelages avec des revêtements composites TiO<sub>2</sub>-Cu, au sein desquels le cuivre est présent sous forme métallique (Cu<sup>0</sup>) et de cuivre Cu<sup>+</sup> et Cu<sup>2+</sup>.<sup>157</sup> Ces types de revêtement sont à l'heure actuelle commercialisés au Japon pour les hôpitaux, les hôtels ou les restaurants...

L'action synergique de la photocatalyse et de la présence d'ions cuivre dans des systèmes couplés Cu-TiO<sub>2</sub> a été par ailleurs mise en évidence lors d'une étude avec différentes souches d'*E.coli*, dont des souches résistantes au cuivre. Avec une irradiance relativement faible de 1 μW/cm<sup>2</sup> (correspondant à l'intensité UV typique de la lumière intérieure), une réduction d'un peu plus d'1 log a été observée après 4 h de rayonnement pour la souche résistante au cuivre et après 60 min pour la souche non résistante.<sup>158</sup>

### **3.4. Décontamination des surfaces : cas spécifique des textiles fonctionnalisés aux propriétés auto-décontaminantes**

En premier lieu, les fibres naturelles ou synthétiques peuvent être dégradées par le développement de bactéries ou de moisissures.<sup>159</sup> Les métabolites peuvent produire des odeurs mais aussi des produits intermédiaires, pouvant être irritants pour la peau. Mais plus encore, au cours des dernières années, l'intérêt d'utiliser des textiles aux propriétés bactéricides, anti-virales et fongicides a augmenté. Les textiles photo-actifs recouverts de TiO<sub>2</sub> présentent non seulement des propriétés auto-nettoyantes, mais peuvent aussi développer des propriétés bactéricides.

#### **Les méthodes d'immobilisation du TiO<sub>2</sub> sur les fibres textiles**

Différentes techniques peuvent être mises en oeuvre afin d'immobiliser un photocatalyseur sur des fibres textiles. Nous distinguerons ici les techniques usuellement développées en industrie de celles utilisées ou en phase d'optimisation à l'échelle du laboratoire.

Dans l'industrie, les principales techniques utilisées pour l'ennoblissement textile peuvent être adaptées pour déposer TiO<sub>2</sub> sur les textiles sont :

- le foulardage, qui consiste à faire passer le tissu en continu dans un récipient contenant la solution ou la dispersion à déposer. Le tissu est ensuite essoré entre deux rouleaux pour éliminer l'excès de liquide puis subir un traitement thermique afin de le sécher (figure 10)
- l'enduction, qui consiste à réaliser une dispersion de TiO<sub>2</sub> épaisse puis à l'appliquer sur le textile au travers d'un rouleau mille points (figure 11).

<sup>156</sup> Faundez G, Troncoso M, Navarrete P, Figueroa G: **Antimicrobial activity of copper surfaces against suspensions of *Salmonella enterica* and *Campylobacter jejuni***. *BMC microbiology* 2004, 4:1-17.

<sup>157</sup> Hashimoto K, Irie H, Fujishima A: **TiO<sub>2</sub> photocatalysis: a historical overview and future prospects**. *Japanese journal of applied physics* 2005, 44(12):8269-8285.

<sup>158</sup> Sunada K, Watanabe T, Hashimoto K: **Bactericidal activity of copper-deposited TiO<sub>2</sub> thin film under weak UV light illumination**. *Environmental science & technology* 2003, 37(20):4785-4789.

<sup>159</sup> Pekhtasheva E, Neverov A, Kubica S, Zaikov G: **Biodegradation and biodeterioration of some natural polymers**. *Chemistry and chemical technology* 2012, 6(3):263-280.

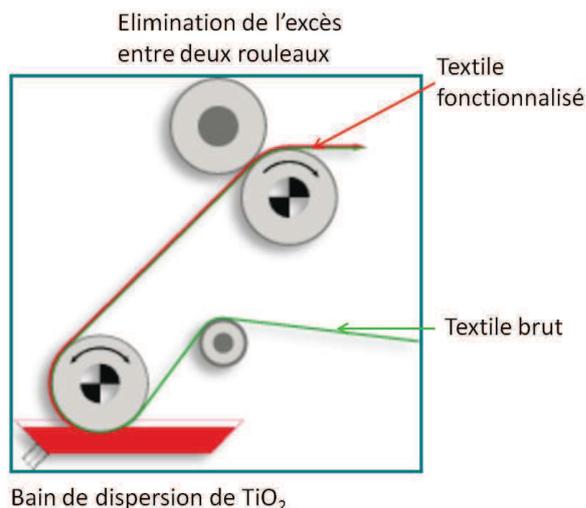


Figure 10 Schéma de la technique de foulardage : passage en continu du textile dans un récipient contenant la suspension de  $\text{TiO}_2$ , adapté de <sup>160</sup>

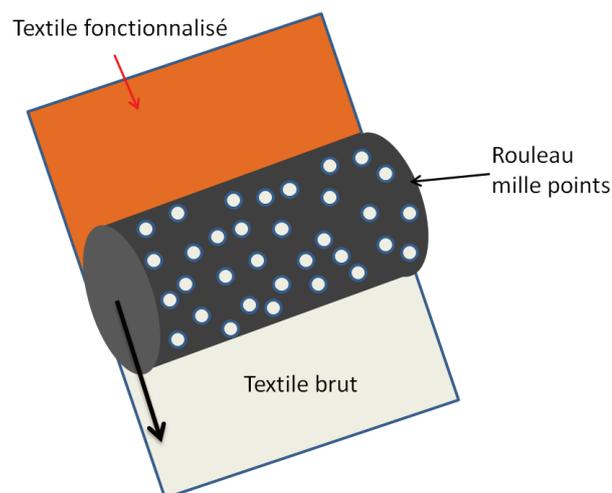


Figure 11 Schéma de la technique d'enduction : réalisation d'une dispersion de  $\text{TiO}_2$  épaisse et application d'un rouleau multipoints

En laboratoire, d'autres techniques, à différents stades de recherche et de développement peuvent être mises en oeuvre, dont les principales sont :

- le dip coating, ou méthode par trempage, qui consiste à immerger le textile dans la suspension de  $\text{TiO}_2$  ou dans une solution de précurseurs de  $\text{TiO}_2$  <sup>161,162,163</sup>
- la méthode par spray ou pulvérisation, qui consiste à pulvériser la suspension de  $\text{TiO}_2$  à l'aide d'un pistolet à peinture ou d'une bombe sous pression
- la technique Layer by Layer (LbL), ou technique de dépôt « couche par couche » ou « multi-couches » qui consiste à réaliser des revêtements nanométriques par l'adsorption successive de couches de polyions alternativement chargés (polycations et polyanions).<sup>164</sup> Pour le dépôt de polyélectrolytes, deux voies de dépôt peuvent être utilisées, par trempage (figure 12) ou par pulvérisation (figure 13).<sup>165</sup> Cette technique LbL par spray a notamment été utilisée pour le dépôt de nanotubes de titanates en alternance avec une couche de polyéthylèneimine (PEI) par Grandcolas *et al.* pour la destruction d'agents chimiques de guerre par photocatalyse.<sup>166</sup>

<sup>160</sup> [http://www.coatema.de/ger/lab\\_solutions/auftragssysteme/dipping\\_system.php](http://www.coatema.de/ger/lab_solutions/auftragssysteme/dipping_system.php) consulté le 19 avril 2013.

<sup>161</sup> Qi K, Xin JH, Daoud WA, Mak CL: **Functionalizing polyester fiber with a self-cleaning property using anatase  $\text{TiO}_2$  and low-temperature plasma treatment.** *Applied Ceramic Technology* 2007, 4(6):554-563.

<sup>162</sup> Grandcolas M: **Étude de matériaux et textiles à base de dioxyde de titane pour la dégradation photocatalytique d'agents chimiques.** Thèse de l'Université de Strasbourg, 2009.

<sup>163</sup> Kangwansupamonkon W, Lauruengtana V, Surassmo S, Ruktanonchai U: **Antibacterial effect of apatite-coated titanium dioxide for textiles applications.** *Nanomedicine : nanotechnology, biology, and medicine* 2009, 5(2):240-249.

<sup>164</sup> Decher G: **Fuzzy nanoassemblies: toward layered polymeric multicomposites.** *Science* 1997, 277(5330):1232-1237.

<sup>165</sup> Izquierdo A, Ono SS, Voegel JC, Schaaf P, Decher G: **Dipping versus spraying: Exploring the deposition conditions for speeding up Layer-by-Layer assembly.** *Langmuir* 2005,21:7558-7567.

<sup>166</sup> Grandcolas M, Sinault L, Mosset F, Louvet A, Keller N, Keller V: **Self-decontaminating layer-by-layer functionalized textiles based on  $\text{WO}_3$ -modified titanate nanotubes. Application to the solar photocatalytic removal of chemical warfare agents.** *Applied Catalysis A: General* 2011, 391:455-467.

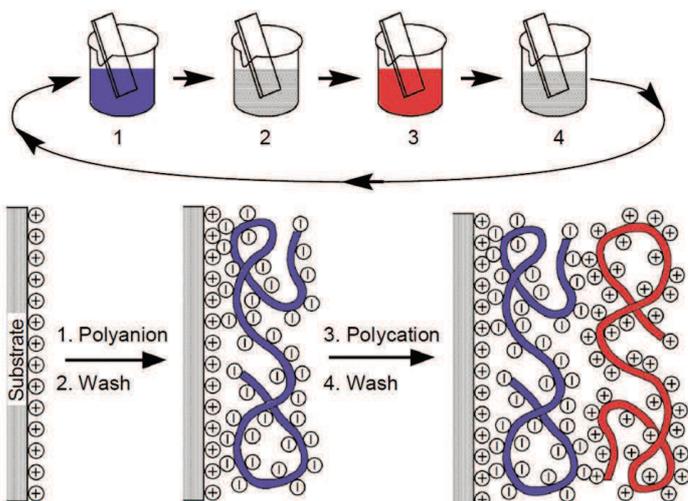


Figure 12 Principe de la construction d'un film sur un support par la méthode couche par couche avec trempage dans différentes solutions de polyelectrolytes<sup>167</sup>

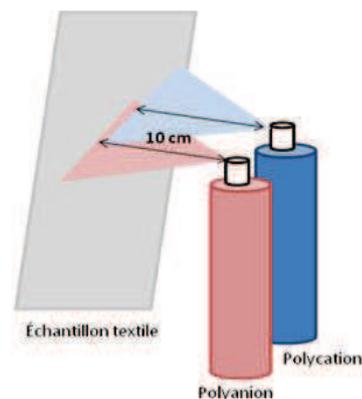


Figure 13 Technique de nébulisation de polyelectrolytes sur un substrat plan vertical<sup>168</sup>

On peut noter que de manière générale l'immobilisation de  $\text{TiO}_2$  peut concerner le dépôt de  $\text{TiO}_2$  déjà cristallisé (qu'il soit commercial ou non) ou celui de précurseurs de  $\text{TiO}_2$  qui nécessitent alors une étape de cristallisation dans des conditions opératoires que le textile doit être à même de supporter.

### Les méthodes de prétraitement des fibres textiles

Ces différentes techniques de dépôt de  $\text{TiO}_2$  sur textiles peuvent s'effectuer soit sur fibres vierges, soit sur fibres prétraitées dans le but notamment d'améliorer l'accroche du photocatalyseur ou sa densité sur le support (étant donné que de nombreux textiles comme les polyesters, les polyamides ou le polypropylène sont de nature hydrophobe). Différents types de prétraitement des fibres existent comme :

- l'ajout d'espaceurs chimiques. Dans cette technique, les particules de  $\text{TiO}_2$  sont attachées au textile grâce à la mise en œuvre de réactions chimiques en surface des fibres, comme l'estérification. Une étude réalisée par Meilert *et al.* utilise ces espaceurs entre des fibres de coton et des particules de  $\text{TiO}_2$ . Afin d'attacher les particules de  $\text{TiO}_2$  aux fibres, ils ont eu recours à une estérification, créant ainsi des liaisons covalentes entre l'espaceur et la surface des fibres de coton, tandis que le  $\text{TiO}_2$  est ancré à l'espaceur par le biais d'interactions électrostatiques.<sup>169</sup>
- les traitements plasma (Radio Fréquence ou Micro-onde ou UV sous vide) qui consistent à créer des groupements fonctionnels chargés négativement ( $-\text{COO}^-$ ,  $-\text{O}-\text{O}^-$ ) à la surface des fibres permettant d'augmenter l'hydrophilie du tissu et de favoriser

<sup>167</sup> Decher G: **Fuzzy nanoassemblies: toward layered polymeric multicomposites.** *Science* 1997, **277**(5330):1232-1237.

<sup>168</sup> Porcel C: **Etude de la construction de films de polyelectrolytes par nébulisation.** Thèse de l'Université de Strasbourg, 2006.

<sup>169</sup> Meilert KT, Laub D, Kiwi J: **Photocatalytic self-cleaning of modified cotton textiles by  $\text{TiO}_2$  clusters attached by chemical spacers.** *Journal of molecular catalysis A:chemical* 2005, **237**(1-2):101-108.

l'accroche du TiO<sub>2</sub> *via* des interactions électrostatiques avec les sites Ti<sup>4+</sup> du TiO<sub>2</sub>.<sup>170</sup>  
171,172,173,174,175

- les traitements enzymatiques (protéases, lipases...) qui conduisent à l'hydrolyse de la surface des textiles (comme la laine, le polyester...), ce qui permet une augmentation du nombre de groupements fonctionnels (comme les groupements carboxyliques).<sup>176</sup>
- le prétraitement au KOH. Ce type de prétraitement a une double action : une action **physique**, avec l'augmentation de la rugosité des fibres, ainsi qu'une action **chimique**, avec l'hydrolyse partielle des liaisons esters du polyester, ce qui crée ainsi plus de charges en surface.

### **Etudes relatives à l'utilisation de textiles photo-actifs aux propriétés antibactériennes**

Dès 2005, Kiwi et ses collaborateurs se sont intéressés au développement de textiles autonettoyants avec dépôt de TiO<sub>2</sub> *via* un prétraitement par RF-plasma ou par UV-C sous vide.<sup>171</sup>

On peut noter les travaux de Kangwansupamonkon *et al.* qui ont mis en évidence l'activité photocatalytique bactéricide envers *S.aureus*, *E.coli*, SARM et *M. luteus*, de textiles en coton (fibres cellulosiques) sur lesquels est fixé par immersion un composite TiO<sub>2</sub>/apatite.<sup>177</sup> Une activité bactéricide sur *S.aureus* a aussi été mesurée par Daoud *et al.* sur des fibres de cellulose recouvertes de TiO<sub>2</sub>.<sup>178</sup> L'activité antibactérienne la plus élevée a été obtenue sous lumière UV par rapport aux résultats enregistrés sous lumière visible ou à l'obscurité.

Plus récemment, d'autres équipes ont réalisé un dépôt de dioxyde de titane par ultrasons sur des tissus en coton. Ces textiles ont présentés une activité antimicrobienne vis-à-vis d'*E.coli*, *S.aureus* et *C.albicans* avec un dépôt de l'ordre de 10<sup>7</sup> UFC/mL. Après 3 h d'éclairage sous irradiation UV-A (irradiance de 6 mW/cm<sup>2</sup>), une réduction de 100 % a été obtenue pour *S.aureus*, 30 % pour *E.coli* et 70 % pour *C.albicans* si on tient compte des textiles optimisés

<sup>170</sup> Bozzi A, Yuranova T, Kiwi J: **Self-cleaning of wool-polyamide and polyester textiles by TiO<sub>2</sub>-rutile modification under daylight irradiation at ambient temperature.** *Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry* 2005, **172**:27-34.

<sup>171</sup> Bozzi A, Yuranova T, Guasaquillo I, Laub D, Kiwi J: **Self-cleaning of modified cotton textiles by TiO<sub>2</sub> at low temperatures under daylight irradiation.** *Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry* 2005, **174**:156-164.

<sup>172</sup> Yuranova T, Rincon A-G, Bozzi A, Parra S, Pulgarin C, Albers P, Kiwi J: **Antibacterial textiles prepared by RF-plasma and vacuum-UV mediated deposition of silver.** *Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry* 2003, **161**(1):27-34.

<sup>173</sup> Mihailovic D, Saponjic Z, Molina R, Puac N, Jovancic P, Nedeljkovic J, Radetic M: **Improved properties of oxygen and argon RF plasma-activated polyester fabrics loaded with TiO<sub>2</sub> nanoparticles.** *ACS applied materials & interfaces* 2010, **2**(6):1700-1706.

<sup>174</sup> Kiwi J, Pulgarin C: **Innovative self-cleaning and bactericide textiles.** *Catalysis today* 2010, **151**:2-7.

<sup>175</sup> Qi K, Xin JH, Daoud WA, Mak CL: **Functionalizing polyester fiber with a self-cleaning property using anatase TiO<sub>2</sub> and low-temperature plasma treatment.** *Applied Ceramic Technology* 2007, **4**(6):554-563.

<sup>176</sup> Montazer M, Seifollahzadeh S: **Enhanced self-cleaning, antibacterial and UV protection properties of nano TiO<sub>2</sub> treated textile through enzymatic pretreatment.** *Photochemistry and photobiology* 2011, **87**(4):877-883.

<sup>177</sup> Kangwansupamonkon W, Lauruengtana V, Surassmo S, Ruktanonchai U: **Antibacterial effect of apatite-coated titanium dioxide for textiles applications.** *Nanomedicine : nanotechnology, biology, and medicine* 2009, **5**(2):240-249.

<sup>178</sup> Daoud WA, Xin JH, Zhang Y-H: **Surface functionalization of cellulose fibers with titanium dioxide nanoparticles and their combined bactericidal activities.** *Surface science* 2005, **599**(1-3):69-75.

avec dépôt de phase anatase.<sup>179</sup> De même, des dépôts de nanoparticules de TiO<sub>2</sub>, synthétisées par réduction de tétrachlorure de titane en présence de polyvinylpyrrolidone ont été déposées sur coton et testées pour leur activité antibactérienne sur *S.aureus* et *K.pneumoniae* et ont montrés une activité antibactérienne de 96,6 % pour *S.aureus* et de 95,2 % pour *K.pneumoniae*.<sup>180</sup>

Des textiles ayant été traités avec des enzymes puis trempés dans les solutions de dispersion contenant 0,25 % ou 0,75 % de TiO<sub>2</sub> ont été testés sur *E.coli*, en suivant la norme AATCC Test method 147. Une réduction de la population bactérienne d'*E.coli* de 99 % a été obtenue en présence de 0,25 % de TiO<sub>2</sub> et 100 % de réduction pour 0,75 % de TiO<sub>2</sub>.<sup>176</sup>

En 2012, une méthode dérivée de la norme ISO/TC206/SC a été mise au point par Rahal *et al.* pour évaluer l'activité bactéricide de différents tissus photocatalytiques sous irradiation UV-A ou sous lumière visible filtrée. Cette méthode a été évaluée sur *P.fluorescens* avec une contamination initiale de 10<sup>7</sup> UFC. Pour obtenir une réduction de 5 log de la viabilité cellulaire, une exposition de 4 h sous rayonnement UV-A de 1,1 mW/cm<sup>2</sup> est nécessaire dans le cas du textile TiO<sub>2</sub>/coton, alors que seulement 2 h d'exposition sous lumière visible (avec seulement 0,023 mW/cm<sup>2</sup> dans le domaine des UV-A) sont nécessaires dans le cas d'un couplage anthraquinone-TiO<sub>2</sub>.<sup>181</sup>

Dans le cas des textiles, de manière analogue aux autres applications de la photocatalyse, les propriétés bactéricides peuvent être améliorées en modifiant TiO<sub>2</sub> avec des agents antibactériens. Pour exemple, des textiles en polyester fonctionnalisés avec des nanoparticules d'Ag colloïdal et de TiO<sub>2</sub> ont montré un effet bactéricide plus important sur *E.coli*, *S.aureus* et *C.albicans* par rapport aux textiles seulement fonctionnalisés avec des particules de TiO<sub>2</sub>. Ainsi, la modification de TiO<sub>2</sub> avec des agents antimicrobiens tels que l'Ag permettrait de conférer simultanément au textile des propriétés antimicrobiennes, photocatalytiques et de protection aux UV.<sup>182</sup>

<sup>179</sup> Perelshtein I, Applerot G, Perkas N, Grinblat J, Gedanken A: **A one-step process for the antimicrobial finishing of textiles with crystalline TiO<sub>2</sub> nanoparticles.** *Chemistry* 2012, **18**(15):4575-4582.

<sup>180</sup> Gouda M, Aljaafari AI: **Augmentation of Multifunctional Properties of Cellulosic Cotton Fabric Using Titanium Dioxide Nanoparticles.** *Advances in Nanoparticles* 2012, **1**:29-36.

<sup>181</sup> Rahal R, Le Behec M, Guyoneaud R, Pigot T, Paolacci H, Lacombe S: **Bactericidal activity under UV and visible light of cotton fabrics coated with anthraquinone-sensitized TiO<sub>2</sub>.** *Catalysis Today* 2012.

<sup>182</sup> Mihailovic D, Saponjic Z, Vodnik V, Potkonjak B, Jovancic P, Nedeljkovic J, Radetic M: **Multifunctional PES fabrics modified with colloidal Ag and TiO<sub>2</sub> nanoparticles.** *Polymers for advances technologies* 2011, **22**(12):2244-2249.

## **IV. Aspects mécanistiques de la photocatalyse appliquée à la dégradation des microorganismes**

La photocatalyse s'est avérée être efficace pour l'inactivation d'une large gamme de microorganismes incluant les bactéries à Gram négatif, les bactéries à Gram positif,<sup>183,184</sup> mais également les spores, les champignons,<sup>185</sup> les algues, les protozoaires et les virus.<sup>186,187</sup> A l'heure actuelle, l'effet antimicrobien de la photocatalyse n'est plus à démontrer, mais quand au mode d'action régissant ce phénomène des questions demeurent, notamment en ce qui concerne les ROS réellement impliqués dans l'effet bactéricide et dans les phénomènes de peroxydation lipidique ou bien les modifications protéiques majeures pouvant résulter de la photocatalyse sur TiO<sub>2</sub>. Une meilleure compréhension de ces mécanismes permettrait notamment une augmentation des performances antimicrobiennes.

Ainsi, dans cette dernière partie bibliographique, l'effet des différents paramètres intervenant lors de l'action photocatalytique sur les microorganismes sera tout d'abord considéré (rayonnement UV seul, particules de TiO<sub>2</sub> non éclairées et effet des différents ROS générées lors de l'action photocatalytique). Puis, nous présenterons les principaux composants cellulaires modifiés au cours du processus photocatalytique (peroxydation lipidique, relargage des composés cellulaires, protéines,...). Quelques mécanismes de défense pouvant être mis en jeu lors de l'action photocatalytique seront ensuite présentés. Enfin nous étudierons l'importance de la composition membranaire microbienne sur l'efficacité du processus photocatalytique.

### **1. Effet des rayonnements UV-A sur les microorganismes**

Dans la gamme des UV, nous pouvons distinguer les UV-A (320 nm à 400 nm), les UV-B (280 nm à 320 nm) et les UV-C (100 nm à 280 nm). Les rayonnements UV-C sont connus pour induire de multiples dommages au niveau de l'ADN, *via* la dimérisation des pyrimidines et des purines. Ce sont des rayonnements génotoxiques. Les rayonnements UV-B induisent des effets létaux et mutagènes (dommages aux lipides, accumulation de dommages à l'ADN et perte de l'activité métabolique).<sup>188</sup> De même, les rayonnements UV-A peuvent induire des dommages à l'ADN comme la formation de dimères de pyrimidine.<sup>189</sup> Similairement, il a été montré que les rayonnements UV-A peuvent induire des dommages oxydatifs lipidiques ainsi

<sup>183</sup> Ibanez J, Litter M, Pizarro R: **Photocatalytic bactericidal effect of TiO<sub>2</sub> on *Enterobacter cloacae*: Comparative study with other Gram (-) bacteria.** *Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry* 2003, **157**(1):81-85.

<sup>184</sup> Pal A, Pehkonen SO, Yu LE, Ray MB: **Photocatalytic inactivation of Gram-positive and Gram-negative bacteria using fluorescent light.** *Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry* 2007, **186**(2-3):335-341.

<sup>185</sup> Lonnen J, Kilvington S, Kehoe SC, Al-Touati F, McGuigan KG: **Solar and photocatalytic disinfection of protozoan, fungal and bacterial microbes in drinking water.** *Water research* 2005, **39**(5):877-883.

<sup>186</sup> Foster HA, Ditta IB, Varghese S, Steele A: **Photocatalytic disinfection using titanium dioxide: spectrum and mechanism of antimicrobial activity.** *Applied microbiology and biotechnology* 2011, **90**(6):1847-1868.

<sup>187</sup> Cioffi N, Rai M: **Nano-antimicrobials**; 2012.

<sup>188</sup> Santos AL, Oliveira V, Baptista I, Henriques I, Gomes NCM, Almeida A, Correia A, Cunha A: **Wavelength dependence of biological damage induced by UV radiation on bacteria.** *Archives of Microbiology* 2013, **195**:63-74.

<sup>189</sup> Tyrell R: **Induction of pyrimidine dimers in bacterial DNA by 365 nm radiation.** *Photochem Photobiol Sci* 1973, **17**(1):69-73.

que la carbonylation des protéines ou leur agrégation.<sup>188,190</sup> Il est donc nécessaire de bien différencier les effets photochimiques (effet lié au rayonnement seul), des effets photocatalytiques additionnels supplémentaires.

### Mécanismes de réparation photochimique

Afin de réparer au mieux les lésions de l'ADN créées par les rayonnements, les bactéries disposent de divers mécanismes de réparation comme les systèmes de réponse SOS, les enzymes photolyases, la réparation par excision de bases utilisant les endonucléases, les ADN polymérases, les ADN ligases.<sup>191,192,193,194</sup>

Les souches seront ainsi plus ou moins résistantes aux UV, selon la présence ou non de mécanisme de réparation.

## 2. Importance du contact entre le TiO<sub>2</sub> et les bactéries

Le contact intime entre les bactéries et les particules de TiO<sub>2</sub> est souvent présenté comme un des points clé du processus photocatalytique. En effet, l'adsorption des bactéries sur les agrégats de TiO<sub>2</sub> même en absence d'éclairage induirait des modifications de perméabilité membranaire ce qui renforcerait l'effet bactéricide généré lors du processus photocatalytique.<sup>195</sup> Cet effet n'est en revanche pas spécifique à TiO<sub>2</sub> puisque des dommages membranaires ont également été constatés pour d'autres types de nanomatériaux comme ZnO, le chitosane, des nanotubes de carbone ou Ag.<sup>196</sup>

Il faut donc bien séparer l'effet bactéricide par contact de l'effet photocatalytique.

Des résultats similaires ont été publiés par Pigeot-Rémy *et al.* en 2011. L'analyse de la perméabilité membranaire d'une souche *E.coli* K12 (population initiale de l'ordre de 10<sup>8</sup> UFC/mL) a été évaluée après mise en contact de cette dernière avec TiO<sub>2</sub> P25 à une concentration de 2,5 g/L. Les dommages membranaires ont été estimés par dénombrement sur milieux gélosés Luria Bertani supplémentés avec 10 g/L de désoxycholate de sodium. Le désoxycholate est un acide biliaire secondaire qui agit comme solubilisant des lipides. Une augmentation de l'altération membranaire a été observée directement après mise en contact de la souche bactérienne avec les nanoparticules. Cette altération serait à l'origine d'une augmentation de la sensibilité au désoxycholate induisant une perte rapide de cultivabilité (perte de 10<sup>8</sup> CFU/mL à 10<sup>4</sup> -10<sup>3</sup> UFC/mL). Ainsi durant cette phase d'adsorption les interactions électrostatiques TiO<sub>2</sub>-bactérie engendreraient une augmentation de la

<sup>190</sup> Bosshard F, Riedel K, Schneider T, Geiser C, Bucheli M, Egli T: **Protein oxidation and aggregation in UVA-irradiated *Escherichia coli* cells as signs of accelerated cellular senescence.** *Environmental microbiology* 2010, **12**(11):2931-2945.

<sup>191</sup> Sinha RP, Hader DP: **UV-induced DNA damage and repair: a review.** *Photochem Photobiol Sci* 2002, **1**(4):225-236.

<sup>192</sup> Blake D, Maness P-C, Huang Z, Wolfrum E, Huang J: **Application of the photocatalytic chemistry of titanium dioxide to disinfection and the killing of cancer cells.** *Separation and purification methods* 1999, **28**(1):1-50.

<sup>193</sup> Goosen N, Moolenaar GF: **Repair of UV damage in bacteria.** *DNA repair* 2008, **7**(3):353-379.

<sup>194</sup> Berney M, Weilenmann HU, Egli T: **Gene expression of *Escherichia coli* in continuous culture during adaptation to artificial sunlight.** *Environmental microbiology* 2006, **8**(9):1635-1647.

<sup>195</sup> Gogniat G, Thyssen M, Denis M, Pulgarin C, Dukan S: **The bactericidal effect of TiO<sub>2</sub> photocatalysis involves adsorption onto catalyst and the loss of membrane integrity.** *FEMS microbiology letters* 2006, **258**(1):18-24.

<sup>196</sup> Li Q, Mahendra S, Lyon DY, Brunet L, Liga MV, Li D, Alvarez PJ: **Antimicrobial nanomaterials for water disinfection and microbial control: potential applications and implications.** *Water research* 2008, **42**:4591-4602.

perméabilité de la membrane externe ce qui favoriserait le passage de substances néfastes à l'intérieur de la bactérie.<sup>197</sup>

Cette altération membranaire avait déjà été observée par Simon-Deckers *et al.* après mise en contact d'*E.coli* avec différents types de TiO<sub>2</sub> (nanoparticules de TiO<sub>2</sub> avec un diamètre < 25 nm composées d'anatase ou de rutile) pendant 24h.<sup>198</sup>

On peut relever également qu'il s'avèrerait que les agrégats TiO<sub>2</sub>-bactérie seraient préférentiellement formés pour des conditions opératoires où le pH est inférieur au point de charge nul (PZC), par l'interaction des groupements phosphates et carboxyliques présents à la surface des bactéries (comme *E.coli*) avec TiOH<sub>2</sub><sup>+</sup> en surface des particules de TiO<sub>2</sub> (agrégats visualisés au TEM dans le cas de TiO<sub>2</sub> P25 pour un pH de 6).<sup>199</sup>

### **3. Rôle des ROS sur le mécanisme de destruction bactérien**

A l'heure actuelle, il est souvent rapporté que sous rayonnement UV-A, l'inactivation photocatalytique bactérienne serait due aux ROS ( $\text{OH}^\bullet$ ,  $\text{O}_2^\bullet$ ,  $\text{HO}_2^\bullet$ ,  $\text{H}_2\text{O}_2$ ) avec comme première cible d'action, la membrane cellulaire.<sup>200,201</sup> D'un point de vue technique, la mise en évidence des ROS n'est réalisable aisément qu'en milieu liquide.

Différentes études montrent que parmi ces ROS, les radicaux hydroxyles sont souvent présentés comme les principaux ROS à l'origine de l'effet bactéricide photocatalytique.<sup>202,203</sup>

Ces radicaux hydroxyles formés à la surface de TiO<sub>2</sub> sous illumination ont une durée de vie assez courte, de l'ordre de la nanoseconde ; ainsi leur distance de diffusion serait limitée (pas plus de 1 µm de la surface du TiO<sub>2</sub>) (figure 14).<sup>186,204</sup> D'autres auteurs ont cependant montré, grâce à la conception d'un modèle d'étude utilisant une membrane poreuse en PTFE de 50 µm d'épaisseur séparant la suspension bactérienne du revêtement TiO<sub>2</sub>/verre, que ce serait le peroxyde d'hydrogène qui serait impliqué dans l'effet bactéricide du TiO<sub>2</sub> sur *E.coli* et non les radicaux hydroxyles qui eux ne peuvent diffuser.<sup>205</sup> Ainsi, de par son absence de charge électrique, le peroxyde d'hydrogène pourrait diffuser à travers les membranes et induire la mort cellulaire (figure 14).<sup>186</sup>

Somme toute, il s'avèrerait que les effets photocatalytiques bactéricides ne soient pas dûs à l'implication que d'un seul ROS mais seraient dûs probablement à l'action simultanée de

<sup>197</sup> Pigeot-Remy S, Simonet F, Errazuriz-Cerda E, Lazzaroni JC, Atlan D, Guillard C: **Photocatalysis and disinfection of water: Identification of potential bacterial targets.** *Applied catalysis B, Environmental* 2011, **104**:390-398.

<sup>198</sup> Simon-Deckers A, Loo S, Mayne-L'hermite M, Herlin-Boime N, Menguy N, Reynaud C, Gouget B, Carriere M: **Size-, composition- and shape-dependent toxicological impact of metal oxide nanoparticles and carbon nanotubes toward bacteria.** *Environmental science & technology* 2009, **43**(21):8423-8429.

<sup>199</sup> Gumy D, Morais C, Bowen P, Pulgarin C, Giraldo S, Hajdu R, Kiwi J: **Catalytic activity of commercial of TiO<sub>2</sub> powders for the abatement of the bacteria (*E.coli*) under solar simulated light: influence of the isoelectric point.** *Applied catalysis B, Environmental* 2006, **63**:76-84.

<sup>200</sup> Cheng YW, Chan RC, Wong PK: **Disinfection of *Legionella pneumophila* by photocatalytic oxidation.** *Water research* 2007, **41**(4):842-852.

<sup>201</sup> Ibanez J, Litter M, Pizarro R: **Photocatalytic bactericidal effect of TiO<sub>2</sub> on *Enterobacter cloacae*: Comparative study with other Gram (-) bacteria.** *Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry* 2003, **157**(1):81-85.

<sup>202</sup> Ireland JC, Klostermann P, Rice EW, Clark RM: **Inactivation of *Escherichia coli* by titanium dioxide photocatalytic oxidation.** *Applied and environmental microbiology* 1993, **59**(5):1668-1670.

<sup>203</sup> Cho M, Chung H, Choi W, Yoon J: **Different inactivation behaviors of MS-2 phage and *Escherichia coli* in TiO<sub>2</sub> photocatalytic disinfection.** *Applied and environmental microbiology* 2005, **71**(1):270-275.

<sup>204</sup> Grassian VH: **Environmental catalysis.** In. Edited by Group TeF; 2005.

<sup>205</sup> Kikuchi Y, Sunada K, Iyoda T, Hashimoto K: **Photocatalytic bactericidal effect of TiO<sub>2</sub> thin films: dynamic view of the active oxygen species responsible for the effect.** *Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry* 1997, **106**:51-56.

plusieurs.<sup>186,203</sup> Ces radicaux oxyderaient dans un premier temps la membrane externe (dans le cas de bactéries à Gram négatif), générant la formation de micropores. La destruction de la membrane cellulaire serait initiée à n'importe quel endroit de la membrane cellulaire ; cependant statistiquement, les dommages seraient plutôt induits au niveau des pôles des bacilles d'*E.coli*.<sup>206</sup> Après cette étape, les radicaux pourraient pénétrer la couche de peptidoglycane pour enfin atteindre la membrane cytoplasmique où des micropores pourraient être de nouveau formés suite au mécanisme de peroxydation lipidique. Ainsi ces espèces très réactives pourraient pénétrer le cytoplasme et oxyderaient les composants cellulaires (minéralisation).<sup>207,208,209</sup>

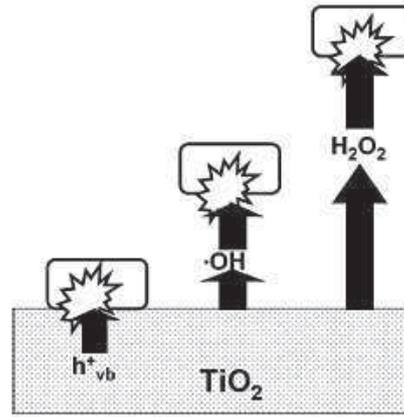


Figure 14 Représentation schématique de la distance d'action des ROS sur les bactéries: le radical hydroxyle généré, agit à proximité de la particule de TiO<sub>2</sub> tandis que le peroxyde d'hydrogène peut diffuser et agir à distance, selon Foster *et al.*<sup>186</sup>

#### 4. Principaux composants cellulaires modifiés lors de la photocatalyse

Dès 1985, Matsunaga *et al.* se sont intéressés à ces mécanismes et ont indiqué que la réaction photocatalytique induirait une diminution en **coenzyme A**, conduisant ainsi à une inhibition de la respiration.<sup>210</sup> Désormais, il apparaîtrait que l'action bactéricide serait liée aux multiples dommages sur la membrane bactérienne comme la peroxydation lipidique ou le relargage de certains composés intra-cellulaires. Cette décomposition de la membrane cellulaire et les désordres dans la membrane ont été observés par microscopie électronique à transmission (TEM), après traitement photocatalytique d'*E.coli* en présence de 0,25 g/L de TiO<sub>2</sub> P25 Degussa activé pendant des durées de 80-180 min sous rayonnement UV-A (irradiance de 3,45 mW/cm<sup>2</sup>). Ainsi, les dommages oxydatifs générés par les ROS induiraient une perte de perméabilité membranaire, conduisant à la lyse cellulaire.<sup>197</sup> Ces dommages membranaires ont

<sup>206</sup> Liou JW, Chang HH: **Bactericidal Effects and Mechanisms of Visible Light-Responsive Titanium Dioxide Photocatalysts on Pathogenic Bacteria.** *Arch Immunol Ther Exp (Warsz)* 2012.

<sup>207</sup> Cheng YW, Chan RC, Wong PK: **Disinfection of *Legionella pneumophila* by photocatalytic oxidation.** *Water research* 2007, **41**(4):842-852.

<sup>208</sup> Sunada K, Watanabe T, Hashimoto K: **Studies on photokilling of bacteria on TiO<sub>2</sub> thin film.** *Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry* 2003, **156**:227-233.

<sup>209</sup> Mitoraj D, Janczyk A, Strus M, Kisch H, Stochel G, Heczko PB, Macyk W: **Visible light inactivation of bacteria and fungi by modified titanium dioxide.** *Photochem Photobiol Sci* 2007, **6**(6):642-648.

<sup>210</sup> Matsunaga T, Tomoda R, Nakajima T, Wake H: **Photoelectrochemical sterilization of microbial cells by semiconductor powders.** *FEMS Microbiol Lett* 1985, **29**(1-2):211-214.

également été observés chez le modèle de levure de *S.cerevisiae* par microscopie optique à fluorescence et par cytométrie en flux.<sup>211</sup>

#### 4.1. La peroxydation lipidique

Les membranes bactériennes sont composées de bicouche de phospholipides qui sont aisément susceptibles d'être peroxydés. En effet, les bactéries à Gram négatif sont composées de deux bicouches de phospholipides distinctes et les bactéries Gram positif sont composées d'une bicouche de phospholipides présente sous l'épaisse couche de peptidoglycane. Ces membranes de phospholipides sont principalement constituées de phosphatidyléthanolamine et de phosphatidylglycérol.<sup>212</sup> Cette réaction radicalaire en chaîne serait initiée par la génération de ROS à la surface du catalyseur : ils induiraient l'élimination d'un atome d'hydrogène de la chaîne latérale de l'acide gras insaturé (figure 15).<sup>213</sup> Le radical lipidique fixerait alors l'oxygène moléculaire pour former des radicaux hydroperoxydes lipidiques. Ces radicaux très instables sont ensuite décomposés en diverses molécules de types cétones, aldéhydes dont le malondialdéhyde (MDA), acides et CO<sub>2</sub>.

Cependant, à l'heure actuelle, les ROS réellement impliqués dans ces mécanismes d'oxydation lipidique ne sont pas clairement identifiés ; ainsi, nous réaliserons cette investigation dans le chapitre 4 de cette thèse intitulé « Etude des mécanismes d'oxydation ainsi que leur effet sur les différents composants cellulaires après différents traitements photocatalytiques ».

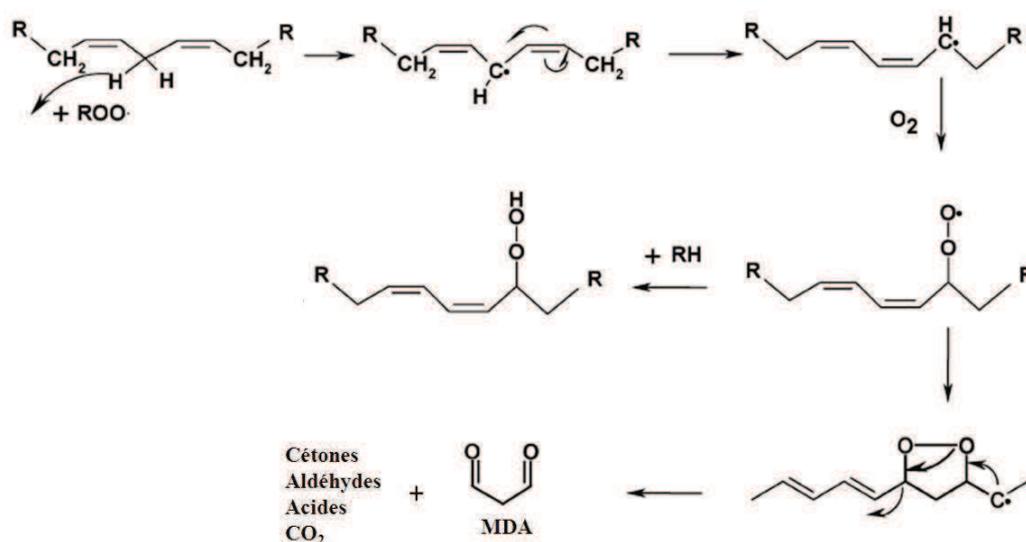


Figure 15 Schéma du principe de la peroxydation lipidique, adapté de<sup>214</sup>

Souvent, la peroxydation lipidique est mise en évidence par le relargage et la quantification du malondialdéhyde (MDA). Le MDA, acide gras polyinsaturé, est ainsi présenté comme un

<sup>211</sup> Thabet S, Weiss-Gayet M, Dappozze F, Cotton P, Guillard C : **Photocatalysis on yeast cells : toward targets and mechanisms.** *Applied Catalysis B: Environmental* 2013, **140-141**:169-178.

<sup>212</sup> To THM : **Modification de la composition lipidique membranaire chez les bactéries lactiques en conditions de stress.** Thèse de l'Université de Dijon, 2010

<sup>213</sup> Dalrymple OK, Stefanakos E, Trotz MA, Gowami DY: **A review of the mechanisms and modeling of photocatalytic disinfection.** *Applied Catalysis B: Environmental* 2010, **98**:27-38.

<sup>214</sup> Kiwi J, Nadtochenko V: **New evidence for TiO<sub>2</sub> photocatalysis during bilayer lipid peroxidation.** *The journal of Physical Chemistry B* 2004, **108**:17675-17684.

biomarqueur majeur de la peroxydation lipidique.<sup>215,216</sup> Les autres produits de peroxydation comme les aldéhydes, les cétones ou les acides carboxyliques ont été détectés par Spectroscopie Infrarouge à Transformée de Fourier (IRTF), en parallèle de la disparition de la membrane cellulaire d'*E.coli*.<sup>214,217</sup> Plus récemment, la dégradation des composants cellulaires, et en particulier les phénomènes de peroxydation lipidique, a été quantifiée chez *E.coli* par IRTF et par microscopie à force atomique, mettant en évidence une fluidité membranaire conduisant inévitablement à la lyse bactérienne.<sup>218</sup>

De même, ces désordres dans la membrane bactérienne seraient aussi à l'origine d'une perte de l'activité respiratoire conduisant inévitablement à la mort cellulaire. En 1999, cette activité respiratoire avait été quantifiée à l'aide de la transformation du 2,3,5-triphenyltetrazolium chlorure (TTC) en sa forme réduite, le chlorure 2,3,5-triphenyl tetrazolium formazan (TTF).<sup>215</sup>

## 4.2. Le relargage des composés

Divers composés seraient relargués suite au traitement photocatalytique. Il a ainsi été montré que la perméabilité membranaire conduirait tout d'abord au relargage des petites molécules comme l'ortho-nitrophényl  $\beta$ -D- galactopyranoside (ONPG), suivies du relargage de composés de plus grandes tailles comme la  $\beta$ -galactosidase.<sup>219</sup> De même un relargage rapide des ions potassiums<sup>211</sup> induirait une diminution de la viabilité cellulaire.<sup>220</sup>

## 4.3. Les dommages aux acides nucléiques

Outre le relargage de composés dans le milieu extracellulaire, l'action photocatalytique *via* la génération de ROS pourrait générer des dommages au niveau des acides nucléiques.<sup>221,222</sup> Ainsi dès 1992, Saito *et al.* ont montré qu'après le relargage des ions potassiums, ce seraient les protéines et les ARN qui seraient relargués dans le milieu extracellulaire.<sup>220</sup>

Grâce à la réalisation de mutants, Gogniat et Dukan ont par ailleurs mis en évidence l'implication des radicaux hydroxyles sur les dommages de l'ADN.<sup>222</sup>

Récemment Pigeot-Rémy *et al.* ont effectué des analyses électrophorétiques sur les acides nucléiques d'*E.coli* après photocatalyse sous UV-A et différentes durées de traitement allant jusqu'à 420 min (concentration en TiO<sub>2</sub> P25 Degussa de 0,25 g/L ; irradiance de 3,45

<sup>215</sup> Maness P-C, Smolinski S, Blake D, Huang Z, Wolfrum E, Jacoby W: **Bactericidal activity of photocatalytic TiO<sub>2</sub> reaction: toward an understanding of its killing mechanism.** *Applied and environmental microbiology* 1999, **65**(9):4094-4098.

<sup>216</sup> Hu C, Guo J, Qu J, Hu X: **Photocatalytic degradation of pathogenic bacteria with AgI/TiO<sub>2</sub> under visible light irradiation.** *Langmuir : the ACS journal of surfaces and colloids* 2007, **23**(9):4982-4987.

<sup>217</sup> Kiwi J, Nadochenko V: **Evidence for the mechanism of photocatalytic degradation of the bacterial wall membrane at the TiO<sub>2</sub> interface by ATR-FTIR and laser kinetic spectroscopy.** *Langmuir : the ACS journal of surfaces and colloids* 2005, **21**(10):4631-4641.

<sup>218</sup> Pulgarin C, Kiwi J, Nadochenko V: **Mechanism of photocatalytic bacterial inactivation on TiO<sub>2</sub> films involving cell-wall damage and lysis.** *Applied Catalysis B:Environmental* 2012, **128**:179-183.

<sup>219</sup> Huang Z, Maness P-C, Blake D, Wolfrum E, Smolinski S, Jacoby W: **Bactericidal mode of titanium dioxide photocatalysis.** *Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry* 2000, **130**:163 -170.

<sup>220</sup> Saito T, Iwase T, Horie J, Morioka T: **Mode of photocatalytic bactericidal action of powdered semiconductor TiO<sub>2</sub> on mutans streptococci.** *J Photochem Photobiol B* 1992, **14**(4):369-379.

<sup>221</sup> Hirakawa, K., M. Mori, M. Yoshida, S. Oikawa, and S. Kawanishi: **Photo-irradiated titanium dioxide catalyzes site specific DNA damage via generation of hydrogen peroxide.** *Free Radic Res* 2004, **38**:439-47.

<sup>222</sup> Gogniat G, Dukan S: **TiO<sub>2</sub> photocatalysis causes DNA damage via fenton reaction-generated hydroxyl radicals during the recovery period.** *Applied and environmental microbiology* 2007, **73**(23):7740-7743.

mW/cm<sup>2</sup>). Les auteurs indiquent que, suite au stress oxydatif, les molécules intracellulaires type ADN ou ARN ont été endommagées et des dimères de pyrimidines ont été formés. Ces structures étant à l'origine d'altérations dans la conformation tridimensionnelle de la molécule d'ADN et conduisant par la suite à des dysfonctionnements dans le processus de réplication cellulaire, elles pourraient inévitablement conduire à la mort cellulaire.<sup>223</sup>

En outre, il est suggéré que ce matériel génétique dégradé pourrait être utilisé comme source de nutriments pour les microorganismes « survivants ». La présence de tels microorganismes contribueraient à augmenter le temps de traitement photocatalytique nécessaire pour les inactiver intégralement. Cette hypothèse est étayée par les résultats de V.Palchevskiy *et al.*, qui ont montré qu'*E.coli* a la capacité de métaboliser les molécules d'ADN double brin et de les utiliser comme source de carbone et d'énergie.<sup>224</sup>

#### 4.4. Les dommages aux protéines

Les protéines jouent un rôle primordial aussi bien au niveau de la structure bactérienne qu'au niveau fonctionnel ; elles représentent environ 50 % des molécules cellulaires (si on ne tient pas compte de l'eau).

Cependant, à ce jour, de nombreux articles rapportent que les protéines seraient également modifiées lors de l'action photocatalytique,<sup>215,225,226</sup> mais peu d'articles indiquent quelles protéines seraient réellement touchées ainsi que le mode d'action et les conséquences de ces altérations.

Par électrophorèses 1D, il a notamment été montré qu'un traitement photocatalytique d'1 h de rayonnement UV-A (irradiance de 2,8 mW/cm<sup>2</sup>) en présence de 0,5 mg/cm<sup>2</sup> de TiO<sub>2</sub> sur lamelles de verre conduit à la dégradation de différentes protéines modèles purifiées (lysozyme, cytochrome C et BSA). De même, un suivi de la dégradation de BSA a été réalisé montrant que cette dégradation suivait une cinétique du premier ordre. Des électrophorèses 1D ont ensuite été réalisées sur les protéines totales et sur les protéines membranaires d'*E.coli* toujours après exposition au même traitement. Ces travaux ont notamment permis de mettre en évidence que la dégradation des protéines n'étaient pas dépendante du type de protéines puisqu'aussi bien les protéines de la membrane que les protéines totales étaient modifiées (la dégradation des protéines membranaires ayant été en plus confirmée par électrophorèse 2D).<sup>227</sup>

<sup>223</sup> Pigeot-Remy S, Simonet F, Errazuriz-Cerda E, Lazzaroni JC, Atlan D, Guillard C: **Photocatalysis and disinfection of water: Identification of potential bacterial targets**. *Applied catalysis B, Environmental* 2011, **104**:390-398.

<sup>224</sup> Palchevskiy V, Finkel SE: ***Escherichia coli* competence gene homologs are essential for competitive fitness and the use of DNA as a nutrient**. *Journal of bacteriology* 2006, **188**(11):3902-3910.

<sup>225</sup> Foster HA, Ditta IB, Varghese S, Steele A: **Photocatalytic disinfection using titanium dioxide: spectrum and mechanism of antimicrobial activity**. *Applied microbiology and biotechnology* 2011, **90**:1847-1868.

<sup>226</sup> Nakano R, Ishiguro H, Yao Y, Kajioaka J, Fujishima A, Sunada K, Minoshima M, Hashimoto K, Kubota Y: **Photocatalytic inactivation of influenza virus by titanium dioxide thin film**. *Photochem Photobiol Sci* 2012, **11**(8):1293-1298.

<sup>227</sup> Goulhen-Chollet F, Josset S, Keller N, Keller V, Lett MC: **Monitoring the bactericidal effect of UV-A photocatalysis: A first approach through 1D and 2D protein electrophoresis**. *Catalysis Today* 2009, **147**:169-172.

Il a également été rapporté que les protéines intracellulaires seraient relarguées dans le milieu extra-cellulaire en parallèle de la formation de pores membranaires. Ces informations ont été obtenues chez *E.coli* par analyse d'image topographique à force atomique et par gel SDS-PAGE.<sup>228</sup>

Dernièrement, Thabet *et al.* ont détecté dans le milieu réactionnel après traitement photocatalytique (TiO<sub>2</sub> P25 à 0,1 g/L et irradiance UV-A de 3,8 mW/cm<sup>2</sup>) de la levure *S.cerevisiae*, la présence d'acides aminés, de cations (NH<sub>4</sub><sup>+</sup>, K<sup>+</sup>, Na<sup>+</sup>) et d'anions (SO<sub>4</sub><sup>-</sup>, Cl<sup>-</sup>, NO<sub>3</sub><sup>-</sup>). Ils suggèrent notamment que ces acides aminés proviennent des protéines présentes dans la paroi cellulaire : les glucomannoprotéines.<sup>229</sup>

Il paraît ainsi intéressant de pouvoir identifier les protéines pouvant être modifiées au cours des différents traitements appliqués (effet du rayonnement seul, effet cytotoxique du TiO<sub>2</sub> et effet photocatalytique du TiO<sub>2</sub>). Cette recherche constituera entre autre une section à part entière du chapitre 4 de cette thèse intitulé « Etude des mécanismes d'oxydation ainsi que leur effet sur les différents composants cellulaires après traitements photocatalytiques ».

#### 4.5. La minéralisation cellulaire

Suite aux différents dommages provoqués au niveau de la membrane cellulaire et après le relargage de composés de hauts poids moléculaires tels que les protéines, il y aurait une lyse cellulaire, suivie de la dégradation et de la minéralisation complète des composants cellulaires. Ainsi, en théorie, les composés simples produits en fin de réaction seraient principalement le CO<sub>2</sub>, l'eau et des minéraux.

Cette minéralisation complète en CO<sub>2</sub> a été décrite pour la première fois par Jacoby *et al.*, 1998, après dépôt de *E.coli* sur des surfaces recouvertes de TiO<sub>2</sub>. Ainsi *via* trois approches expérimentales différentes (microscopie électronique à balayage, marquage au radioisotope <sup>14</sup>C, mesures du dioxyde de carbone en réacteur batch), il a pu être mis en évidence que la matière organique des bactéries serait oxydée et minéralisée par photocatalyse.<sup>230</sup> Ce phénomène a été corroboré par une étude réalisée en phase liquide chez *Legionella pneumophila* en 2007, à l'aide de mesures du carbone organique total.<sup>231</sup>

### 5. Mécanismes enzymatiques de détoxification des réactifs oxygénés

Chez les microorganismes, des ROS sont générés, même dans le cas d'un fonctionnement métabolique normal. Dès leur formation, les enzymes comme la superoxyde dismutase, la

<sup>228</sup> Liou JW, Gu MH, Chen YC, Tseng YH, Hung YJ, Chang HH: **Visible light responsive photocatalyst induces progressive and apical-terminus preferential damages on *Escherichia coli* surfaces.** *PLoS one* 2011, **6**(5).

<sup>229</sup> Thabet S, Weiss-Gayet M, Dappozze F, Cotton P, Guillard C : **Photocatalysis on yeast cells : toward targets and mechanisms.** *Applied Catalysis B: Environmental* 2013, **140-141**:169-178.

<sup>230</sup> Jacoby W, Maness P-C, Wolfrum E, Blake D, Fennell JA: **Mineralization of bacterial cell mass on a photocatalytic surface in air.** *Environmental science and technology* 1998, **32**(17):2650-2653.

<sup>231</sup> Cheng YW, Chan RC, Wong PK: **Disinfection of *Legionella pneumophila* by photocatalytic oxidation.** *Water research* 2007, **41**(4):842-852.

catalase, les peroxydases vont neutraliser l'action de ces réactifs oxygénés. Face au stress oxydatif généré lors du processus photocatalytique, ces mêmes enzymes sont mises en jeu.

✓ La superoxyde dismutase

La **superoxyde dismutase** (SOD) est une enzyme qui fait partie des constituants majeurs des mécanismes de défense au stress oxydatif chez les procaryotes et les eucaryotes *via* la transformation du radical anion superoxyde ( $O_2^{\cdot -}$ ) en peroxyde d'hydrogène et en dioxygène (Eq.18). Cette réponse au stress oxydatif est bien connue chez les microorganismes et en particulier chez les bactéries à Gram négatif.



Différentes formes de SOD sont présentes chez les procaryotes. Cette acquisition de matériel enzymatique s'est faite au cours de l'évolution des organismes dans le but de protéger au mieux la cellule des dommages oxydatifs. Ces dommages oxydatifs résultent par ailleurs du métabolisme normal des cellules. C'est par exemple le cas d'*E.coli* qui possède la Fe-SOD, la Mn-SOD<sup>232</sup> ou encore la Cu, Zn-SOD.<sup>233</sup> Cette enzyme est absente chez les bactéries anaérobies strictes.

✓ La catalase

Cette enzyme constitutive, présente en grande quantité, réduit la concentration intracellulaire du peroxyde d'hydrogène. Cette enzyme catalyse la dismutation du peroxyde d'hydrogène en eau et dioxygène (Eq.19). Elle est également absente chez les bactéries anaérobies strictes.



Généralement, il est admis que l'action néfaste du peroxyde d'hydrogène est liée à la formation du radical hydroxyle, à durée de vie très brève, mais très réactif, cette formation étant catalysée par la réaction Fenton (Eq.20) ou la réaction photo-Fenton, réaction basée sur la réaction Fenton assistée photochimiquement (sous UV) (Eq.21) :



De par cette réaction de Fenton, quoi qu'indispensable aux bactéries, le Fer devient toxique pour la cellule.<sup>234</sup>

Chez *E.coli*,  $H_2O_2$  est éliminé par deux catalases : l'hydroperoxydase I (codée par *katG*) qui est présente lors de la croissance aérobie et l'hydroperoxydase II (codée par *katE*) induite lors de la phase stationnaire.<sup>235</sup> Une augmentation de l'activité de la catalase traduit donc une augmentation de la quantité d' $H_2O_2$ . Lors de l'étude de l'inactivation photocatalytique

<sup>232</sup> Guillard C, Bui T-H, Felix C, Moules V, Lina B, Lejeune P: **Microbiological disinfection of water and air by photocatalysis**. *CR Chimie* 2008, **11**:107-113.

<sup>233</sup> Blake D, Maness P-C, Huang Z, Wolfrum E, Huang J: **Application of the photocatalytic chemistry of titanium dioxide to disinfection and the killing of cancer cells**. *Separation and purification methods* 1999, **28**(1):1-50.

<sup>234</sup> Pelmont J: **Bactéries et environnement**; 1993.

<sup>235</sup> Cabisco E, Tamarit J, Ros J: **Oxidative stress in bacteria and protein damage by reactive oxygen species**. *International microbiology : the official journal of the Spanish Society for Microbiology* 2000, **3**(1):3-8.

d'*E.coli* K12 sous lumière visible sur des nanotubes de vanadate de bismuth, une augmentation de l'activité catalase traduisant ce stress oxydatif a été observée.<sup>236</sup>

Une étude réalisée par Rincon et Pulgarin a notamment mis en évidence qu'un arrêt du rayonnement au début de la réaction photocatalytique sur *E.coli* favoriserait l'activation des mécanismes d'auto-réparation. En effet, durant cette période d'obscurité, la SOD peut neutraliser  $O_2^{\circ-}$  et la catalase peut éliminer le peroxyde d'hydrogène. Cependant, si les systèmes sont de nouveau ré-exposés au rayonnement, des ROS dont les radicaux hydroxyles seront générés conduisant inévitablement à l'inactivation microbienne. Ainsi, il s'avèrerait que le ratio entre le temps d'exposition au rayonnement et le temps où le système est protégé de la lumière, soit à l'origine de la relation entre la quantité de  $OH^{\circ}$  produits et l'efficacité des systèmes de réparation, ce temps d'inactivation dépendant en plus entre autre du microorganisme ciblé.<sup>237</sup>

✓ Les peroxydases.

**Les peroxydases**, constituent une large famille d'enzymes permettant l'élimination de  $H_2O_2$  à l'aide de la réaction globale suivante :



Afin de se protéger des peroxydes, les bactéries peuvent utiliser la NADH peroxydase ainsi que le **glutathion**. Sous forme réduite (GSH), le glutathion sert de cofacteur de réduction et d'agent de détoxification en réagissant avec les radicaux libres et en s'oxydant avec les peroxydes selon la réaction :



Les bactéries à Gram négatif en l'occurrence contiennent des quantités importantes en glutathion. Le glutathion oxydé est alors réduit par la glutathion réductase selon :



Cette glutathion réductase fait donc partie des systèmes de défense et elle est notamment induite lors de stress à  $O_2^{\circ-}$ .<sup>234</sup>

✓ Mécanisme de réparation de l'ADN- le système SOS

Les enzymes de réparation de l'ADN incluent les endonucléases IV, qui sont induites lors du stress oxydatif, et les exonucléases III, qui elles sont induites lors de la phase stationnaire. Ainsi les procaryotes contiennent des catalyseurs capables de réparer directement la structure primaire des protéines.<sup>235</sup> Par exemple, dans le cas où les UV conduisent à la formation de dimères de pyrimidines, c'est ce système qui entre en jeu afin de reformer des pyrimidines monomériques. En revanche en présence de  $TiO_2$ , ces mécanismes de protection ne sont plus

<sup>236</sup> Wang W, Yu Y, An T, Li G, Yip HY, Yu JC, Wong PK: **Visible-light-driven photocatalytic inactivation of *E. coli* K-12 by bismuth vanadate nanotubes: bactericidal performance and mechanism.** *Environmental science & technology* 2012, **46**(8):4599-4606.

<sup>237</sup> Rincon AG, Pulgarin C: **Photocatalytic inactivation of *E.coli*: effect of (continuous-intermittent) light intensity and of (suspended-fixed)  $TiO_2$  concentration.** *Applied Catalysis B: Environmental* 2003, **44**:263-284.

suffisamment efficaces et il est entre autre possible de constater un blocage de la réplication.<sup>237</sup>

## **6. Influence de la nature du microorganisme : bactéries, spores et champignons**

La majorité des études ont été menées sur *E.coli*, bactérie indicatrice de contamination fécale, dont le génome est entièrement séquencé.<sup>238,239,225</sup> Cependant, au sein des groupes de bactéries, de réelles différences de sensibilité aux processus photocatalytiques ont pu être observées en fonction des **différentes conditions expérimentales** bien que la majorité des études soient menées sur un nombre restreint de germes avec très souvent deux bactéries à Gram négatif comparées à deux bactéries à Gram positif.

Pour la plupart des études où **TiO<sub>2</sub> est déposé sur milieu solide « sec »** (sur membrane d'acétate de cellulose,<sup>240</sup> sur verre,<sup>241</sup> ou sur plastique<sup>242</sup>), les bactéries à Gram positif sont présentées comme plus résistantes à la photocatalyse que les bactéries à Gram négatif.

Ces différences d'inactivation et de sensibilité aux stress seraient liées aux différences de composition membranaire.<sup>225,240</sup> Les bactéries à Gram négatif sont constituées de trois structures distinctes : la membrane interne ; une fine couche de peptidoglycane et la membrane externe. Bien que la structure de la membrane soit plus complexe chez les bactéries à Gram négatif, il n'en reste pas moins que les bactéries à Gram positif présentent une épaisse couche de peptidoglycane. Cette couche de peptidoglycane compte environ pour presque 80 % des composants de la paroi cellulaire tandis que les 10 % à 20 % des autres composants correspondent à des acides teichoïques.<sup>233</sup> Selon Pal *et al.* et selon Foster *et al.*, cette structure pourrait ainsi expliquer cette réduction d'efficacité lors de la photocatalyse. De plus, Pal *et al.* suggèrent également que les ROS générées soient absorbées par la couche épaisse de peptidoglycane des bactéries à Gram positif sans leur faire subir de dommages fatals indiquant que la destruction de la paroi bactérienne n'est pas nécessaire pour l'effet antibactérien laissant supposer que les interactions dans ce cas se font surtout sur la membrane externe.<sup>240</sup>

Ainsi l'efficacité d'inactivation lors du processus photocatalytique dans le cas où **TiO<sub>2</sub> est déposé sur milieu solide « sec »** suivrait cet ordre :

**Bactéries à Gram négatif > bactéries à Gram positif >> spores / champignons.**<sup>243</sup>

<sup>238</sup> Gogniat G, Thyssen M, Denis M, Pulgarin C, Dukan S: **The bactericidal effect of TiO<sub>2</sub> photocatalysis involves adsorption onto catalyst and the loss of membrane integrity.** *FEMS microbiology letters* 2006, **258**(1):18-24.

<sup>239</sup> Ditta IB, Steele A, Liprot C, Tobin J, Tyler H, Yates HM, Sheel DW, Foster HA: **Photocatalytic antimicrobial activity of thin surface films of TiO<sub>2</sub>, CuO and TiO<sub>2</sub>/CuO dual layers on *Escherichia coli* and bacteriophage T4.** *Applied microbiology and biotechnology* 2008, **79**(1):127-133.

<sup>240</sup> Pal A, Pehkonen SO, Yu LE, Ray MB: **Photocatalytic inactivation of Gram-positive and Gram-negative bacteria using fluorescent light.** *Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry* 2007, **186**:335-341.

<sup>241</sup> Dunlop PSM, Sheeran CP, Byrne JA, McMahon MAS, Boyle MA, McGuigan KG: **Inactivation of clinically relevant pathogens by photocatalytic coatings.** *Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry* 2010, **216**:303-310.

<sup>242</sup> Van Grieken R, Marugan J, Pablos C, Furones L, Lopez A: **Comparison between the photocatalytic inactivation of Gram-positive *E.faecalis* and Gram-negative *E.coli* faecal contamination indicator microorganisms.** *Applied Catalysis B: Environmental* 2010, **100**:212-220.

Lorsque **TiO<sub>2</sub> est mis en suspension**, des résultats du même ordre de sensibilité ont été observés<sup>244,245</sup> tandis que d'autres auteurs ont montré un résultat inverse<sup>246,243</sup>

*E. coli* < *S. aureus* ≈ *Enterococcus sp.*<sup>243</sup> en supposant sans plus d'explication que la structure de la paroi bactérienne soit le siège de cette différence.

Il est à noter que dans la bibliographie, les résultats peuvent être contradictoires dans le cas de TiO<sub>2</sub> en suspension. Ainsi, les explications données par ces auteurs pour expliquer l'ordre de sensibilité à la photocatalyse font intervenir soit les structures différentes de la paroi des bactéries à Gram négatif et des bactéries à Gram positif soit la différence de sensibilité des bactéries vis-à-vis des ROS générées par la photocatalyse.

Par contre, ils s'accordent tous à montrer que les spores bactériennes, levures et moisissures ont une résistance à la photocatalyse plus élevée que les bactéries.

Les spores qui sont des formes de résistance nécessitent des temps de traitements photocatalytiques supérieurs pour induire leur inactivation comparés aux formes végétatives, comme l'a illustré Dunlop *et al.* en 2010 en comparant l'efficacité de désinfection photocatalytique sur verre de différents pathogènes : *E.coli* K12, SARM, *P.aeruginosa* et les spores de *C.difficile*. Pour ce faire, des films de TiO<sub>2</sub> P25 ont été réalisés par « dip-coating » sur le verre et une contamination initiale de l'ordre de 10<sup>3</sup> UFC/mL/m<sup>2</sup> de chaque microorganisme a été testée. Un rayonnement UV-A de 3 mW/cm<sup>2</sup> a été appliqué et la cinétique de dégradation de chaque microorganisme a été réalisée pour une durée de 1 h. Ainsi il en ressort que des temps de traitement photocatalytique plus longs doivent être appliqués pour la destruction des spores de *C.difficile* (destruction de 2 log en 5 h) par comparaison aux temps nécessaires pour la désinfection de *P.aeruginosa*, d'*E.coli* K12 et de SARM.<sup>241</sup> Comme les spores, les champignons sont également très résistants au processus photocatalytique. En effet, les champignons sont des organismes eucaryotes entourés d'une membrane rigide composée de polymères solubles et insolubles, comme la chitine, les β-glucanes et les glycoprotéines. De plus, ces cellules, comme celles de *C.albicans*, sont approximativement 25 à 50 fois plus larges que les bactéries et leurs membranes cellulaires sont plus résistantes aux agents oxydatifs.<sup>243</sup> Ces propriétés physiques influent donc négativement sur l'efficacité d'inactivation.

Une étude comparative de l'efficacité d'inactivation photocatalytique des bactéries, spores et champignons sera détaillée dans le chapitre 3 de ce manuscrit, intitulé « Evaluation de l'action antimicrobienne de la photocatalyse sur surface et en milieu liquide ».

<sup>243</sup> Mitoraj D, Janczyk A, Strus M, Kisch H, Stochel G, Heczko PB, Macyk W: **Visible light inactivation of bacteria and fungi by modified titanium dioxide.** *Photochem Photobiol Sci* 2007, 6(6):642-648.

<sup>244</sup> Rincon AG: **Use of coaxial photocatalytic reactor (CAPHORE) in the TiO<sub>2</sub> photo-assisted treatment of mixed *E. coli* and *Bacillus sp.* and bacterial community present in wastewater.** *Catalysis today* 2005, 101:331-344.

<sup>245</sup> Seven O, Dindar B, Aydemir S, Metin D, Ozinel MA, Icli S: **Solar photocatalytic disinfection of a group of bacteria and fungi aqueous suspensions with TiO<sub>2</sub>, ZnO and Sahara desert dust.** *Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry* 2004, 165:103-107.

<sup>246</sup> Barnes RJ, Molina R, Xu J, Dobson PJ, Thompson IP: **Comparison of TiO<sub>2</sub> and ZNO nanoparticles for photocatalytic degradation of methylene blue and the correlated inactivation of gram-positive and gram negative bacteria.** *Journal of Nanoparticle Research* 2013, 15(1432):1-11.

## **V. Etude de la toxicité du TiO<sub>2</sub> (sous forme de nanoparticules)**

De nombreux matériaux sous forme de nanoparticules sont présents dans notre vie courante et le développement des nanotechnologies favorise cette prolifération. Les nanoparticules les plus répandues sont celles d'or, d'argent, de titane, de silice, de zinc ou encore de carbone. Par nanoparticules ou nanomatériaux, on entend en règle générale, des matériaux dont au moins une dimension est de taille nanométrique. On les retrouve aussi bien dans les équipements électroniques (automobile...) que dans les produits cosmétiques ou alimentaires...

Du fait de leurs propriétés physico-chimiques, de leur taille ultra-fine, de leur composition chimique, de leur structure de surface, de leur possibilité d'agréger et de leur haute réactivité, les nanoparticules peuvent poser de réels risques pour la santé de l'Homme et l'environnement.<sup>247,248</sup> Plusieurs études toxicologiques relatent que par l'inhalation, l'ingestion ou le contact, les nanoparticules de TiO<sub>2</sub> peuvent entrer dans le corps humain et interagir avec les cellules et les composants cellulaires comme les protéines, les lipides, compromettant ainsi les fonctions cellulaires, et conduisant à une toxicité cellulaire.<sup>249,250</sup>

La toxicité du TiO<sub>2</sub> est très variable et dépend entre autre de la taille des particules et de la forme cristalline. Wahreit *et al.* ont ainsi montré en 2007 dans une étude réalisée *in vivo* chez le rat qu'un mélange d'anatase et de rutile avec un rapport 80:20 (P25 Degussa-Evonik) provoquait une inflammation pulmonaire et une cytotoxicité des cellules pulmonaires. Dans cette étude, une unique dose de 5 mg/kg de TiO<sub>2</sub> a été administrée aux rats et l'évaluation de la toxicité pulmonaire *via* l'étude de la prolifération cellulaire et l'évaluation histopathologique a été menée après 24 h, 1 semaine, 1 mois et 3 mois après instillation.<sup>251</sup>

Une étude récente réalisée par Srivastava *et al.* confirme l'hypothèse du risque cancérigène du TiO<sub>2</sub>. Ils ont ainsi montré que des cellules pulmonaires humaines (A549) en contact pendant 6 à 24 h avec du dioxyde de titane sous forme anatase pure à 99,7 % (Sigma Aldrich, diamètre des particules < 25 nm ; surface spécifique de 200 m<sup>2</sup>/g) avec une concentration en TiO<sub>2</sub> de 10 et de 50 µg /mL de milieu cellulaire, provoque une augmentation du stress oxydatif, une génotoxicité et une apoptose des cellules. Ils émettent également l'hypothèse

<sup>247</sup> Oberdorster G, Oberdorster E, Oberdorster J: **Nanotoxicology: an emerging discipline evolving from studies of ultrafine particles.** *Environmental health perspectives* 2005, **113**(7):823-839.

<sup>248</sup> Marquis BJ, Love SA, Braun KL, Haynes CL: **Analytical methods to assess nanoparticle toxicity.** *The Analyst* 2009, **134**(3):425-439.

<sup>249</sup> Gurr JR, Wang AS, Chen CH, Jan KY: **Ultrafine titanium dioxide particles in the absence of photoactivation can induce oxidative damage to human bronchial epithelial cells.** *Toxicology* 2005, **213**(1-2):66-73.

<sup>250</sup> Smijs TG, Bouwstra JA: **Focus on skin as a possible port of entry for solid nanoparticles and the toxicological impact.** *Journal of Biomedical Nanotechnology* 2010, **6**(5):469-484.

<sup>251</sup> Warheit DB, Hoke RA, Finlay C, Donner EM, Reed KL, Sayes CM: **Development of a base set of toxicity tests using ultrafine TiO<sub>2</sub> particles as a component of nanoparticle risk management.** *Toxicology letters* 2007, **171**(3):99-110.

que les nanoparticules de TiO<sub>2</sub> peuvent traverser la barrière sanguine et ainsi diffuser dans l'appareil circulatoire.<sup>252</sup>

La plupart des études toxicologiques sont des études *in vitro*. Ces études présentent de nombreux avantages, notamment en raison de leur facilité de mise en œuvre, de leur faible coût, de la réduction/élimination des problèmes éthiques, de leur facilité d'interprétation, de leur miniaturisation et de leur automatisation.<sup>253</sup> Ainsi, ces tests sont appropriés pour l'évaluation des substances chimiques solubles comme pour les nanomatériaux. Cependant, **l'extrapolation des résultats à l'Homme reste parfois difficile**, étant donné que le mode d'action et les conditions métaboliques des modèles de cultures cellulaires ne sont parfois pas pertinents pour l'Homme (par exemple les modèles *in vitro* présentent quelquefois des mutations pouvant générer une augmentation de la prolifération cellulaire tandis que cette prolifération pourrait être potentiellement absente chez l'Homme). De plus, les modèles *in vitro* ne possèdent pas les mêmes mécanismes de détoxification cellulaires que ceux présents chez l'Homme, et les temps d'exposition des cellules avec les particules restent relativement courts tandis que chez l'Homme, les cancers sont parfois longs et nécessitent parfois un temps de latence pour se développer.<sup>254,255</sup>

Les études toxicologiques sont souvent menées avec des concentrations en TiO<sub>2</sub> assez élevées (administrées sur un court laps de temps) qui restent heureusement très souvent éloignées de la réalité. Cependant, nombre d'entre elles mettent en évidence les propriétés toxiques du TiO<sub>2</sub> et ce principalement sous la forme nanoparticulaire. Par conséquent à l'heure actuelle, il est classé par le CIRC (Centre International de Recherche sur le Cancer) comme potentiellement cancérogène pour l'Homme (classe 2B).<sup>256</sup>

Pour conclure, on peut donc avancer que l'accroche du TiO<sub>2</sub> sur un support est un point clé à optimiser avant la commercialisation de technologies incorporant un matériau photocatalytique, comme il sera présenté dans le chapitre 5 traitant de l'évaluation de l'efficacité d'un prototype d'épurateur d'air photocatalytique et de l'élaboration de textiles auto-décontaminants.

<sup>252</sup> Srivastava RK, Rahman Q, Kashyap MP, Singh AK, Jain G, Jahan S, Lohani M, Lantow M, Pant AB: **Nano-titanium dioxide induces genotoxicity and apoptosis in human lung cancer cell line, A549**. *Human & experimental toxicology* 2013, **32**(2):153-166.

<sup>253</sup> Hartung T, Daston G: **Are In vitro tests suitable for regulatory use?** *Toxicological sciences* 2009, **111**(2):233-237.

<sup>254</sup> Kirkland DJ, Aardema M, Banduhn N, Carmichael P, Fautz R, Meunier JR, Pfuhrer S: **In vitro approaches to develop weight of evidence (WoE) and mode of action (MoA) discussions with positive in vitro genotoxicity results**. *Mutagenesis* 2007, **22**(3):161-175.

<sup>255</sup> Valant J, Iavicoli I, Drobne D: **The importance of a validated standard methodology to define in vitro toxicity of nano-TiO<sub>2</sub>**. *Protoplasma* 2012, **249**:493-502.

<sup>256</sup> <http://monographs.iarc.fr/ENG/Publications/techrep42/TR42-4.pdf> consulté le 5 mars 2013

## **Chapitre 2 : Partie Expérimentale**

Cette partie présente les principaux protocoles expérimentaux communs aux différents chapitres de ce travail.

Pour des raisons de facilité de lecture et de compréhension, les protocoles expérimentaux spécifiques aux différentes études réalisées (Chapitres 3 à 5), seront détaillés dans les chapitres correspondants au plus près des conditions opératoires des tests et des résultats.

Ainsi, dans cette partie, nous présenterons le photocatalyseur utilisé (la référence commerciale TiO<sub>2</sub> P25 Evonik), les deux dispositifs expérimentaux utilisés pour l'irradiation, les microorganismes sélectionnés ainsi que le protocole de préparation des suspensions bactériennes « mères » utilisées pour l'ensemble des travaux.

Enfin, les tests choisis pour les analyses statistiques seront indiqués.

## I. Photocatalyseur de choix : le TiO<sub>2</sub> P25 Evonik (Degussa)

Le photocatalyseur choisi pour l'ensemble des travaux est le TiO<sub>2</sub> Aeroxide®/P25, produit par « Evonik Industries » (anciennement **Degussa**) et fourni sous la marque Aeroxide®. Pour l'ensemble de nos expériences, le TiO<sub>2</sub> a été mis en suspension dans de l'eau φ à différentes concentrations : 1 g/L, 2 g/L, 4 g/L et 8 g/L.

*Remarque : le TiO<sub>2</sub> doit être obligatoirement manipulé sous hotte avec gants et masque FFP 3 (Filtering Facepiece Particule 3, masque filtrant pour les très fines particules).*

### Caractérisations du TiO<sub>2</sub> P25 Evonik

Le **diffractogramme des rayons X** (figure 16) montre la présence des 2 phases cristallines anatase et rutile, dont les principaux angles de diffraction en 2θ sont 25,3° ; 37,8° et 48,1° pour l'anatase et 27,4° ; 36,1° et 56,4° pour le rutile. Il est composé de 80 % d'anatase et de 20% de rutile en ce qui concerne ses phases cristallisées. Les tailles moyennes de ses particules élémentaires, estimées d'après la méthode de Debye-Scherrer, sont de l'ordre de 22 nm pour l'anatase et de 33 nm pour le rutile.

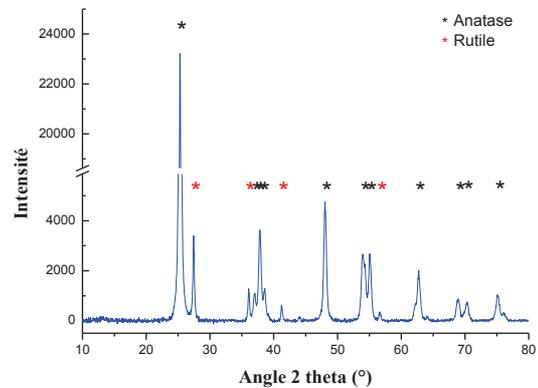


Figure 16 Diffractogramme des rayons X du TiO<sub>2</sub> P25 (anticathode au cuivre avec  $\lambda_{K_{\alpha 1}}(\text{Cu}) = 1,5406 \text{ \AA}$ )

L'analyse de l'**isotherme d'adsorption et de désorption** de N<sub>2</sub> à 77 K et de la distribution poreuse que l'on peut en déduire (figures 17 et 18) montre que le TiO<sub>2</sub> P25 est un solide non poreux. Il développe une surface spécifique calculée selon la méthode BET à  $52 \pm 3 \text{ m}^2/\text{g}$ , et l'agglomération des particules élémentaires (ou cristallites ou domaines de diffraction cohérente) lui confère une macroporosité et une mésoporosité inter-particules.

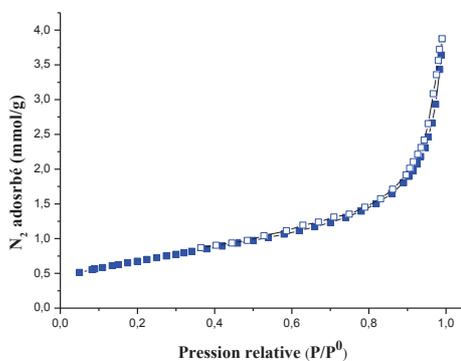


Figure 17 Isotherme d'adsorption et de désorption d'azote à la température de l'azote liquide (77K) enregistrée sur TiO<sub>2</sub> P25

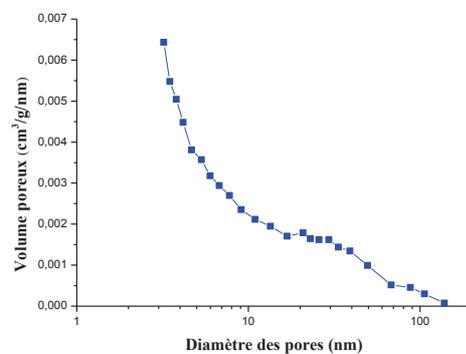


Figure 18 Distribution poreuse inter-particules du TiO<sub>2</sub> P25

La mesure de **point isoélectrique** (figure 19) montre que le PIE du  $\text{TiO}_2$  P25 est de l'ordre de 6,25. En suspension pour un pH inférieur à cette valeur, il est chargé positivement ( $\text{TiOH}_2^+$ ) et pour un pH supérieur, il est chargé négativement ( $\text{TiO}^-$ ).

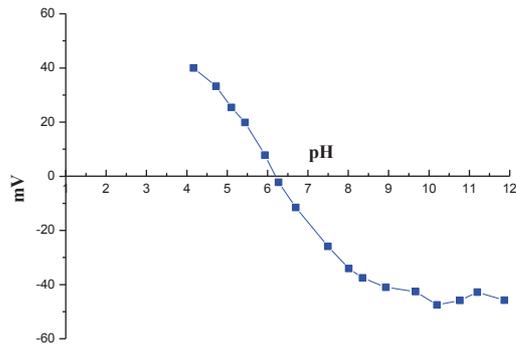


Figure 19 Mesure du point isoélectrique du  $\text{TiO}_2$  P25

La figure 20 présente le **spectre d'absorption UV/visible** du  $\text{TiO}_2$  P25 dans le domaine spectral de 250 nm à 800 nm.

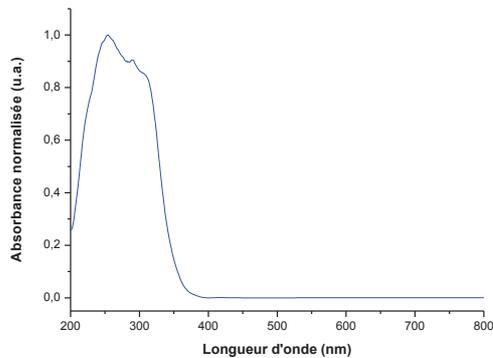


Figure 20 Spectre d'absorption du  $\text{TiO}_2$  P25 entre 250 et 800 nm

Les clichés de **microscopie électronique à balayage** (figure 21) montrent que les particules (anatase et rutile) de  $\text{TiO}_2$  tendent à s'agglomérer entre elles et à former des agrégats dont il est difficile d'évaluer la taille avec précision en raison des effets de charge. La **microscopie électronique à transmission haute résolution** (figure 22) permet d'observer la bonne cristallinité des particules élémentaires de  $\text{TiO}_2$  P25.

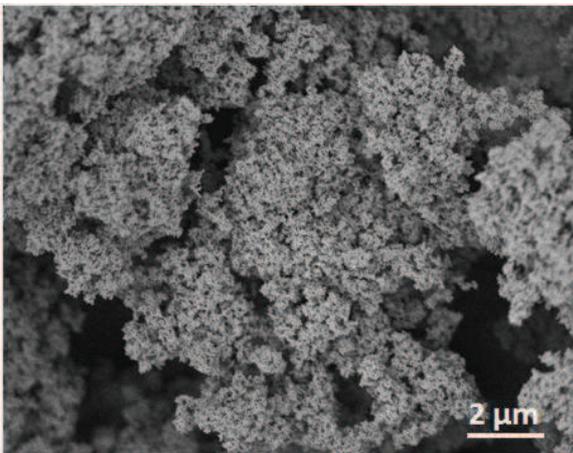


Figure 21 Cliché MEB du  $\text{TiO}_2$  P25

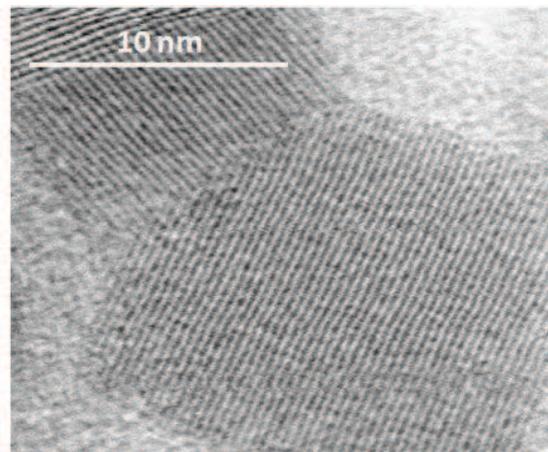


Figure 22 Cliché HRTEM du  $\text{TiO}_2$  P25

## II. Dispositifs expérimentaux de test

Cette partie présente les deux dispositifs utilisés dans le cadre de cette thèse et liste les différentes conditions réactionnelles opératoires pour la mise en œuvre des tests. Pour l'ensemble des expériences des chapitres 3 et 4 portant sur « l'évaluation de l'action antimicrobienne de la photocatalyse sur surface et en milieu liquide » et sur « l'étude des mécanismes d'oxydation ainsi que leur effet sur les différents composants cellulaires après traitements photocatalytiques », nous avons utilisé un dispositif équipé de 4 néons émettant un rayonnement UV-A, tandis que « l'étude de l'évaluation antibactérienne sur textiles » (Chapitre 5 II.) a été mise en œuvre à l'intérieur d'une chambre solaire afin d'être le plus proche des conditions réelles d'usage en raison de sa nature plus appliquée.

### 1. Système d'irradiation UV-A

#### 1.1. Le dispositif

Le dispositif de test mis au point pour étudier le comportement des microorganismes cibles en photocatalyse est équipé de 4 néons de 40 W (Philips Actinic BL TL-K 40 W, de 3,8 cm de diamètre) (figure 23 et figure 24) dont la distance avec la surface à décontaminer peut être modulée (0 à 40 cm). Chaque néon possède une longueur de 57 cm et un diamètre de 3,8 cm, avec un espacement inter-néons de 10 cm (distance de centre à centre des néons). Le spectre d'irradiance de chaque néon est centré sur 365 nm.

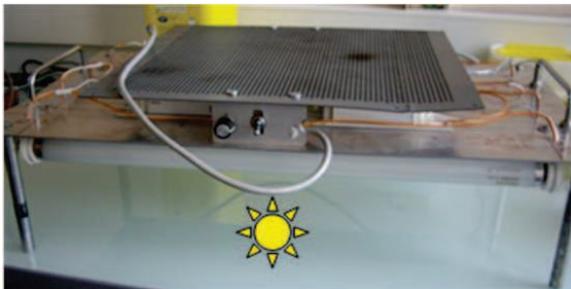


Figure 23 Photographie du dispositif expérimental équipé de 4 néons émettant dans l'UV-A

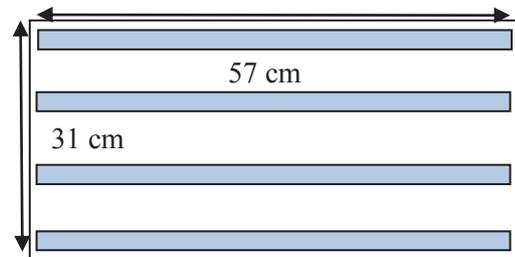


Figure 24 Schéma du dispositif de rayonnement équipé de 4 néons émettant dans l'UV-A

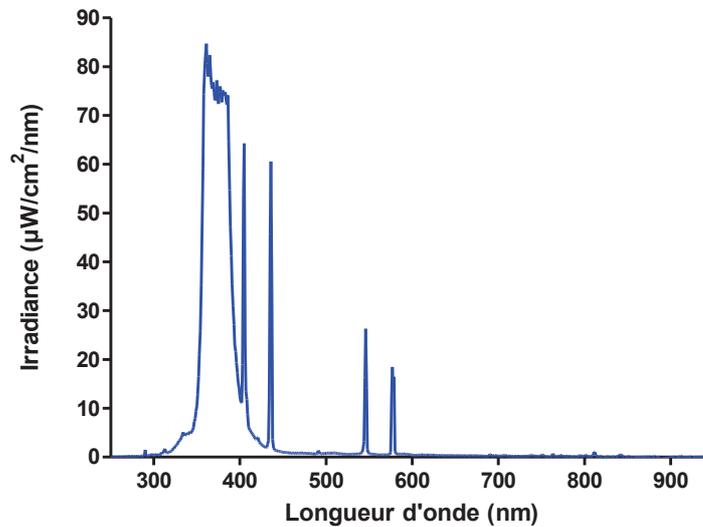
#### 1.2. Mesures d'irradiance

L'irradiance est la puissance d'un rayonnement électromagnétique par unité de surface ( $W/m^2$ ). Les mesures d'irradiance ont été réalisées au radiomètre ILT 900-C de marque International Light Technologie (figure 25), qui permet de déterminer également la distribution spectrale de l'irradiance, c'est-à-dire l'irradiance reçue par une surface en fonction de la longueur d'onde (visible, UV-A, UV-B, UV-C...). Le temps d'intégration a été fixé à 80 ms (moyenne calculée sur 20 scans).



Figure 25 Radiomètre ILT 900-C

La figure 26 présente la distribution spectrale de l'irradiance reçue à une distance de 20 cm des lampes, au centre du dispositif (zone 1, figure 27) ce qui correspond à une irradiance UV-A de l'ordre de  $30 \text{ W/m}^2$ .



**Figure 26** Spectre d'irradiance ( $\mu\text{W}/\text{cm}^2/\text{nm}$ ) au centre du dispositif à 4 néons (zone 1, figure 27) en fonction de la longueur d'onde (nm), correspondant à une irradiance UV-A de l'ordre de  $30 \text{ W/m}^2$ .

L'homogénéité de l'irradiance reçue par les réacteurs durant les tests (localisés au centre du plateau inférieur du dispositif) a été vérifiée en réalisant une cartographie de l'irradiance dans une configuration correspondant à une distance de 20 cm des néons (figure 27). Nous pouvons constater qu'il existe des variations d'irradiance importantes puisqu'au centre du dispositif (zone 1), des irradiances UV-A de  $29$  à  $31 \text{ W/m}^2$  ont été mesurées alors qu'en bord de plaque, les irradiances UV-A mesurées étaient nettement inférieures.

L'ensemble des tests a été réalisé avec une irradiance UV-A reçue de  $27$  à  $31 \text{ W/m}^2$ , puisque les tests ont été mis en œuvre sur la plaque inférieure au centre du dispositif :

- en zone 1 ( $29$  à  $31 \text{ W/m}^2$ ) pour les plaques 6 ou 96 puits ainsi que pour les lames de verre. Nous considérerons par la suite une irradiance de  $30 \text{ W/m}^2$ .
- en zones 1 et 2 ( $27$  à  $31 \text{ W/m}^2$ ) pour les boîtes de Pétri. Lors de l'analyse de la peroxydation lipidique et de l'analyse protéomique, 10 et 8 boîtes ont été placées respectivement sur le plateau d'agitation ce qui recouvre donc l'intégralité du plateau. Nous considérerons également par la suite une irradiance de l'ordre de  $30 \text{ W/m}^2$ .

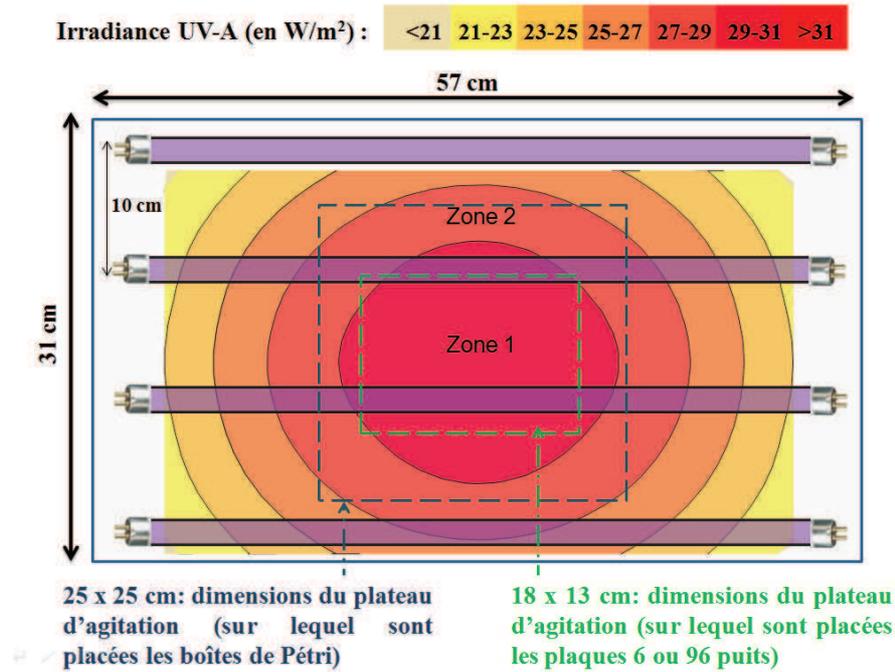


Figure 27 Répartition de l'irradiance UV-A (W/m<sup>2</sup>) reçue par la surface à une distance de 20 cm, dans le cas du dispositif équipé de 4 néons

De façon logique, plus la source lumineuse est éloignée, plus l'irradiance diminue. Pour l'étude du « Screening de l'effet de différents traitements sur le développement d'une vingtaine de microorganismes avec TiO<sub>2</sub> en milieu nutritif » (Chapitre 3 I.1), trois irradiances différentes ont été choisies 60 W/m<sup>2</sup>, 30 W/m<sup>2</sup> et 10 W/m<sup>2</sup>, obtenues respectivement à une distance surface-néons de 6 cm, 20 cm et 40 cm, tandis que toutes les autres études des chapitres 3 et 4 ont été réalisées avec une irradiance de 30 W/m<sup>2</sup> soit une distance néon-échantillon de 20 cm.

L'influence de l'éloignement de la source lumineuse a été étudiée et la figure 28 indique l'irradiance UV-A reçue au centre du dispositif (zone 1) en fonction de l'éloignement de la source.

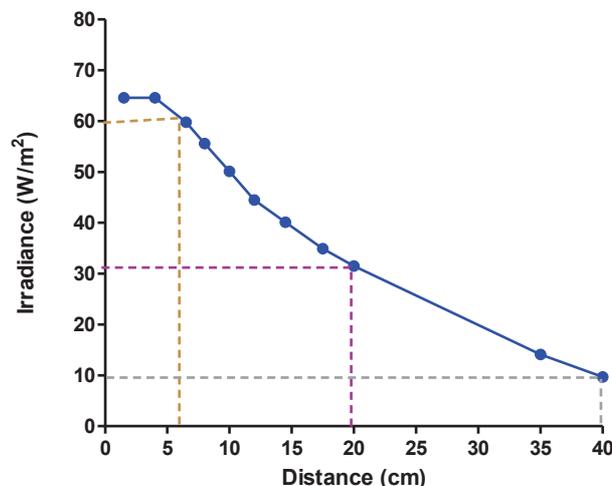


Figure 28 Mesure de l'irradiance UV-A (W/m<sup>2</sup>) au centre du dispositif à 4 néons en fonction de la distance à la source lumineuse (cm)

## 2. Chambre solaire

Une chambre solaire SUNTEST XLS+ (ATLAS, figure 29) a été utilisée pour l'étude des textiles photocatalytiques auto-décontaminants. Cette enceinte fermée est équipée d'une lampe au xénon qui permet de simuler la lumière solaire extérieure ou derrière un vitrage.

La distribution spectrale des lampes au xénon est très similaire à celle de la lumière solaire naturelle dans les régions UV et visible du spectre (figure 30). Elle contient également une partie importante



Figure 29 Chambre solaire SUNTEST XLS+ (ATLAS)

d'infrarouge et des longueurs d'ondes plus courtes que celles du rayonnement solaire au niveau du sol. C'est pourquoi la lumière émise par les lampes au xénon doit être filtrée correctement de manière à éliminer les longueurs d'ondes indésirables afin de simuler au plus près l'éclairement reçu par un produit lors de son utilisation réelle.<sup>257</sup>

Les expériences ont été réalisées en sélectionnant le « filtre lumière du jour » associées à une irradiance totale mesurée de  $242 \text{ W/m}^2$  pour la gamme des longueurs d'onde de 300 à 800 nm. Sur cette irradiance totale de  $242 \text{ W/m}^2$ , 6,6 % de l'irradiance correspond à du rayonnement UV-A ( $\lambda$  de 315 à 400 nm) et moins de 0,1 % correspond à du rayonnement UV-B ( $\lambda$  de 280 à 320 nm) (tableau 13).

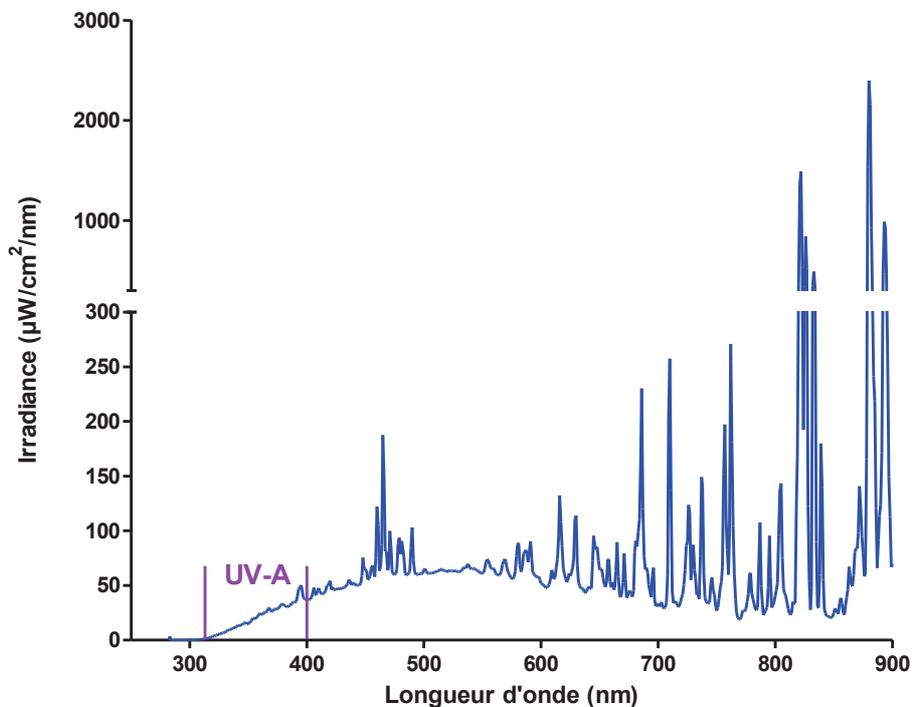


Figure 30 Eclairement spectral ( $\mu\text{W}/\text{cm}^2/\text{nm}$ ) de la chambre solaire en fonction de la longueur d'onde (nm)

<sup>257</sup> [http://www.atlasmemory.com/shopdownloads/8/Suntest\\_Family\\_F\\_11\\_2004\\_Final.pdf](http://www.atlasmemory.com/shopdownloads/8/Suntest_Family_F_11_2004_Final.pdf) consulté le 1 octobre 2012

Tableau 13 Irradiances associées au filtre lumière du jour en fonction des longueurs d'onde (en nm)

Domaine	Longueurs d'onde (nm)	Irradiance (W/m <sup>2</sup> )
UV-C	200 à 280 nm	0
UV-B	280 à 320 nm	0,2
UV-A	320 à 400 nm	16
Visible	400 à 800 nm	226
Irradiance totale	200 à 800 nm	242

Des mesures de répartition de l'irradiance pour des  $\lambda$  de 300 à 800 nm ont été réalisées en différents points de la surface inférieure de la chambre solaire (figure 31). Les irradiances les plus élevées (comprises entre 224 et 250 W/m<sup>2</sup>) ont été mesurées directement à la verticale de la lampe au xénon. Bien que la chambre soit équipée d'un système réflecteur de rayonnement en aluminium, nous pouvons cependant constater d'importantes variations d'irradiances puisque nous avons mesuré des irradiances allant de 120 à 250 W/m<sup>2</sup>. De ce fait, il était primordial de sélectionner une zone où l'irradiance était la plus homogène possible. Comme mentionné dans le paragraphe d'introduction de ce chapitre, la chambre solaire n'a été utilisée que lors de « l'étude de l'évaluation antibactérienne sur textiles ». Dans ce cas les échantillons de textile déposés dans des plaques 6 puits ont été placés sur la surface inférieure de la chambre et exposés à une irradiance totale comprise entre 224 et 250 W/m<sup>2</sup>.

Afin de maintenir une température adéquate pour les microorganismes (maximum de 40°C), un plateau refroidi par circulation d'eau a été ajouté sous la chambre de test, soit en dessous de la plaque 6 puits. La température dans la chambre et au niveau de la surface intérieure a ainsi été maintenue à environ 33-35°C.

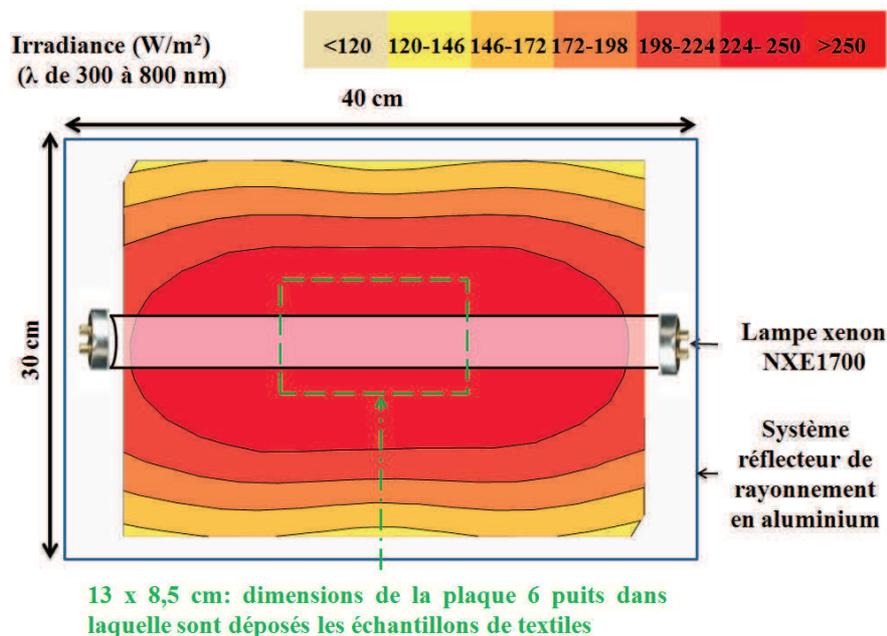


Figure 31 Mesure de l'irradiance reçue (W/m<sup>2</sup>/nm) au niveau du plateau aluminium en différents points de la chambre solaire

### **3. Réacteurs, surfaces et milieux photocatalytiques**

Dans les chapitres 3 et 4, différents types de réacteurs, surfaces et « milieux » photocatalytiques sont utilisés. Ils seront donc détaillés directement dans chaque partie, c'est-à-dire au plus près des modes opératoires utilisés. Ils sont de trois sortes :

- des surfaces photocatalytiques sèches, consistant en un revêtement de TiO<sub>2</sub> sur une lamelle de microscope en verre (Chapitre 3 I.2.)
- des milieux gélosés nutritifs pour lesquels TiO<sub>2</sub> est mélangé à de la gélose Mueller Hinton (Chapitre 3 I.1.)
- des réacteurs photocatalytique en phase liquide, maintenus sous agitation orbitaire, consistant soit en :
  - des puits de plaque 6 puits pour la mise en évidence des radicaux anions superoxydes O<sub>2</sub><sup>•-</sup> par chimiluminescence et leur implication dans l'effet antibactérien (Chapitre 4 I.)
  - des puits de plaque 96 puits pour la détermination de la viabilité cellulaire en milieu liquide (Chapitre 3 II.)
  - des boîtes de Pétri, pour la détermination de l'action des ROS sur les lipides (Chapitre 4 II.), et pour l'étude des modifications protéiques par électrophorèse bi-dimensionnelle couplée à de la spectrométrie de masse (Chapitre 4 III.).

### III. Présentation des bactéries sélectionnées pour notre étude multi-environnementale

Les microorganismes sélectionnés (bactéries, levure, champignon – tableau 14) dans cette thèse ont été choisis pour leur implication dans les **pathologies humaines** (gastro-entérites, infections pulmonaires, infections uro-génitales, ostéo-articulaires, oculaires, cutanées, septicémie, entérite, endocardites...) et/ou les **infections nosocomiales**. Certaines espèces bactériennes ont également été sélectionnées afin de mimer des souches pouvant être utilisées lors d'attaques **bioterroristes**.

Tableau 14 Quelques caractéristiques des microorganismes sélectionnés

Microorganismes	Pathologies humaines	Infections nosocomiales	Vecteur de transmission	Bioterrorisme
<b>Bactéries à Gram négatif</b>				
<i>Escherichia coli</i>	+	+	matières fécales	
<i>Enterobacter cloacae</i>	+	+	contact	
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	+	+	air	
<i>Salmonella</i> Abony	+	/	aliments	Typhi ou Paratyphi
<i>Yersinia enterocolitica</i>	+	/	aliments	<i>pestis</i>
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	+	+	eau, contact	
<i>Vibrio cholerae</i>	+	/	eau	souche toxigène de <i>V.cholerae</i>
<i>Acinetobacter baumannii</i>	+	+	eau, air, contact	
<i>Aeromonas hydrophila</i>	+		air et eau	
<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	+	+	eau, contact	
<b>Bactéries à Gram positif</b>				
<i>Staphylococcus aureus</i>	+	+	contact humain	
<i>Staphylococcus aureus</i> résistant à la méticilline	+	+	contact humain	
<i>Bacillus cereus</i>	+	/	forme sporulée, aliment, sol	<i>anthracis</i>
<i>Bacillus subtilis</i>	/	/	forme sporulée, sol	<i>anthracis</i>
<i>Enterococcus faecalis</i>	+	+	eau, contact	
<i>Enterococcus faecium</i>	+	+	eau, contact	
<i>Kytococcus sedentarius</i>	/	/	air, contact	
<b>Levure</b>				
<i>Candida albicans</i>	+	/	contact	
<b>Champignon</b>				
<i>Aspergillus brasiliensis</i>	+/-	/	sol, air	

## IV. Préparation d'une suspension bactérienne

Cette partie décrit le mode opératoire pour la préparation des suspensions bactériennes qui sont ensuite utilisés pour les études menées dans les chapitres 3 et 4 portant sur « l'évaluation de l'action antimicrobienne de la photocatalyse sur surface et en milieu liquide » et sur « l'étude des mécanismes d'oxydation ainsi que leur effet sur les différents composants cellulaires après traitements photocatalytiques ».

Afin d'avoir des cultures « en phase de croissance » lors des expériences, il est indispensable de repiquer les bactéries la veille de la manipulation sur une gélose en pente Trypticase Soja (TS) à l'aide d'une oëse, puis de placer l'ensemble en culture à 37°C pendant 24 h.

Ensuite, pour préparer la suspension bactérienne, on utilise un tube en pyrex stérile dans lequel on introduit environ 5 mL d'eau physiologique (eau  $\phi$ ) qui correspond au blanc (la valeur 0,000) du spectrophotomètre. Une fois le blanc réglé, on prélève à l'aide d'une oëse quelques bactéries cultivées la veille sur gélose en pente TS. On vortexe la suspension bactérienne et on mesure la densité optique (DO) à 620 nm jusqu'à obtenir celle désirée. Afin d'obtenir une population bactérienne de l'ordre de 1 à  $3.10^8$  UFC/mL, la DO doit être de 0,156 (à  $\pm 0,004$ ) pour les bacilles et de l'ordre de 0,300 (à  $\pm 0,004$ ) pour les coques (figure 32).

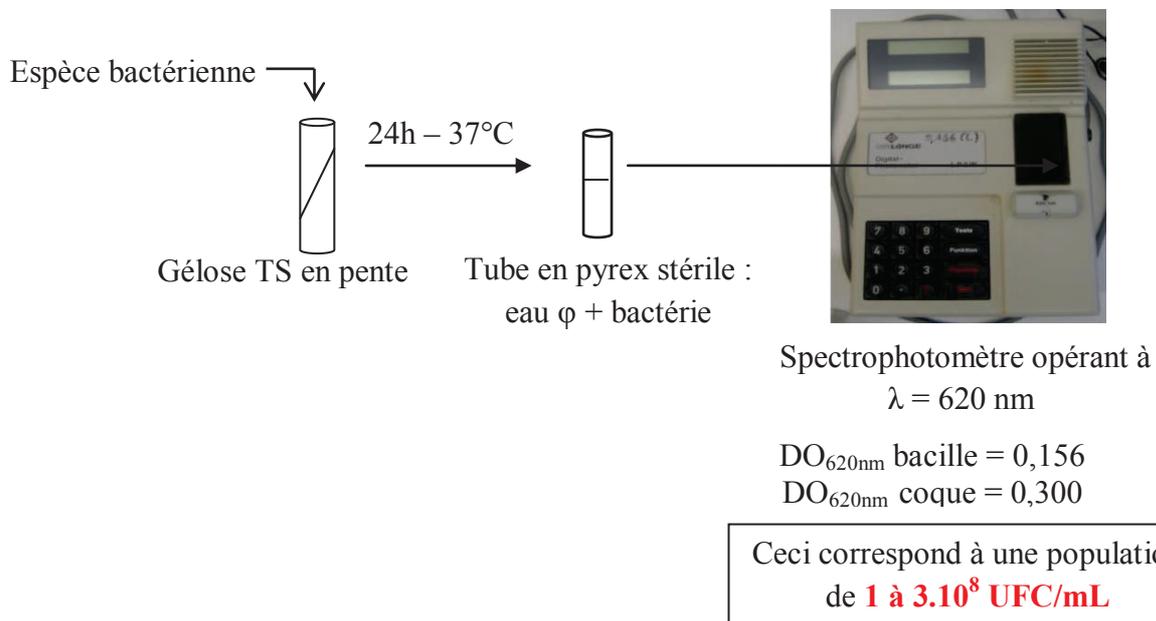


Figure 32 Préparation de la suspension bactérienne par mesure de la DO à 620 nm à l'aide d'un spectrophotomètre

## V. Analyse statistique

Toutes les expériences ont été réalisées au minimum 3 fois ( $n=3$ ). Afin de comparer les moyennes des différences de 2 séries de mesures, nous avons utilisés le **test  $t$  de student** à l'aide du logiciel Graphpad Prism.

**Ce test a été utilisé pour toutes les expériences sauf dans le cas de « l'évaluation de l'activité antimicrobienne de la photocatalyse en milieu liquide (Chapitre 3 II)** où nous avons utilisés une **analyse one way Anova** suivie d'un test de Tukey. Cette dernière permet l'analyse des variances à un seul facteur dans différents « groupes » et compare les moyennes 2 à 2. Le test Anova est plus strict que le test  $t$  de student car dans le test Anova l'analyse de la variance tient compte de la variabilité dûe aux écarts entre les moyennes des différentes modalités d'un facteur (Inter groupe) et la variabilité résiduelle (Intra groupe) dûe à l'erreur expérimentale provenant des répétitions. Certains résultats de la section II. du Chapitre 3 intitulée « Etude en milieu liquide » ayant déjà été publiés avec ce test, toutes les analyses de cette section ont été réalisées avec ce test.

Pour le test  $t$  de student et l'analyse one way Anova, il existe différents degrés de significativité avec :

- une étoile \* équivalent à un test significatif à 95,0 % (**P < 0,05**)
- deux étoiles\*\* équivalent à un test plus significatif, à 99,0 % (**P < 0,01**)
- trois étoiles \*\*\* équivalent à un test encore plus significatif, à 99,9 % (**P < 0,001**)

## **Chapitre 3 : Evaluation de l'action antimicrobienne de la photocatalyse sur surface et en milieu liquide**

Ce **troisième chapitre** est consacré à la **détermination de l'efficacité antimicrobienne de la photocatalyse sur TiO<sub>2</sub> dans différents milieux, représentatifs de différentes conditions opératoires et de différentes applications**. Nous avons ainsi choisi de mener cette évaluation de l'efficacité antimicrobienne de TiO<sub>2</sub> sur surface (TiO<sub>2</sub> en milieu nutritif riche ou en milieu sec *i.e.* pauvre), et en phase liquide.

De ce fait, **différents modes d'évaluation** seront mis en œuvre, en faisant varier nécessairement la **méthode de test** et la **méthode de comptage**.

Ce chapitre sera subdivisé en deux avec **premièrement** les études menées lors du **dépôt de TiO<sub>2</sub> sur surface**. Réalisées sur un panel d'une vingtaine d'espèces bactériennes, les efficacités de réduction photocatalytique de TiO<sub>2</sub> seront ainsi appréciées sur deux types de surfaces différant dans leur composition et leur nature.

Dans le premier cas, TiO<sub>2</sub> est ajouté à une **surface gélosé nutritive**, ce qui en fait un modèle d'étude approprié pour la simulation d'environnements riches en nutriments. Cette première étude de screening est multi-paramètres, et permettra d'ores et déjà de choisir pour la suite des travaux, certains paramètres inhérents au traitement photocatalytique comme l'irradiance UV-A à appliquer.

Dans le second cas, TiO<sub>2</sub> est déposé sur **surface sèche inerte** de sorte que le revêtement de TiO<sub>2</sub> constitue ainsi un modèle d'étude caractéristique des surfaces « pauvres » ou « sèches » ; cette étude ayant été menée avec une échelle d'appréciation de l'efficacité de réduction logarithmique plus importante que dans le premier cas.

A la fin de ce premier sous-chapitre, des explications seront apportées quant aux différences de réduction observées en tenant compte des modes de test et des paramètres sélectionnés. La comparaison des résultats vis-à-vis des différentes surfaces mettra notamment en évidence l'importance de la structure microbienne ainsi que le biotope d'origine des bactéries sur l'efficacité de réduction.

Un autre type d'environnement sera considéré puisque dans la **deuxième partie de ce chapitre**, la décontamination sera réalisée **en phase liquide (aqueuse), TiO<sub>2</sub> étant mis en suspension avec les microorganismes**. Cette fois-ci il n'y aura pas de variation de la composition en nutriments, mais les efficacités de réduction seront appréciées par deux méthodes d'évaluation différentes à savoir par la technique de **cytométrie capillaire** et par la technique classique de **dénombrement sur milieu gélosé**.

La cytométrie capillaire permettra également d'apprécier les phénomènes d'agrégation entre le TiO<sub>2</sub> et les bactéries. Après avoir réalisée par cytométrie capillaire une évaluation de l'efficacité des traitements appliqués sur l'intégrité membranaire, les résultats obtenus seront comparés aux résultats de dénombrement sur milieu gélosé. Les différences de résultats observées seront discutées.

## **I. Etude sur surface**

Cette partie vise à évaluer/déterminer l'efficacité antimicrobienne photocatalytique de TiO<sub>2</sub> sur surface. Elle est divisée en deux sous-parties avec :

- une étude réalisée avec dépôt de TiO<sub>2</sub> sur surface en milieu nutritif, ces conditions étant représentatives d'un environnement riche en nutriments
- une étude réalisée avec dépôt de TiO<sub>2</sub> sur lame de verre, ces conditions et le revêtement de TiO<sub>2</sub> obtenu étant représentatifs de revêtements de surface « pauvres » (ou « secs »).

### **1. Screening de l'effet de différents traitements sur le développement d'une vingtaine de microorganismes avec TiO<sub>2</sub> en milieu nutritif**

Le monde microbien est très hétérogène (bactéries sous forme végétative, sporulée, virus, champignons...) et ces microorganismes sont plus ou moins sensibles aux stress (stress UV, stress oxydatif...).<sup>258</sup> Tandis que de nombreux articles de décontamination en photocatalyse sont effectuées sur *E.coli*,<sup>259,260,261</sup> souche indicatrice de contamination fécale, nous avons sélectionné un panel de 20 microorganismes pour l'étude de l'action de la photocatalyse en milieu nutritif solide, en ciblant des microorganismes mimant des agents retrouvés en milieu médical ou des microorganismes mimant des agents pouvant être impliqués dans le bioterrorisme... **Cette étude multiparamétrique est basée sur des critères visuels (croissance, faible croissance, absence de croissance)**. Ainsi dans une première partie quelques photographies des principaux résultats obtenus seront présentées, puis s'ensuivra un tableau croisé représentant en pourcentage les résultats de croissance établis sur six expériences, en fonction des différents paramètres étudiés. Enfin un tableau synthétique sera présenté dans la dernière partie de cette étude de screening de l'action photocatalytique sur milieu gélosé.

#### **1.1. Préparation des tests et modes opératoires**

Dans le cadre de cette étude, les vingt microorganismes sélectionnés (tableau 16) ont été testés en fonction de différents paramètres opératoires pouvant influencer sur l'action photocatalytique comme la concentration en TiO<sub>2</sub>, l'irradiance ou la quantité de microorganismes déposés.

Les tests sont réalisés en déposant les microorganismes sur une double couche de TiO<sub>2</sub>/gélose Mueller Hinton (MH) préalablement coulée sur un milieu gélosé MH.

---

<sup>258</sup> Vorob'eva LI: **Stressors, stress reactions, and survival of bacteria (a review)**. *Prikl Biokhim Mikrobiol* 2004, **40**(3):261-269.

<sup>259</sup> Foster HA, Ditta IB, Varghese S, Steele A: **Photocatalytic disinfection using titanium dioxide: spectrum and mechanism of antimicrobial activity**. *Applied microbiology and biotechnology* 2011, **90**(6):1847-1868.

<sup>260</sup> Dalrymple OK, Stefanakos E, Trotz MA, Gowami DY: **A review of the mechanisms and modeling of photocatalytic disinfection**. *Applied Catalysis B: Environmental* 2010, **98**:27-38.

<sup>261</sup> Josset S, Keller N, Lett MC, Ledoux MJ, Keller V: **Numeration methods for targeting photoactive materials in the UV-A photocatalytic removal of microorganisms**. *Chemical Society reviews* 2008, **37**(4):744-755.

### **Préparation des milieux gélosés MH recouverts d'une double couche de TiO<sub>2</sub>/MH**

Différentes quantités de TiO<sub>2</sub>, 31,8 ; 63,6 ; 127,2 et 254,4 mg de TiO<sub>2</sub> correspondant respectivement à des densités surfaciques théoriques de **0,5 ; 1 ; 2 et 4 mg/cm<sup>2</sup>** ont été déposées sur milieu gélosé MH (Biokar Diagnostics) (préalablement coulé en boîte de Pétri) à l'aide de la technique de double couche (tableau 15).

Pour ce faire, cette double couche (de volume 6 mL) contenant le TiO<sub>2</sub> et le milieu MH est ajoutée après prise en masse de la première couche de milieu gélosé MH. Elle est autoclavée puis directement coulée. Ce dépôt de 6 mL sur 63,62 cm<sup>2</sup> ( $\pi r^2 = \pi \times (4,5)^2 = 63,62 \text{ cm}^2$ ) par boîte correspond à un dépôt de 0,094 mL/cm<sup>2</sup>.

TiO<sub>2</sub> étant réparti dans le volume de la couche supérieure, on continuera cependant à parler de densité surfacique ou de dépôt de TiO<sub>2</sub> en mg/cm<sup>2</sup>, par abus de langage.

**Tableau 15 Différentes compositions en TiO<sub>2</sub> (g) pour 100 mL de milieu à 7,6 g de gélose MH**

Dépôt de TiO <sub>2</sub> (mg/cm <sup>2</sup> )	Masse de TiO <sub>2</sub> (g)	Masse de MH (g)	Eau (mL)
0,5	0,530		
1	1,060		
2	2,120	7,6 g	100
4	4,240		

### **Préparation des espèces bactériennes**

A partir de chaque suspension bactérienne préparée comme décrit dans le chapitre 2 IV, des dépôts de 10 µL à **10 000 UFC**, **1000 UFC** et **100 UFC** sont réalisés par l'inoculateur multipoint Denley (figure 33) selon le protocole suivant.

Après préparation de la suspension bactérienne à 10<sup>8</sup> UFC/mL, une dilution au centième est réalisée dans de l'eau φ. 1 mL de chaque suspension bactérienne est transféré dans un godet. Après avoir placé la boîte comme présentée sur la figure 34, 10 µL sont prélevés (soit un dépôt de 10 000 UFC) et déposés sur quatre boîtes de milieu gélosé MH (sans TiO<sub>2</sub>) et de 16 boîtes de milieu gélosé MH additionné de TiO<sub>2</sub> (pour chaque concentration en TiO<sub>2</sub>, 4 boîtes sont préparées). Ainsi, 20 boîtes ont été réalisées avec ce dépôt à 10 000 UFC/spot.

Nous avons procédé de même avec d'autres dilutions pour les dépôts de 1000 UFC et de 100 UFC.



Figure 33 Inoculateur multipoint

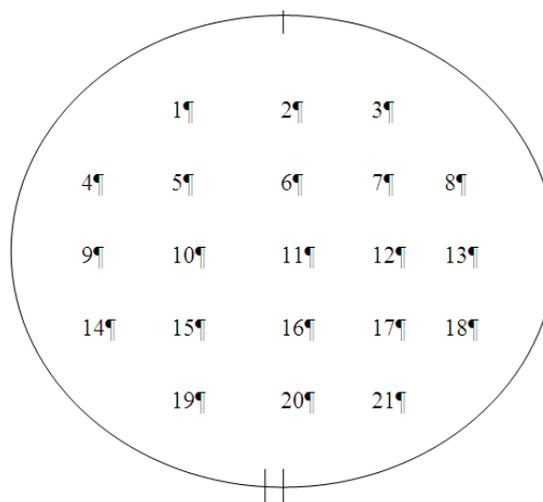


Figure 34 Localisation des spots sur la boîte de Pétri

Tableau 16 Liste des espèces bactériennes utilisées avec le n° du spot correspondant et référence de la souche ou origine

N°	Espèce bactérienne	ATCC	CIP <sup>262</sup>	Autres
1	<i>Bacillus cereus</i> (spore)	/	/	labo. UMR 7213
2	<i>Bacillus cereus</i> (végétative)	/	/	labo. UMR 7213
3	<i>Enterobacter cloacae</i>	/	/	labo. UMR 7213
4	<i>Enterococcus faecalis</i>	ATCC 29212	CIP 103214	
5	<i>Escherichia coli</i>	ATCC 25922	CIP 53126	
6	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	/	/	labo. UMR 7213
7	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	ATCC 9027	CIP 82118	
8	<i>Acinetobacter baumannii</i>	ATCC 19606	CIP 7034	
9	<i>Bacillus subtilis</i> (spore)	ATCC 9372	CIP 7718	
10	<i>Bacillus subtilis</i> (végétative)	ATCC 9372	CIP 7718	
11	<i>Enterococcus faecium</i>	/	/	IRH
12	<i>Salmonella</i> Abony		CIP 8039	
13	<i>Staphylococcus aureus</i>	ATCC 6538	CIP 4.83	
14	<i>Staphylococcus aureus</i> résistant à la méticilline	/	/	CHU
15	<i>Yersinia enterocolitica</i>	/	/	labo. UMR 7213
16	<i>Vibrio cholerae</i>	/	/	CHU
17	<i>Kytococcus sedentarius</i>	/	/	labo. UMR 7213
18	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	/	/	labo. UMR 7213
19	<i>Shigella sonnei</i>	/	/	CHU
20	<i>Aeromonas hydrophila</i>		CIP 7430	
21	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	/	/	CHU

ATCC : American Type Culture Collection; CIP : Collection de l'Institut Pasteur ; IRH : Institut de Recherche Hydrologique de Strasbourg ; CHU : Centre Hospitalier Universitaire de Strasbourg ; labo. UMR 7213 : laboratoire de la Faculté de Pharmacie, UMR 7213

<sup>262</sup> Grimont P, Bizet C, Barreau C, Quilici ML: **Collection of bacterial strains of Institut Pasteur**; 1994.

### Conditions photocatalytiques

Les tests ont été réalisés avec des densités surfaciques de TiO<sub>2</sub> de **0,5 ; 1 ; 2 et 4 mg/cm<sup>2</sup>** et des irradiances UV-A de **10 W/m<sup>2</sup>, 30 W/m<sup>2</sup> et 60 W/m<sup>2</sup>**, obtenues respectivement pour des distances de lampes-surface de 40 cm, 20 cm et 6 cm. Des tests « blancs » dans des conditions « sans irradiation » ont également été effectués. Les tests ont été réalisés pour des durées de 60 min.

### Critères d'évaluation

Après incubation de 24 h à 37°C, les boîtes sont observées. Basés sur des critères visuels, les critères d'évaluation utilisés sont les suivants :

- +++ : développement identique au contrôle (c'est-à-dire sans TiO<sub>2</sub> et sans rayonnement)
- ++ : diminution de la croissance par rapport au témoin
- + : forte diminution de croissance par rapport au témoin
- - : absence de développement

Afin d'évaluer cet effet photocatalytique et d'établir des moyennes sur différentes expériences, cette notation a été transformée en pourcentage : soit 100 %, 66 %, 33 % et 0 % pour respectivement +++, ++, + et -.

*Remarque : il s'agit ici d'une analyse visuelle, l'interprétation peut donc varier d'un individu à l'autre. Afin de minimiser cet effet, l'analyse a été réalisée par deux personnes.*

Pour résumer, quatre concentrations en TiO<sub>2</sub> sont testées en double couche sur milieu gélosé nutritif Mueller Hinton. (**0,5 ; 1 ; 2 et 4 mg/cm<sup>2</sup>**) et trois **irradiances** ont été retenues (**10 ; 30 et 60 W/m<sup>2</sup>**) pour une durée d'exposition au rayonnement de 60 min. Le paramètre « **quantité initiale de l'inoculum** » (**100, 1000 et 10000 UFC**) a également été pris en compte.

Ainsi, pour chaque condition opératoire on parlera de :

- l'effet du rayonnement
- l'effet cytotoxique du TiO<sub>2</sub> (effet du TiO<sub>2</sub> seul)
- l'effet du TiO<sub>2</sub> irradié (TiO<sub>2</sub> + rayonnement) que l'on appellera par abus de langage « **effet photocatalytique du TiO<sub>2</sub>** » et qui correspond à l'efficacité du traitement photocatalytique

Tous ces résultats seront synthétisés dans le tableau 17.

## 1.2. Influence des paramètres : irradiance UV-A et concentration en TiO<sub>2</sub>

Dans cette première partie, nous étudions l'influence de l'irradiance UV-A et de la concentration (densité surfacique) en TiO<sub>2</sub> sur l'efficacité d'inactivation antimicrobienne. Chaque paramètre est indépendant de l'autre.

### Influence de l'irradiance sur l'efficacité d'inactivation antimicrobienne pour un dépôt de TiO<sub>2</sub> de densité surfacique 4 mg/cm<sup>2</sup>

En présence d'un dépôt de TiO<sub>2</sub> de concentration 4 mg/cm<sup>2</sup> avec une contamination initiale par espèce microbienne de l'ordre de 10 000 UFC et une durée de test de 60 min (sous rayonnement ou à l'obscurité), nous avons obtenu les résultats suivants :

Dans cette étude, on considère tout d'abord la **sensibilité du microorganisme** par rapport à la **présence** ou à l'**absence de spots**. Il s'agit ainsi d'une **analyse qualitative** visuelle.

#### Témoin

Notons d'ores et déjà que les formes sporulées de *B.cereus* (spot n°1) ne se sont pas développées sur la boîte témoin (sans rayonnement, sans TiO<sub>2</sub>). Ce constat est également valable quel que soit l'inoculum testé. En revanche, pour tous les autres microorganismes, nous pouvons observer un développement (figure 35(a)).

#### Effet du rayonnement

Espèces sensibles au rayonnement ne présentant pas de croissance ou une faible croissance :

- à 10 W/m<sup>2</sup> : 3 espèces touchées *A.baumannii* (8), *V.cholerae* (16), *A.hydrophila* (20)
- à 30 W/m<sup>2</sup> : 5 espèces touchées *A.baumannii* (8), *B.subtilis* (végétatif) (10), *V.cholerae* (16), *Staphylococcus epidermidis* (18), *Aeromonas hydrophila* (20)
- à 60 W/m<sup>2</sup> : 10 espèces touchées *B.cereus* (végétatif) (2), *P.aeruginosa* (7), *A.baumannii* (8), *B.subtilis* (végétatif) (10), SARM (14), *Y.enterocolitica* (15), *V.cholerae* (16), *K.sedentarius* (17), *S.epidermidis* (18), *A.hydrophila* (20) (figure 35 (b)).

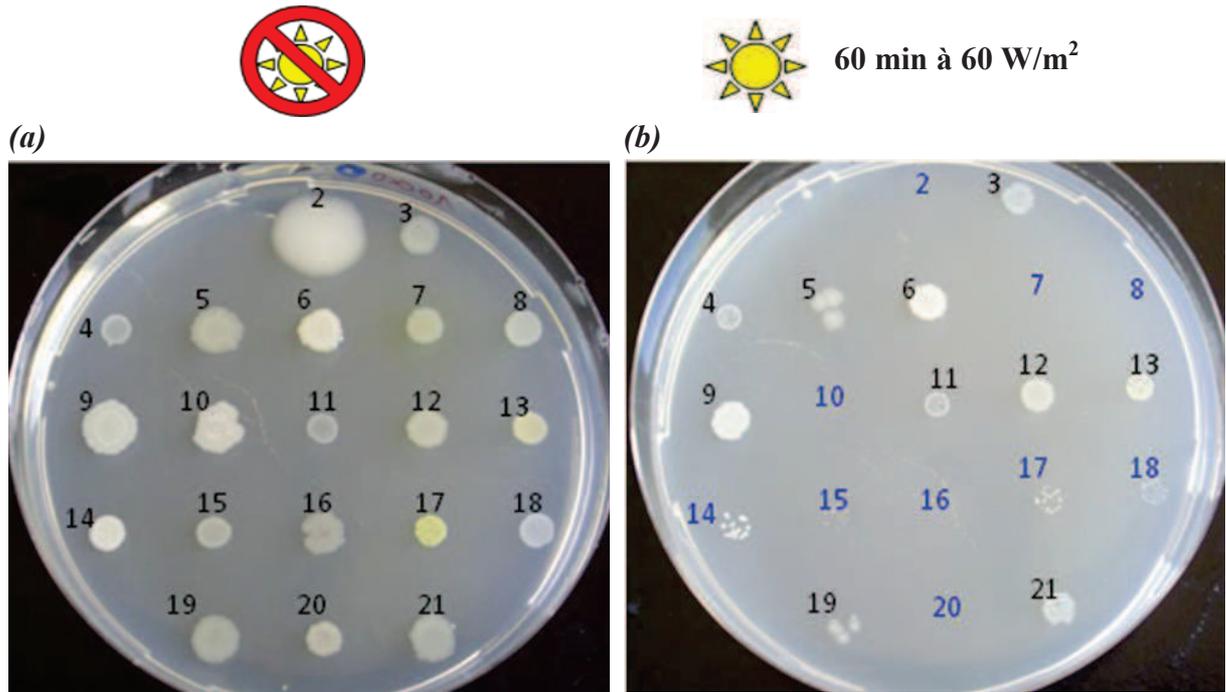


Figure 35 Effet du rayonnement UV-A sur un inoculum initial d'environ 10 000 UFC. Témoin (sans UV-A, sans TiO<sub>2</sub>) (a), effet du rayonnement (60 min de rayonnement UV-A à 60 W/m<sup>2</sup> sans TiO<sub>2</sub>) (b)

#### Effet cytotoxique du TiO<sub>2</sub>

Espèce sensible à l'effet cytotoxique du TiO<sub>2</sub> dans le cas d'un dépôt de TiO<sub>2</sub> de densité surfacique 4 mg/cm<sup>2</sup> : *Y.enterocolitica* (15) (figure 36 (a)).

#### Effet photocatalytique du TiO<sub>2</sub>

Espèces sensibles à la photocatalyse dans le cas d'un dépôt de TiO<sub>2</sub> de densité surfacique 4 mg/cm<sup>2</sup> :

- à 10 W/m<sup>2</sup> : 2 espèces touchées *V.cholerae* (16) et *K.sedentarius* (17) (figure 36 (b))
- à 30 W/m<sup>2</sup> : 6 espèces touchées les formes végétatives de *B.cereus* (2) et *B.subtilis* (10), *Y.enterocolitica* (15), *V.cholerae* (16), *K.sedentarius* (17) et *S.epidermidis* (18) (figure 36 (c))
- à 60 W/m<sup>2</sup> : 10 espèces touchées les formes végétatives de *B.cereus* (2) et *B.subtilis* (10), *E.faecalis* (4), *E.coli* (5), *E.faecium* (11), *S.aureus* (13), SARM (14), *Y.enterocolitica* (15), *S.epidermidis* (18) et *S.sonnei* (19) (figure 36 (d)).

#### Effet protecteur du TiO<sub>2</sub> sur la croissance microbienne

Tandis que la croissance d'*A.baumannii* (8) et d'*A.hydrophila* (20) diminue pour un rayonnement de 60 min à 10 W/m<sup>2</sup>, on observe une croissance significative pour ces 2 espèces (figure 36 (b)) en présence de TiO<sub>2</sub> à 4 mg/cm<sup>2</sup> et ce pour la même dose de rayonnement appliquée. Cet effet protecteur du TiO<sub>2</sub> sur la croissance bactérienne est surprenant et nous ne savons expliquer ce phénomène.

En conclusion, nous pouvons dire qu'il existe une **relation entre l'irradiance reçue et l'inhibition de croissance des microorganismes** pour une même concentration en  $\text{TiO}_2$  : **plus l'irradiance UV-A appliquée est élevée, plus le développement sur milieu gélosé est perturbé**, dans le sens où le nombre d'espèces microbiennes touchées augmente.

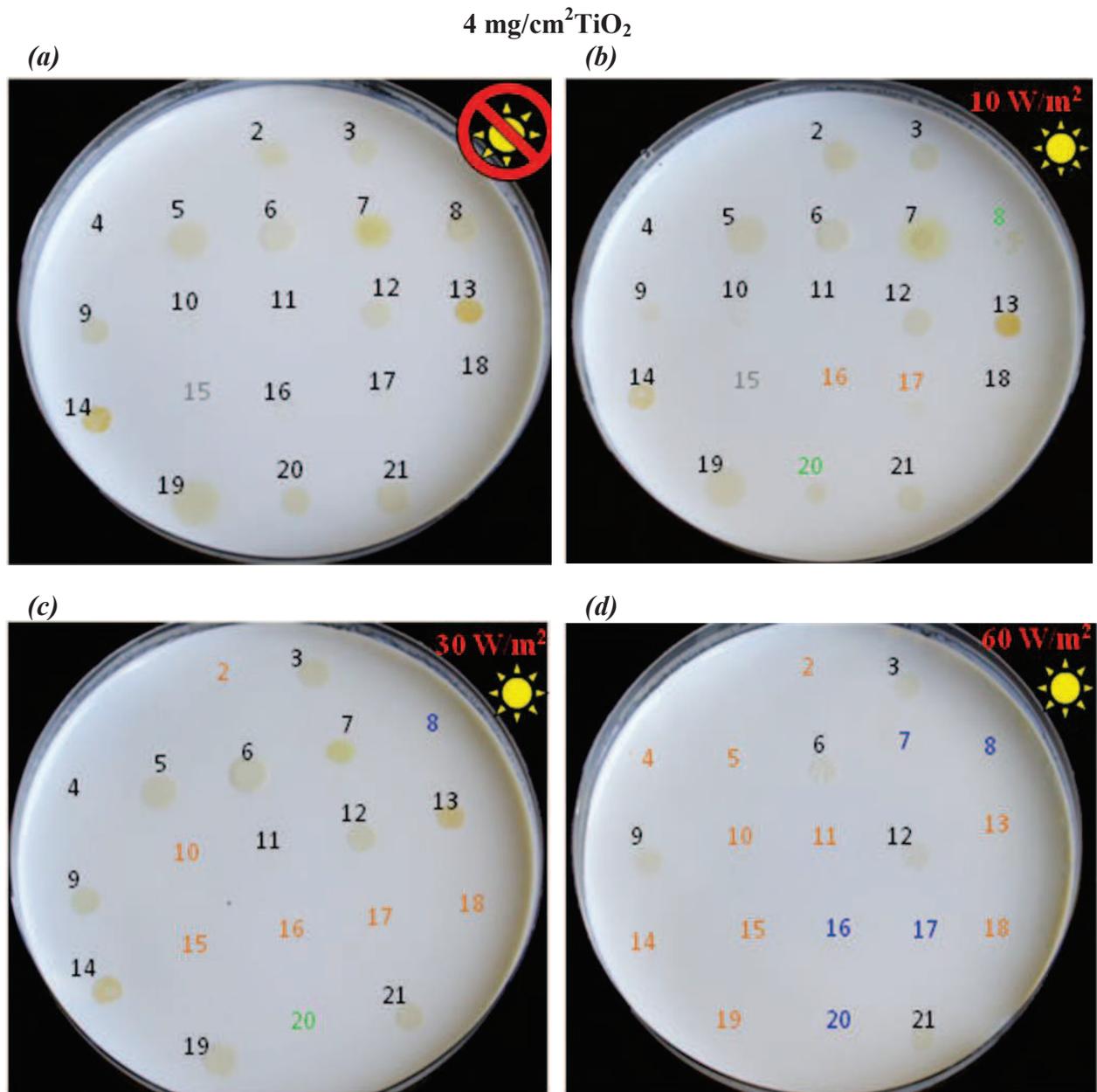


Figure 36 Influence de l'irradiance sur l'efficacité de l'action photocatalytique (pour un dépôt de  $\text{TiO}_2$  de l'ordre de  $4 \text{ mg/cm}^2$ ) avec un inoculum initial d'environ 10 000 UFC. Effet cytotoxique du  $\text{TiO}_2$  ( $4 \text{ mg/cm}^2$ ) (a), effet photocatalytique pour une irradiance de 10, 30 et  $60 \text{ W/m}^2$ , respectivement (b), (c) et (d)

### **Influence de la densité surfacique en TiO<sub>2</sub> sur l'efficacité d'inactivation antimicrobienne**

L'efficacité d'inactivation antimicrobienne a été étudiée avec un même taux de contamination initial (10 000 UFC) pour des densités surfaciques de TiO<sub>2</sub> de 0,5 mg/cm<sup>2</sup> ; 1 mg/cm<sup>2</sup> ; 2 mg/cm<sup>2</sup> et 4 mg/cm<sup>2</sup> et pour une irradiance de 60 W/m<sup>2</sup> pendant 60 min. Nous avons obtenu les résultats suivants :

#### **Effet du rayonnement**

Espèces sensibles au rayonnement à 60 W/m<sup>2</sup> : 10 espèces touchées *B.cereus* (végétatif) (2), *P.aeruginosa* (7), *A.baumannii* (8), *B.subtilis* (végétatif) (10), SARM (14), *Y.enterocolitica* (15), *V.cholerae* (16), *K.sedentarius* (17), *S.epidermidis* (18), *A.hydrophila* (20) (figure 35 (b)).

#### **Effet cytotoxique du TiO<sub>2</sub>**

Espèces sensibles à l'effet cytotoxique du TiO<sub>2</sub> avec un dépôt de densité surfacique en TiO<sub>2</sub> :

- à 0,5 mg/cm<sup>2</sup>, 1 mg/cm<sup>2</sup> et 2 mg/cm<sup>2</sup>: aucune espèce sensible
- à 4 mg/cm<sup>2</sup>: *Y. enterocolitica* (15) (figure 36 (a)).

#### **Effet photocatalytique du TiO<sub>2</sub>**

Espèces sensibles à la photocatalyse avec un dépôt de densité surfacique en TiO<sub>2</sub> :

- à 0,5 mg/cm<sup>2</sup>: 6 espèces touchées *E.faecalis* (4), *E.faecium* (11), *S.aureus* (13), *Y.enterocolitica* (15), *V.cholerae* (16) et *K.sedentarius* (17) (figure 37 (a))
- à 1 mg/cm<sup>2</sup> : 10 espèces touchées *E.faecalis* (4), *E.coli* (5), *B.subtilis* (végétatif) (10), *E.faecium* (11), *S.aureus* (13), SARM (14), *Y.enterocolitica* (15), *V.cholerae* (16), *K.sedentarius* (17) et *S.epidermidis* (18) (figure 37 (b))
- à 2 mg/cm<sup>2</sup> : 8 espèces touchées *B.cereus* (végétatif) (2), *E.faecalis* (4), *E.coli* (5), *E.faecium* (11), *S.aureus* (13), *V.cholerae* (16), *K.sedentarius* (17) et *S.sonnei* (19) (figure 37 (c))
- à 4 mg/cm<sup>2</sup> : 10 espèces touchées les formes végétatives de *B.cereus* (végétatif) (2), *B.subtilis* (10), *E.faecalis* (4), *E.coli* (5), *E.faecium* (11), *S.aureus* (13), SARM (14), *Y.enterocolitica* (15), *S.epidermidis* (18) et *S.sonnei* (19) (figure 37 (d)).

Nous pouvons conclure de cette étude réalisée pour une irradiance de 60 W/m<sup>2</sup>, que globalement plus la **quantité de catalyseur est importante, plus le nombre d'espèces ne pouvant pas se développer sur milieu gélosé augmente**. Nous avons réalisé la même étude pour des irradiances plus faibles (10 W/m<sup>2</sup> et 30 W/m<sup>2</sup>) et la même conclusion a été obtenue. Il est apparu alors nécessaire d'introduire **un critère quantitatif** dans l'évaluation de l'efficacité antimicrobienne, qui fait l'objet de la section suivante (Chapitre 3 I.1.3).

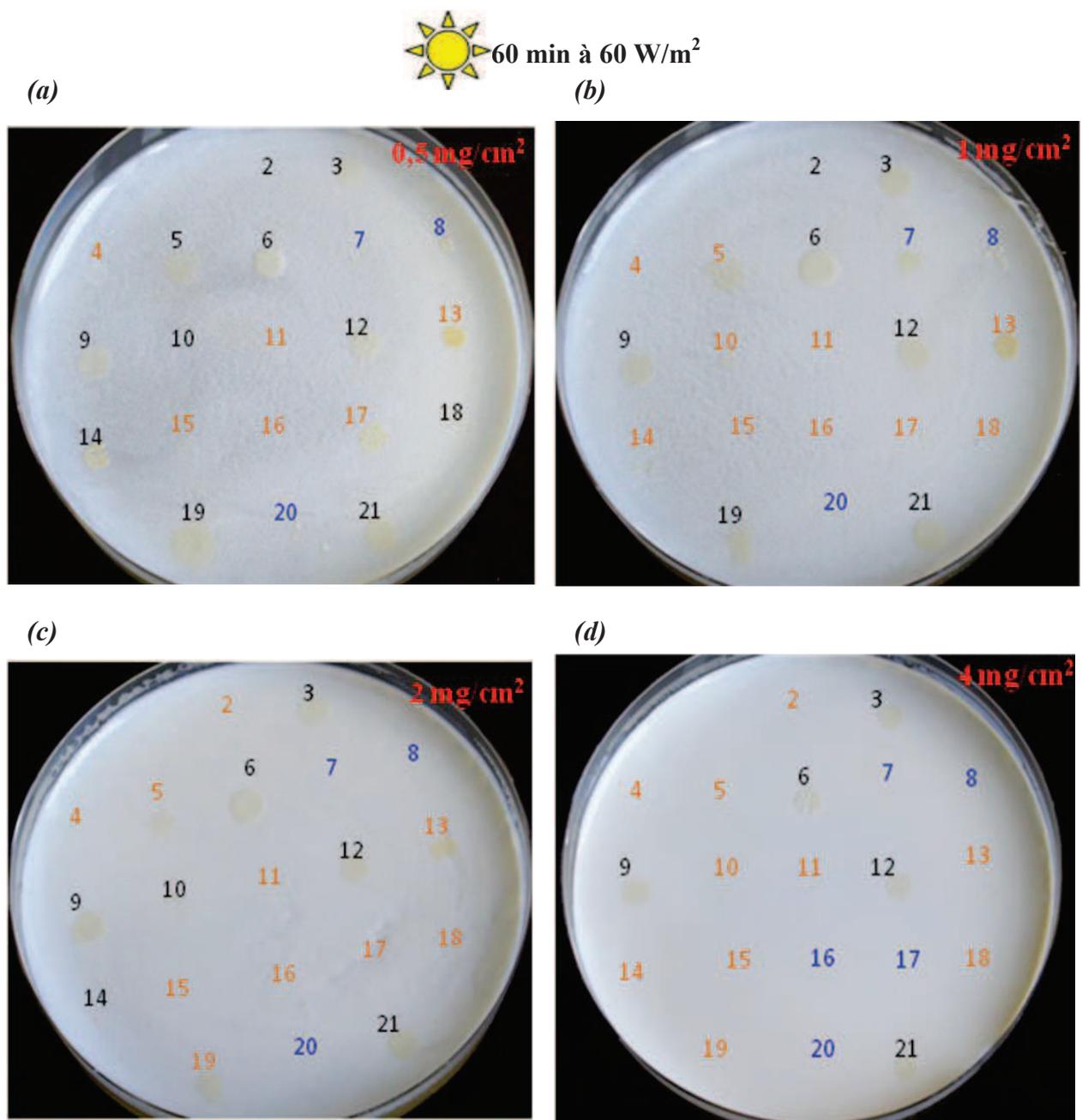


Figure 37 Influence de la densité surfacique du dépôt de TiO<sub>2</sub> (0,5 ; 1 ; 2 et 4 mg/cm<sup>2</sup>, respectivement (a), (b), (c) et (d)) sur l'efficacité de l'action photocatalytique, pour une irradiance de 60 W/m<sup>2</sup> pendant 60 min, avec un inoculum initial d'environ 10 000 UFC

### 1.3. Tableau synthétique croisé dynamique

Les résultats complets obtenus sont indiqués dans le tableau 17. Afin d'établir celui-ci sous forme de pourcentage, rappelons la notation des critères visuels :

- +++ : développement identique au contrôle (c'est-à-dire la condition sans TiO<sub>2</sub> et sans rayonnement), soit un pourcentage de 100 %
- ++ : diminution d'un tiers de la croissance comparée au témoin, soit un pourcentage de 66 %
- + : léger développement comparé au témoin soit un pourcentage de 33 %
- - : absence de développement soit un pourcentage de 0 %.

Ainsi pour chaque expérience et chaque espèce bactérienne testée, ces valeurs ont été calculées et moyennées (sur trois boîtes par deux opérateurs différents, soit n=6).

Au vu des résultats obtenus, cinq groupes de réponse ont été définis avec :

- les espèces considérées comme étant sensibles au rayonnement (en bleu)
- les espèces considérées comme étant sensibles à l'effet cytotoxique du TiO<sub>2</sub> (en gris)
- les espèces dont le développement microbien a été totalement inhibé/ralenti suite à l'action photocatalytique (en rouge/orange) en retranchant l'effet dU rayonnement UV-A seul
- les espèces résistantes à l'action photocatalytique (non surligné).
- les espèces dont le rayonnement a induit un ralentissement/une inhibition de développement sans toutefois observer ce même effet en présence de TiO<sub>2</sub> (c'est-à-dire lors de l'action photocatalytique) ; effet protecteur du TiO<sub>2</sub> (en vert).

Tableau 17 Effet du rayonnement, de l'action photocatalytique sur le développement de 20 microorganismes en fonction de l'inoculum initial (UFC), de l'irradiance (W/m<sup>2</sup>) et de la densité surfacique du dépôt en TiO<sub>2</sub> (mg/cm<sup>2</sup>)

	dépôt TiO <sub>2</sub> (mg/cm <sup>2</sup> )	0				0,5				1				2				4				
		rayonnement (min)		60		0		60		0		60		0		60		0		60		
		irradiance (W/m <sup>2</sup> )		0	10	30	60	0	10	30	60	0	10	30	60	0	10	30	60	0	10	30
2	<i>Bacillus cereus</i> (végétative)	100 UFC	100	56	17	22	94	44	22	17	78	39	17	11	78	22	28	17	78	22	17	6
		1000 UFC	100	100	44	22	100	61	33	17	83	72	28	17	100	67	33	6	100	33	22	6
		10000 UFC	100	100	72	22	100	100	61	17	100	89	50	17	100	89	39	11	100	83	39	6
3	<i>Enterobacter cloacae</i>	100 UFC	100	94	94	83	100	94	94	67	100	94	94	65	100	94	94	50	100	94	94	55
		1000 UFC	100	100	100	94	100	100	100	78	100	100	100	78	100	100	100	67	100	100	100	69
		10000 UFC	100	100	100	100	100	100	100	83	100	100	100	83	100	100	100	72	100	100	94	72
4	<i>Enterococcus faecalis</i>	100 UFC	100	94	89	39	100	100	94	<1	100	100	94	<1	100	100	94	<1	100	72	83	6
		1000 UFC	100	100	94	78	100	100	89	22	100	100	100	<1	100	89	94	<1	100	89	72	17
		10000 UFC	100	100	100	83	100	100	94	<1	100	100	89	<1	100	100	89	<1	100	94	89	<1
5	<i>Escherichia coli</i>	100 UFC	100	100	100	72	100	100	100	28	100	100	100	39	100	100	100	33	100	100	100	22
		1000 UFC	100	100	100	78	100	100	100	39	100	100	100	33	100	100	100	28	100	100	83	11
		10000 UFC	100	100	100	100	100	100	100	78	100	100	100	61	100	100	100	44	100	100	100	33
6	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	100 UFC	100	100	100	61	100	100	100	61	100	100	100	61	100	100	100	61	100	100	100	50
		1000 UFC	100	100	94	94	100	100	94	72	100	100	94	78	100	100	94	67	100	100	94	55
		10000 UFC	100	100	100	100	100	100	100	89	100	100	100	94	100	100	100	72	100	100	100	94
7	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	100 UFC	100	39	11	<1	100	55	28	<1	100	61	33	<1	100	61	11	<1	100	67	33	<1
		1000 UFC	100	55	28	<1	100	77	44	<1	100	77	39	<1	100	66	44	<1	100	77	50	<1
		10000 UFC	100	67	55	17	100	83	61	11	100	94	66	11	100	94	55	11	100	100	55	11
8	<i>Acinetobacter baumannii</i>	100 UFC	100	33	6	33	100	33	<1	17	100	39	6	17	100	33	<1	17	100	33	6	17
		1000 UFC	100	<1	17	<1	100	44	17	11	100	11	17	<1	100	17	33	<1	100	22	28	<1
		10000 UFC	100	22	17	<1	100	55	33	<1	100	55	33	6	100	55	11	<1	100	44	11	<1
9	<i>Bacillus subtilis</i> (spores)	100 UFC	100	67	100	67	100	83	100	83	100	83	100	83	100	83	100	83	100	83	100	83
		1000 UFC	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100
		10000 UFC	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100
10	<i>Bacillus subtilis</i> (végétatif)	100 UFC	100	22	33	22	100	11	55	11	100	22	55	11	100	44	55	11	33	11	44	11
		1000 UFC	100	33	8	<1	100	41	25	<1	67	25	17	0	25	41	8	<1	8	25	<1	<1
		10000 UFC	100	58	25	25	100	75	50	33	100	75	17	17	75	75	17	25	83	75	17	8
11	<i>Enterococcus faecium</i>	100 UFC	100	100	100	56	100	100	100	6	100	100	100	6	100	94	6	100	100	89	6	
		1000 UFC	100	100	100	67	100	100	89	22	100	100	100	<1	100	100	89	<1	100	89	67	<1
		10000 UFC	100	100	100	83	100	100	72	11	100	100	94	<1	100	94	89	22	100	100	89	<1

moyenne : n=6

100 % : identique au contrôle

<1 % : absence de développement

 effet du rayonnement avec une inhibition de croissance ≥ 66 %\*

 effet cytotoxique du TiO<sub>2</sub> ≥ 33 %\*

 effet photocatalytique de 100 %\*\*

 effet photocatalytique ≥ 33 %\*\*

 croissance ≥ 66 %\*\*

\* : en comparaison avec 0 mg/cm<sup>2</sup> de TiO<sub>2</sub>, 0 min de rayonnement

\*\* : en comparaison avec 0 mg/cm<sup>2</sup> de TiO<sub>2</sub> et la même irradiance

Tableau 17 Effet du rayonnement, de l'action photocatalytique sur le développement de 20 microorganismes en fonction de l'inoculum initial (UFC), de l'irradiance (W/m<sup>2</sup>) et de la densité surfacique du dépôt en TiO<sub>2</sub> (mg/cm<sup>2</sup>)

	dépôt TiO <sub>2</sub> (mg/cm <sup>2</sup> )	0				0,5				1				2				4				
		0		60		0		60		0		60		0		60		0		60		
		0	10	30	60	0	10	30	60	0	10	30	60	0	10	30	60	0	10	30	60	
12	<i>Salmonella</i> Abony	100 UFC	100	100	100	55	100	100	100	55	100	100	100	44	100	100	100	44	100	100	100	39
		1000 UFC	100	100	100	78	100	100	100	44	100	100	100	61	100	100	100	39	100	100	100	22
		10000 UFC	100	100	100	100	100	100	100	89	100	100	100	83	100	100	100	67	100	100	100	78
13	<i>Staphylococcus aureus</i>	100 UFC	100	77	39	28	94	94	61	28	100	83	50	6	100	83	39	17	100	89	39	11
		1000 UFC	100	89	50	55	100	94	66	28	100	89	61	17	100	83	61	22	100	83	61	6
		10000 UFC	100	89	89	78	100	100	100	39	100	100	94	44	100	100	100	39	100	94	89	44
14	<i>Staphylococcus aureus</i> résistant à la méticilline	100 UFC	100	33	44	11	100	33	39	<1	100	33	33	<1	100	33	33	<1	100	33	22	<1
		1000 UFC	100	61	33	33	100	55	44	11	100	61	50	6	100	55	44	6	100	61	39	<1
		10000 UFC	100	78	66	22	100	94	72	28	100	89	66	6	100	83	66	17	100	83	55	6
15	<i>Yersinia enterocolitica</i>	100 UFC	100	83	33	<1	100	89	39	<1	94	89	39	<1	55	50	22	<1	33	28	6	<1
		1000 UFC	100	89	50	22	100	94	55	11	94	94	55	<1	78	44	22	17	61	44	11	17
		10000 UFC	100	100	83	11	100	100	83	<1	100	94	83	<1	83	78	44	11	55	56	39	<1
16	<i>Vibrio cholerae</i> (El Tor)	100 UFC	100	<1	<1	<1	50	<1	<1	<1	100	<1	<1	<1	100	<1	<1	<1	17	<1	<1	<1
		1000 UFC	100	<1	8	8	92	17	8	8	92	17	8	8	92	17	8	<1	33	<1	8	8
		10000 UFC	100	13	20	7	100	13	40	<1	100	13	27	<1	100	13	20	<1	80	7	7	<1
17	<i>Kytococcus sedentarius</i>	100 UFC	100	17	17	<1	100	17	17	<1	100	17	17	<1	100	17	17	<1	33	<1	<1	<1
		1000 UFC	100	58	75	33	100	58	50	33	100	58	58	25	100	41	25	25	25	25	<1	25
		10000 UFC	100	61	55	33	100	72	50	<1	89	72	61	6	100	61	22	17	77	28	17	28
18	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	100 UFC	100	42	8	<1	100	42	8	<1	100	42	8	<1	100	42	<1	<1	75	8	<1	<1
		1000 UFC	100	50	25	8	100	50	25	8	100	50	25	<1	100	58	8	<1	83	17	<1	<1
		10000 UFC	100	44	17	6	100	55	17	6	100	55	17	<1	100	55	22	6	100	33	6	<1
19	<i>Shigella sonnei</i>	100 UFC	100	100	100	6	100	100	100	6	100	100	100	<1	100	100	100	6	94	100	100	<1
		1000 UFC	100	100	100	22	100	100	100	17	100	100	100	11	100	100	100	11	100	100	100	6
		10000 UFC	100	100	100	39	100	100	100	33	100	100	100	39	100	100	100	22	100	100	100	<1
20	<i>Aeromonas hydrophila</i>	100 UFC	100	8	<1	<1	100	8	<1	<1	100	8	<1	<1	100	8	<1	<1	83	8	<1	<1
		1000 UFC	100	<1	<1	<1	93	13	13	<1	100	7	7	<1	93	13	13	<1	80	13	<1	<1
		10000 UFC	100	<1	<1	<1	100	33	<1	<1	100	20	13	<1	100	40	13	<1	86	40	7	<1
21	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	100 UFC	100	100	100	94	100	100	100	83	100	94	89	78	100	100	100	83	100	100	100	61
		1000 UFC	100	100	100	100	100	100	100	89	100	100	100	78	100	100	100	72	100	100	100	83
		10000 UFC	100	100	100	100	100	100	89	100	100	100	100	83	100	100	100	94	100	100	100	89

moyenne : n=6

100 % : identique au contrôle

<1 % : absence de développement

 effet du rayonnement avec une inhibition de croissance ≥ 66 %\*

 effet cytotoxique du TiO<sub>2</sub> ≥ 33 %\*

 effet photocatalytique de 100 %\*\*

 effet photocatalytique ≥ 33 %\*\*

 croissance ≥ 66 %\*\*

\* : en comparaison avec 0 mg/cm<sup>2</sup> de TiO<sub>2</sub>, 0 min de rayonnement

\*\* : en comparaison avec 0 mg/cm<sup>2</sup> de TiO<sub>2</sub> et la même irradiance

### Effet du rayonnement

Afin d'évaluer l'effet du rayonnement sur la croissance des microorganismes, nous avons fixé un critère arbitraire avec une inhibition de la croissance de plus de 2/3 comparée au contrôle (noté +), soit une réduction de plus de 66 % par rapport à l'inoculum initial.

Cette catégorie a été divisée en 2 :

- les espèces très sensibles au rayonnement -catégorie dénommée à « **sensibilité élevée** »- sont les espèces dont la croissance a été inhibée de plus de 66 % pour la plus faible irradiance ( $10 \text{ W/m}^2$ ). *A.baumannii* (8), *B.subtilis* végétatif (10), *V.cholerae* (16), *A.hydrophila* (20), font partie de cette catégorie. D'une façon logique, plus l'irradiance appliquée est importante, plus la réduction de croissance est augmentée. Pour *V.cholerae*, nos travaux confirment la publication de Berney *et al.*, 2006, où *V.cholerae* est présenté comme une espèce bactérienne très sensible au rayonnement (lumière solaire comprise entre 350 nm et 450 nm) comparé à trois entérobactéries testées (*E.coli* ; *Salmonella typhimurium* et *Shigella flexneri*). Cette comparaison a été réalisée dans le cadre du projet SODIS pour la potabilisation de l'eau sous lumière solaire.<sup>263</sup>
- les espèces moyennement sensibles au rayonnement -catégorie dénommée à « **sensibilité modérée** »-, sont les espèces pour lesquelles le rayonnement a induit une réduction de croissance de plus de 66 % comparée au contrôle mais avec une irradiance plus élevée, de 30 ou 60  $\text{W/m}^2$ . *B.cereus* sous forme végétative (2), *P.aeruginosa* (7), SARM (14), *Y.enterocolitica* (15), *K.sedentarius* (17), *S.epidermidis*(18) et *S.sonnei* (19) font partie de cette seconde catégorie. D'après Fernandez et Pizarro, 1996, *P.aeruginosa* est présenté comme une espèce plus sensible au rayonnement UV-A (365 nm) qu'*E.coli*. Ainsi, dans leurs conditions ( $120 \text{ kJ/m}^2/\text{h}$ , soit  $33 \text{ W/m}^2$ ), le rayonnement UV-A induit inévitablement des dommages membranaires contribuant à la mort cellulaire ainsi que des lésions à l'ADN induisant des modifications majeures des mécanismes de réparation de l'ADN.<sup>264</sup>

Les autres espèces sont considérées comme insensibles au rayonnement.

### Effet cytotoxique du $\text{TiO}_2$

Cette catégorie a été établie lorsque la présence de  $\text{TiO}_2$  (sans rayonnement) a induit une diminution du développement sur milieu gélosé supérieure ou égale à 33 %, par rapport au même spot mais de la boîte sans  $\text{TiO}_2$  et sans rayonnement. Dans cette catégorie, les effets cytotoxiques du  $\text{TiO}_2$  les plus importants ont été obtenus majoritairement pour une densité surfacique en  $\text{TiO}_2$  de  $4 \text{ mg/cm}^2$ . Quatre espèces bactériennes, ont été proposées dans ce groupe : les formes végétatives de *B.subtilis* (10), *Y.enterocolitica* (15), *V.cholerae* (16) et *K.sedentarius* (17).

<sup>263</sup> Berney M, Weilenmann HU, Simonetti A, Egli T: **Efficacy of solar disinfection of *Escherichia coli*, *Shigella flexneri*, *Salmonella Typhimurium* and *Vibrio cholerae*.** *Journal of applied microbiology* 2006, **101**(4):828-836.

<sup>264</sup> Fernandez RO, Pizarro RA: **Lethal effect induced in *Pseudomonas aeruginosa* exposed to Ultraviolet-A radiation.** *Photochemistry and photobiology* 1996, **64**(2):334-339.

### Effet photocatalytique du TiO<sub>2</sub>

Afin de mieux apprécier l'effet photocatalytique sur la croissance des microorganismes, deux catégories ont été arbitrairement distinguées :

- **les espèces très sensibles à la photocatalyse** (espèces pour lesquelles au moins une condition photocatalytique a permis une non croissance totale). *E.faecalis* (4), les formes végétatives de *B.subtilis* (10), *E.faecium* (11), SARM (14), *Y.enterocolitica* (15), *K.sedentarius* (17), *S.epidermidis* (18) et *S.sonnei* (19) font partie de cette catégorie. On peut noter que la part due au rayonnement UV-A à forte irradiance dans l'efficacité de réduction est non négligeable pour les formes végétatives de *B.subtilis* (10), *Y.enterocolitica* (15), *V.cholerae* (16), *K.sedentarius* (17), *S.epidermidis* (18) et *S.sonnei* (19), ce qui valide sa prise en considération dans la détermination de la sensibilité des espèces à la photocatalyse seule, et justifie le fait que l'effet du rayonnement UV-A seul ait été retranché. Toutefois, la combinaison UV-A/TiO<sub>2</sub> permet une augmentation significative de la réduction conduisant à une réduction totale. Il est intéressant d'observer que c'est surtout pour la condition réunissant la plus forte irradiance (60 W/m<sup>2</sup>) avec la densité surfacique du dépôt en TiO<sub>2</sub> la plus élevée (4 mg/cm<sup>2</sup>), que la majorité des réductions totales a été obtenue.
- **les espèces modérément sensibles à la photocatalyse**, espèces pour lesquelles une inhibition de croissance supérieure ou égale à 33 % a été observée pour au moins 5 conditions opératoires photocatalytiques, par rapport au contrôle sans TiO<sub>2</sub> et conservé à l'obscurité. Les formes végétatives de *B.cereus* (2), *E.coli* (5), *S.aureus* (13) font partie de cette catégorie.

Pour les deux catégories présentées, les meilleures réductions après traitement photocatalytique ont été observées pour la plus forte irradiance et pour la densité surfacique de TiO<sub>2</sub> la plus élevée. La publication d'Herrmann, 1999, présente entre autres la relation liant les paramètres réactionnels que sont le flux lumineux (irradiance) et la quantité de photocatalyseur à la vitesse de réaction en photocatalyse.<sup>265</sup> Toute proportion gardée, les résultats obtenus ici avec des microorganismes pour cibles (« réactifs ») au lieu de molécules chimiques, sont en accord avec les concepts de base détaillés par Herrmann, et il est cohérent qu'une augmentation de ces deux paramètres permette une meilleure réduction microbienne.

### Influence de la quantité initiale de l'inoculum sur l'efficacité d'inhibition de croissance sous rayonnement et lors de la photocatalyse

Cette étude réalisée avec une quantité initiale de l'inoculum de 100 UFC; 1000 UFC ou 10 000 UFC a montré que les effets du rayonnement et de la photocatalyse sont plus marqués pour un inoculum faible (100 UFC) que pour un inoculum élevé. Ce phénomène est plus ou moins prononcé suivant les microorganismes. La quantité en polluant/bactéries est également citée comme un paramètre influençant directement la vitesse de réaction en photocatalyse, qui est d'autant plus élevée que la concentration en polluant est élevée jusqu'à un seuil limite.<sup>265</sup>

<sup>265</sup> Herrmann J-M: **Heterogeneous photocatalysis: fundamentals and applications to the removal of various types of aqueous pollutants.** *Catalysis Today* 1999, 53:115-129.

Cependant, il convient de ne pas confondre vitesse de réaction et conversion (*i.e.* efficacité de réduction). Il est probable que le contact entre les microorganismes et le TiO<sub>2</sub> soit moins bon pour un inoculum plus élevé, ce qui peut se traduire par une inhibition de croissance plus faible.

### **Les espèces résistantes à la photocatalyse**

Ce sont des espèces pour lesquelles ni le rayonnement, ni l'action photocatalytique, n'ont induit une réduction de la viabilité cellulaire. Dans notre panel testé, les formes sporulées de *Bacillus subtilis* (9) sont les microorganismes les plus résistants à la photocatalyse. Ainsi quelles que soient l'irradiance et la densité surfacique en TiO<sub>2</sub>, aucune réduction n'a été obtenue. Les spores sont connues pour être des formes de résistance, il n'est donc pas étonnant de les retrouver dans cette catégorie. Pour *E.cloacae* (3), *K.pneumoniae* (6), *P.aeruginosa* (7), *S.Abony* (12), et *S.maltophilia* (21), l'inhibition de croissance sur milieu gélosé n'a pas dépassé les 33 % en comparaison avec les spots témoins déposés sur milieu sans TiO<sub>2</sub> et conservés à l'obscurité ; ces dernières sont ainsi considérées comme étant résistantes à l'action photocatalytique dans nos conditions opératoires.

### **Effet protecteur du TiO<sub>2</sub>**

Pour *A.baumannii* (8) et *A.hydrophila* (20), nous avons observé une croissance des espèces bactériennes en présence de TiO<sub>2</sub> irradié alors qu'avec la même irradiance appliquée (rayonnement UV-A seul), la croissance était significativement réduite. Cette classification a été définie pour les espèces pour lesquelles le traitement photocatalytique a induit une augmentation de croissance de plus de 66 % par rapport aux spots observés sans TiO<sub>2</sub> mais soumis à la même irradiance que celle appliquée lors du traitement photocatalytique. Pour ces deux espèces bactériennes, le rayonnement seul a eu un effet délétère sur leur croissance et ce même pour des irradiances faibles (10 W/m<sup>2</sup>), tandis qu'en présence de TiO<sub>2</sub> sous rayonnement (irradiances de 10 W/m<sup>2</sup> ou 30 W/m<sup>2</sup>), nous avons pu observer une croissance. Nous ne savons expliquer ces phénomènes, nous pouvons simplement supposer que dans ce cas le TiO<sub>2</sub> aurait un rôle protecteur sur la croissance microbienne vis-à-vis de l'effet du rayonnement UV-A délétère. En revanche dans le cas de l'irradiance de 60 W/m<sup>2</sup>, nous n'avons pas observé de croissance de ces espèces bactériennes en présence de TiO<sub>2</sub>, l'irradiance UV-A appliquée étant probablement trop importante pour permettre une croissance.

#### 1.4. Tableau récapitulatif de l'efficacité antimicrobienne dans le cas de dépôt de TiO<sub>2</sub> en milieu nutritif

Le tableau 18 reprend les 5 critères prédéfinis en fonction de la sensibilité de réponse pour chaque microorganisme testé.

Cette première étude réalisée avec dépôt d'une double couche TiO<sub>2</sub>/MH permet d'observer que l'application d'une irradiance UV-A élevée (60 W/m<sup>2</sup> pendant 60 min) entraîne pour plus de la moitié des microorganismes testés un important effet antibactérien se traduisant soit par une inhibition totale de croissance ou par une réduction de croissance en comparaison avec le contrôle qui est non soumis au rayonnement UV-A. Ainsi afin de mieux évaluer l'effet purement photocatalytique, l'**irradiance** choisie ne devra **pas** ou **peu induire d'effet létal**: c'est d'ailleurs pour cela que pour la suite des travaux nous n'avons pas sélectionné l'irradiance de 60 W/m<sup>2</sup> mais celle de **30 W/m<sup>2</sup>** (10 W/m<sup>2</sup> étant une irradiance jugée comme trop faible).

De plus, cette étude montre que pour la suite des études, il faudra également tenir compte du **potentiel effet cytotoxique du TiO<sub>2</sub>** sur le développement microbien puisque pour 4 espèces bactériennes il s'est révélé avoir un effet cytotoxique (notamment dans le cas de la plus forte densité surfacique en TiO<sub>2</sub>) se traduisant par une diminution de croissance en comparaison avec le contrôle sans TiO<sub>2</sub>.

En ce qui concerne les **traitements photocatalytiques**, différents types de réponse ont été obtenus puisque sur les 20 microorganismes sélectionnés, **11 ont été inactivés** (réduction de la viabilité cellulaire significative en comparaison avec l'effet du rayonnement et de l'effet cytotoxique du TiO<sub>2</sub>) tandis que **6 d'entre eux sont résistants**.

De manière surprenante pour 2 espèces bactériennes, on a constaté une **croissance sur milieu gélosé lors du traitement photocatalytique** tandis qu'en absence de TiO<sub>2</sub> et pour la même irradiance, la croissance était réduite voire absente.

La répartition des microorganismes en liaison avec leurs structures membranaires au sein des différentes catégories définies suit difficilement une quelconque logique mais l'interprétation de ces résultats fera l'objet du chapitre 3 I.3.4.

Tableau 18 Tableau récapitulatif du screening de l'évaluation de l'effet photocatalytique du TiO<sub>2</sub> en milieu gélosé

Critères de classement visuels	Sensibilité	Microorganisme
Sensibilité au rayonnement	élevée	<i>A.baumannii</i> , <i>B.subtilis</i> végétatif, <i>V.cholerae</i> , <i>A.hydrophila</i>
	modérée	<i>B.cereus</i> végétatif, <i>P.aeruginosa</i> , <i>SARM</i> , <i>Y.enterocolitica</i> , <i>K.sedentarius</i> , <i>S.epidermidis</i> , <i>S.sonnei</i>
Sensibilité au TiO <sub>2</sub>		<i>B.subtilis</i> végétatif, <i>Y.enterocolitica</i> , <i>V.cholerae</i> , <i>K.sedentarius</i>
Sensibilité à la photocatalyse	élevée	<i>E.faecalis</i> , <i>B.subtilis</i> végétatif, <i>E.faecium</i> , <i>SARM</i> , <i>Y.enterocolitica</i> , <i>K.sedentarius</i> , <i>S.epidermidis</i> , <i>S.sonnei</i>
	modérée	<i>B.cereus</i> végétatif, <i>E.coli</i> , <i>S.aureus</i>
Résistance à la photocatalyse		spore de <i>B.subtilis</i> , <i>E.cloacae</i> , <i>K.pneumoniae</i> , <i>S.Abony</i> , <i>P.aeruginosa</i> , <i>S.maltophilia</i>
Croissance en présence de TiO <sub>2</sub>		<i>A.baumannii</i> , <i>A.hydrophila</i>

en rose : bactérie à Gram négatif

en violet : bactérie à Gram positif

## **2. Etude de la réduction bactérienne avec dépôts de TiO<sub>2</sub> sur verre**

Pour cette étude, du TiO<sub>2</sub> a été déposé sur du verre et est directement en contact avec le contaminant (suspension bactérienne, suspension de spores bactériennes, ou suspension de spores de champignons). Au vu des résultats précédents obtenus sur milieux gélosés nutritifs, l'**irradiance UV-A** a été fixée à **30 W/m<sup>2</sup>** avec une durée d'exposition au rayonnement fixée à **20 min**. Cette durée de 20 min a été déterminée lors d'études préliminaires réalisées sur lamelle en verre exempte de TiO<sub>2</sub> et correspond à la durée maximum pouvant être appliquée afin de minimiser les effets dus aux rayonnements UV-A (comme la dessiccation) sur la survie bactérienne (même technique de récupération que celle présentée ci-dessous).

### **2.1. Partie expérimentale**

#### **Dépôt du TiO<sub>2</sub>**

Des dépôts de TiO<sub>2</sub> à différentes densités (ou concentrations) surfaciques ont été réalisés sur des lamelles de microscope stériles. Pour ce faire, 20 et 80 mg de TiO<sub>2</sub> ont été dispersés dans 1 mL d'eau φ. Après homogénéisation des suspensions, 50 µL de chaque préparation ont été imprégnés sur 1 cm<sup>2</sup> de lamelle en verre (de dimensions 2 cm x 2 cm), permettant d'obtenir des concentrations surfaciques en TiO<sub>2</sub> de **1** et **4 mg/cm<sup>2</sup>**. Les lamelles sont séchées 24 heures minimum à température ambiante et conservées à l'obscurité.

#### **Dépôt des suspensions microbiennes sur surface sèche**

10 µL de chaque suspension bactérienne à 10<sup>8</sup> UFC/mL (préparation détaillée dans le Chapitre 2 IV) soit un dépôt initial de l'ordre de 10<sup>6</sup> UFC/dépôt, ont été déposés à la micropipette sur :

- deux lamelles stériles
- deux lamelles imprégnées de TiO<sub>2</sub> à 1 mg/cm<sup>2</sup>
- deux lamelles imprégnées de TiO<sub>2</sub> à 4 mg/cm<sup>2</sup>.

#### **Conditions de tests**

Pour cette étude, deux paramètres ont été retenus : la densité surfacique en TiO<sub>2</sub> (**0 ; 1 et 4 mg/cm<sup>2</sup>**) et l'**irradiance UV-A** (**0 ; 30 W/m<sup>2</sup>**, soit sans ou avec rayonnement), ce qui correspond globalement à quatre conditions (tableau 19).

**Tableau 19 Ensemble des conditions testées pour les tests photocatalytiques sur surface sèche et effets mis en évidence**

<b>Lamelle</b>	<b>Non éclairée</b>	<b>Éclairée 20 min (30 W/m<sup>2</sup>)</b>
sans TiO <sub>2</sub>	témoin	effet du rayonnement
avec TiO <sub>2</sub>	effet cytotoxique du TiO <sub>2</sub>	effet photocatalytique

### **Technique de récupération bactérienne**

Chaque lamelle est introduite dans un tube falcon contenant 2 mL d'eau  $\phi$ . Afin de procéder à la récupération des microorganismes, une étape de grattage à l'aide d'une pipette Pasteur est réalisée. Les tubes sont ensuite passés au vortex pendant 30 s. Des dilutions en cascade au dixième sont réalisées à partir des 2 mL de mélange (bactérie +/- TiO<sub>2</sub>). 100  $\mu$ L de chaque dilution est étalée sur milieu gélosé Trypticase Soja. Les boîtes sont enfin incubées 24 h à 37°C puis dénombrées.

## **2.2. Etude de l'efficacité de décontamination antimicrobienne du TiO<sub>2</sub> sur les bactéries à Gram négatif, les bactéries à Gram positif, les spores, les levures et les moisissures**

Les différents résultats obtenus ont été regroupés en fonction des espèces microbiennes testées : bactéries à Gram négatif, bactéries à Gram positif, spores bactériennes, levures et moisissures (dénommées champignons).

### **Evaluation de l'effet antibactérien pour les bactéries à Gram négatif**

Dans cette catégorie, huit bactéries à Gram négatif [5 entérobactéries (*E.coli*, *S.Abony*, *E.cloacae*, *K.pneumoniae*, *Y.enterocolitica*) *A.baumannii*, *S.maltophilia* et *P.aeruginosa*] ont été testées (figure 38 et figure 39). Pour chaque témoin (lame conservée à l'obscurité et sans TiO<sub>2</sub>), nous dénombrons environ 10<sup>6</sup> UFC/dépôt, ce qui correspond bien à la contamination initiale (10  $\mu$ L d'une suspension bactérienne à 10<sup>8</sup> UFC/mL). Ceci valide notre technique de récupération.

### **Effet du rayonnement**

Nous pouvons observer qu'avec une irradiance UV-A de 30 W/m<sup>2</sup> et une durée de test sous rayonnement de 20 min, il n'y a pas d'effet bactéricide significatif en comparaison avec les histogrammes de la condition témoin (figure 38 et figure 39).

### **Effet cytotoxique du TiO<sub>2</sub>**

Quelle que soit la densité surfacique en TiO<sub>2</sub> (dépôts de TiO<sub>2</sub> à 1 mg/cm<sup>2</sup> ou 4 mg/cm<sup>2</sup> testés pour toutes les espèces bactériennes à Gram négatif + dépôt supplémentaire de TiO<sub>2</sub> à 0,5 mg/cm<sup>2</sup> testé pour *E.coli*), l'effet cytotoxique du TiO<sub>2</sub> sur la viabilité cellulaire est négligeable, hormis pour *A.baumannii* (figure 39 (b)). En effet, pour *A.baumannii*, en présence d'un dépôt de TiO<sub>2</sub> de densité surfacique de 4 mg/cm<sup>2</sup>, une réduction de la viabilité d'environ 1 log a été obtenue par rapport au témoin, tandis que cet effet n'était pas observé pour la densité surfacique plus faible.

### Effet photocatalytique du TiO<sub>2</sub>

En comparaison avec la lame imprégnée de TiO<sub>2</sub> à **4 mg/cm<sup>2</sup>** non soumise au rayonnement, une réduction de :

- 5 log a été obtenue pour *S.Abony*, *E.cloacae* et *K.pneumoniae*, *A.baumannii*
- 4 log a été obtenue pour *E.coli*, *E.cloacae*, *Y.enterocolitica*, *S.maltophilia* et *P.aeruginosa*.

En comparaison avec la lame imprégnée de TiO<sub>2</sub> à **1 mg/cm<sup>2</sup>** non soumise au rayonnement, une réduction de :

- 5 log a été obtenue pour *K.pneumoniae* et *A.baumannii*
- 4 log a été obtenue pour *E.coli*, *Y.enterocolitica* et *P.aeruginosa*
- 3 log a été obtenue pour *E.cloacae* et *S.maltophilia*
- 2 log a été obtenue pour *S.Abony*.

En comparaison avec la lame imprégnée de TiO<sub>2</sub> à **0,5 mg/cm<sup>2</sup>** non soumise au rayonnement, une réduction de :

- 4 log a été obtenue pour *E.coli*.

Avec ce mode d'évaluation sur surfaces « sèches », cette étude de l'effet bactéricide de la photocatalyse sur les bactéries à Gram négatif montre que **le rayonnement seul et que le TiO<sub>2</sub> non irradié n'entraînent quasiment pas de réduction de la viabilité cellulaire** (en comparaison avec les dénombrements obtenus pour la condition témoin). En revanche, des **réductions** pouvant aller jusqu'à **5 log** ont pu être obtenues (minimum de 2 log de réduction obtenu) sur le dépôt de TiO<sub>2</sub> irradié.

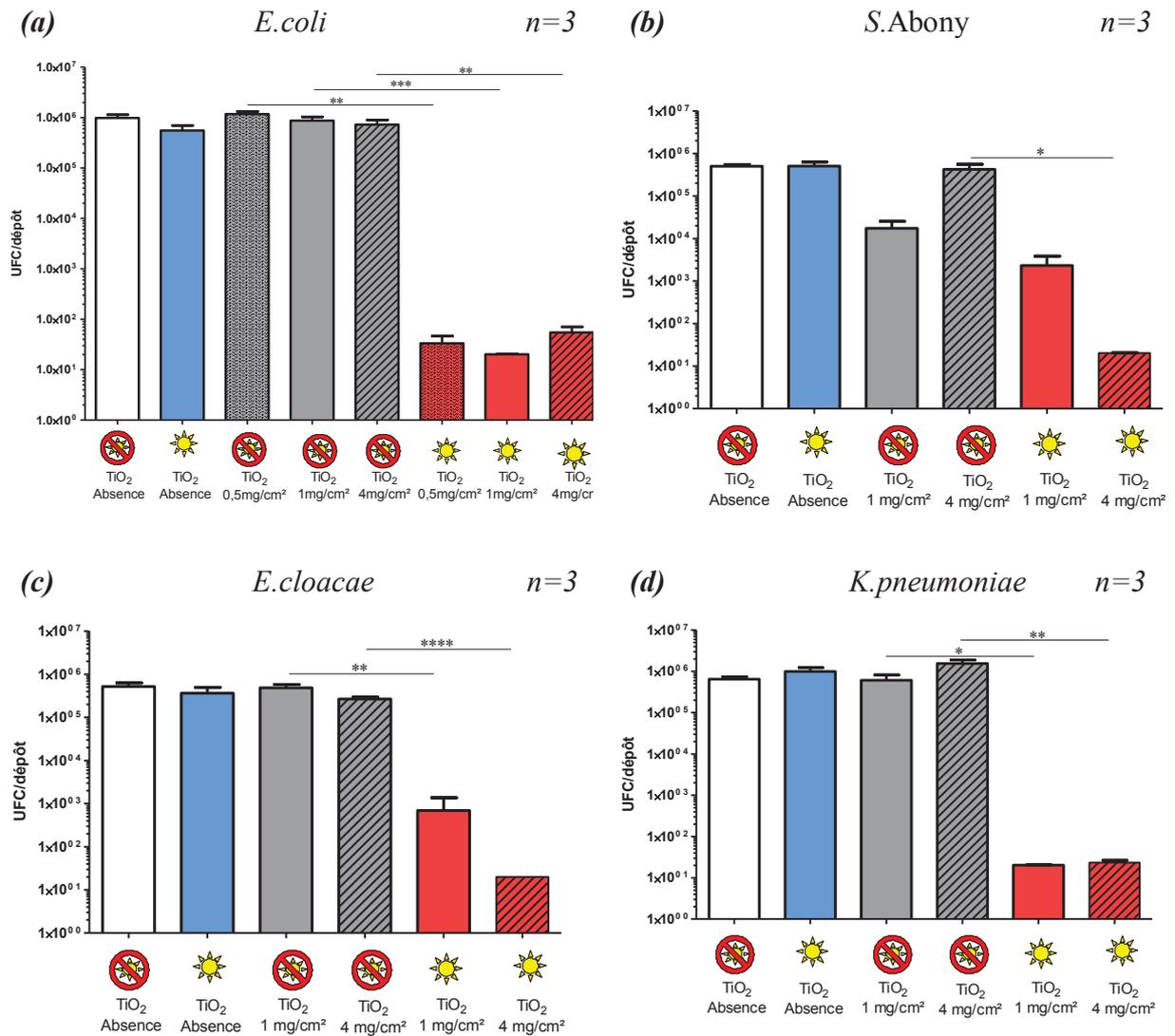


Figure 38 Détermination par dénombrement sur milieux gélosés de l'effet du rayonnement UV-A (20 min à 30 W/m<sup>2</sup>), de l'effet cytotoxique du  $\text{TiO}_2$  (1 mg/cm<sup>2</sup> et 4 mg/cm<sup>2</sup>) et de l'effet photocatalytique du  $\text{TiO}_2$  (20 min sous rayonnement UV-A de 30 W/m<sup>2</sup> avec une densité surfacique de  $\text{TiO}_2$  de 1 mg/cm<sup>2</sup> ou 4 mg/cm<sup>2</sup>) sur la viabilité cellulaire de 4 bacilles à Gram négatif (entérobactéries): *E. coli* (a); *S. Abony* (b); *E. cloacae* (c) et *K. pneumoniae* (d).

NB : pour *E. coli* des tests avec 0,5 mg/cm<sup>2</sup> de  $\text{TiO}_2$  ont été aussi réalisés.

Analyse statistique test *t* de Student avec \**P* < 0,05 ; \*\**P* < 0,01 et \*\*\**P* < 0,001.

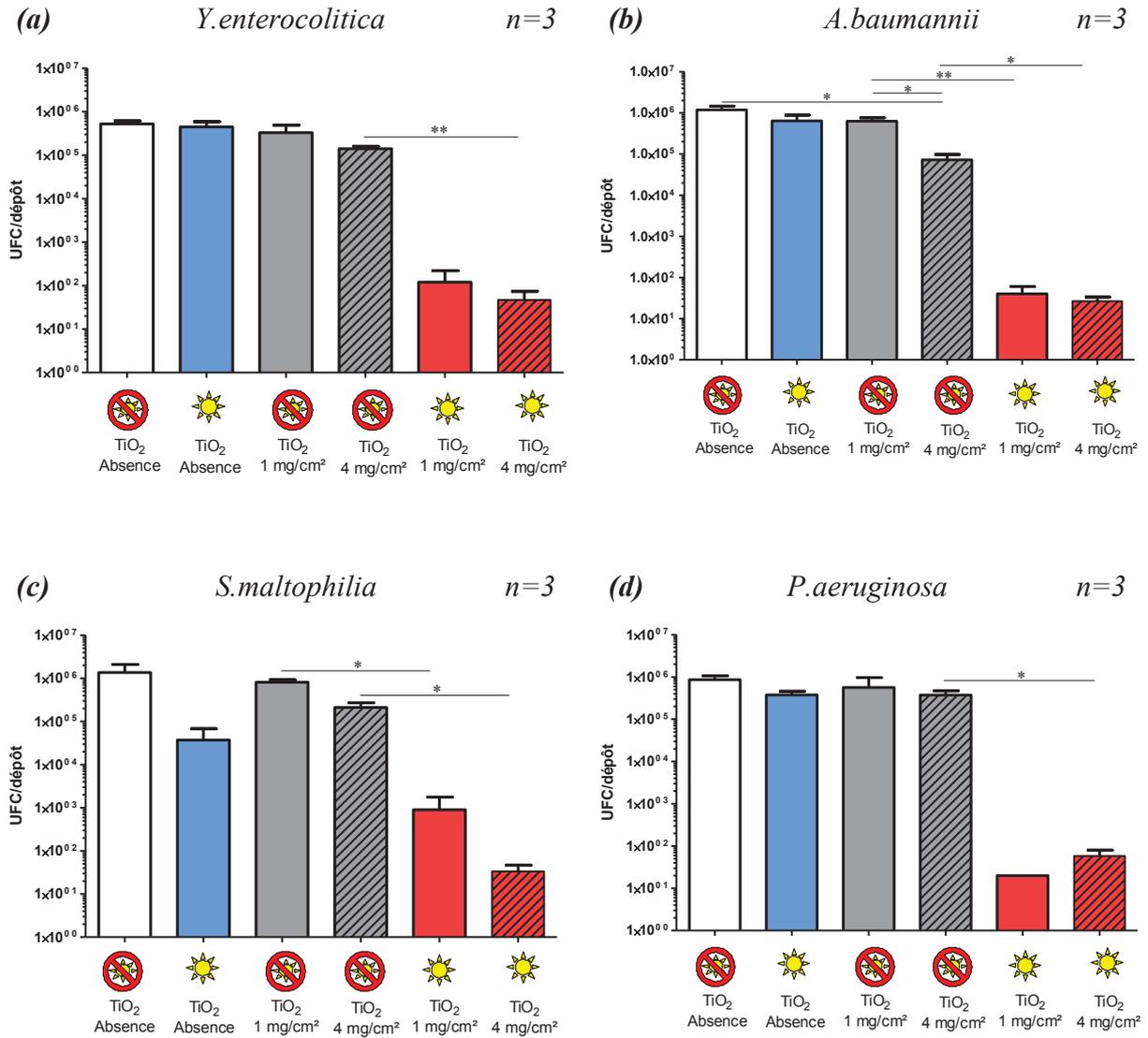


Figure 39 Détermination par dénombrement sur milieux gélosés de l'effet du rayonnement UV-A (20 min à 30 W/m<sup>2</sup>), de l'effet cytotoxique du TiO<sub>2</sub> (1 mg/cm<sup>2</sup> et 4 mg/cm<sup>2</sup>) et de l'effet photocatalytique du TiO<sub>2</sub> (20 min sous rayonnement UV-A de 30 W/m<sup>2</sup> avec une densité surfacique de TiO<sub>2</sub> de 1 mg/cm<sup>2</sup> ou 4 mg/cm<sup>2</sup>) sur la viabilité cellulaire de 4 bacilles à Gram négatif : *Y. enterocolitica* (a); *A. baumannii* (b); *S. maltophilia* (c) et *P. aeruginosa* (d).

Analyse statistique test *t* de Student avec \*P < 0,05 et \*\*P < 0,01.

### Evaluation de l'effet antibactérien pour les bactéries à Gram positif

Comme dans le cas des bactéries à Gram négatif, le dépôt bactérien initial est retrouvé sur la lame témoin ( $10^6$  UFC/dépôt) pour les sept bactéries à Gram positif testées (*S.aureus*, SARM, *S.epidermidis*, *K.sedentarius*, *E.faecalis*, *B.cereus* sous forme végétative et *B.subtilis* sous forme végétative), ce qui valide de nouveau notre technique (figure 40 et figure 41).

#### Effet du rayonnement

La dose de rayonnement appliquée n'influe pas sur la viabilité cellulaire des espèces bactériennes à Gram positif testées, sauf pour *S.epidermidis* où nous avons constaté une légère réduction significative d'à peine 1 log en comparaison avec l'histogramme témoin.

#### Effet cytotoxique du TiO<sub>2</sub>

Quelle que soit la densité surfacique des dépôts de TiO<sub>2</sub> (1 mg/cm<sup>2</sup> ou 4 mg/cm<sup>2</sup>), l'effet cytotoxique du TiO<sub>2</sub> sur la viabilité cellulaire est négligeable en comparaison avec l'histogramme témoin.

#### Effet photocatalytique du TiO<sub>2</sub>

En comparaison avec la lame imprégnée de TiO<sub>2</sub> à **4 mg/cm<sup>2</sup>** non soumise au rayonnement, une réduction de :

- 3 log a été obtenue pour les formes végétatives de *B.cereus*
- 2 log a été obtenue pour *S.epidermis* et *E.faecalis*
- 1 log a été obtenue pour *S.aureus*, SARM et *K.sedentarius*
- <0,01 log a été obtenue pour les formes végétatives de *B.subtilis*.

En comparaison avec la lame imprégnée de TiO<sub>2</sub> à **1 mg/cm<sup>2</sup>** non soumise au rayonnement, une réduction de :

- 3 log a été obtenue pour les formes végétatives de *B.cereus*
- 2 log a été obtenue pour SARM, *S.epidermis* et *E.faecalis*
- 1 log a été obtenue pour *S.aureus* et *K.sedentarius*
- <0,01 log a été obtenue pour les formes végétatives de *B.subtilis*.

Avec ce mode d'évaluation sur surfaces sèches, cette étude de l'effet bactéricide de la photocatalyse sur les bactéries à Gram positif a montré que **le rayonnement et que le TiO<sub>2</sub> non irradié n'entraînent quasiment pas de réduction de la viabilité cellulaire** (en comparaison avec les dénombrements obtenus pour la condition témoin). Des **réductions** pouvant aller jusqu'à **3 log** ont été obtenues sur le dépôt de TiO<sub>2</sub> sous rayonnement UV-A. Ceci n'est pourtant pas le cas de toutes les espèces bactériennes à Gram positif testées puisque nous n'avons pas obtenu de réduction suite au traitement photocatalytique pour les formes végétatives de *B.subtilis*.

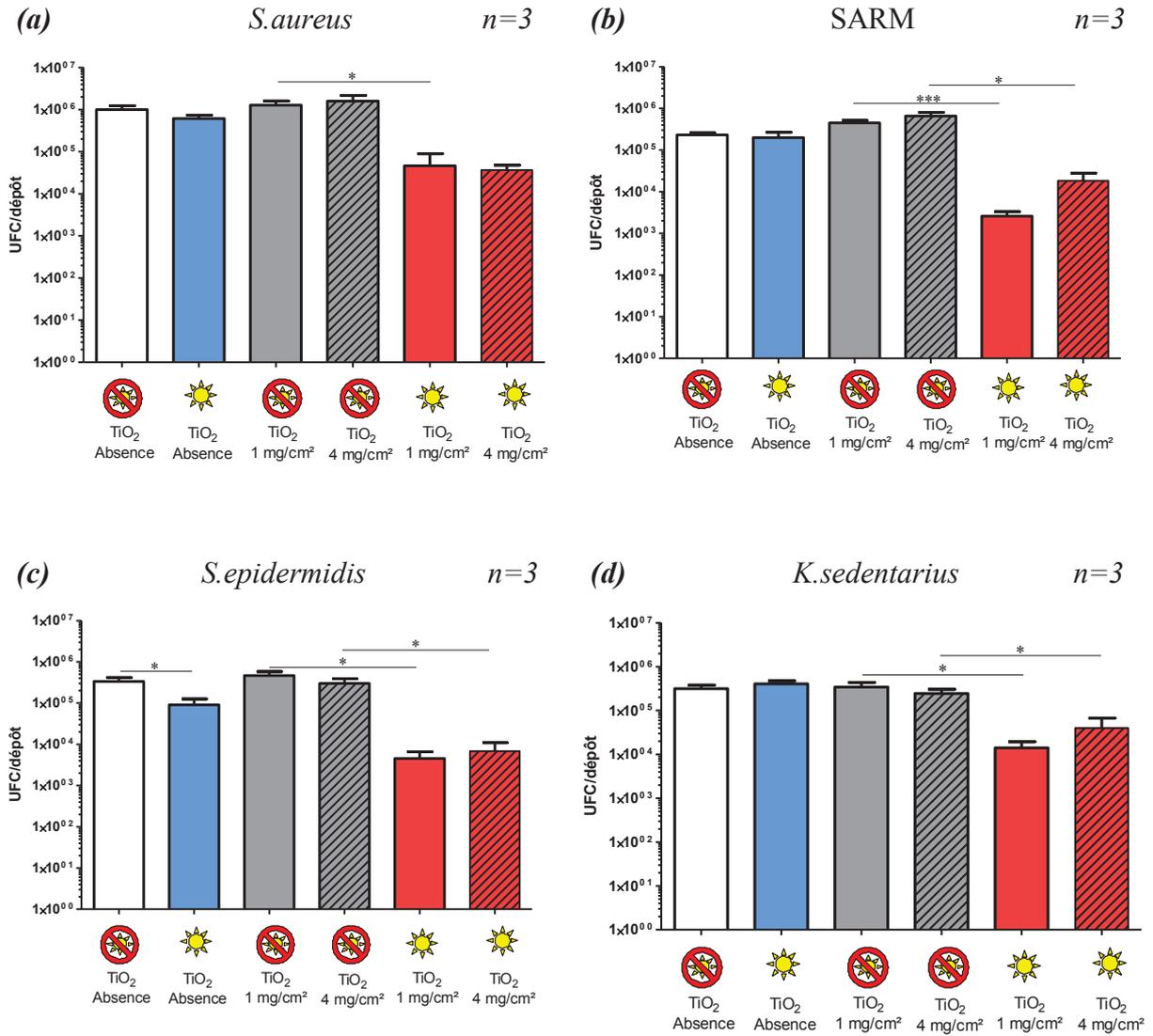


Figure 40 Détermination par dénombrement sur milieux gélosés de l'effet du rayonnement UV-A (20 min à 30 W/m<sup>2</sup>), de l'effet cytotoxique du TiO<sub>2</sub> (1 mg/cm<sup>2</sup> et 4 mg/cm<sup>2</sup>) et de l'effet photocatalytique du TiO<sub>2</sub> (20 min sous rayonnement UV-A de 30 W/m<sup>2</sup> avec une densité surfacique de TiO<sub>2</sub> de 1 mg/cm<sup>2</sup> ou 4 mg/cm<sup>2</sup>) sur la viabilité cellulaire de 4 bactéries à Gram positif : *S. aureus* (a); *SARM* (b) ; *S. epidermidis* (c) et *K. sedentarius* (d).

Analyse statistique test *t* de Student avec \*P < 0,05 et \*\*\*P < 0,001.

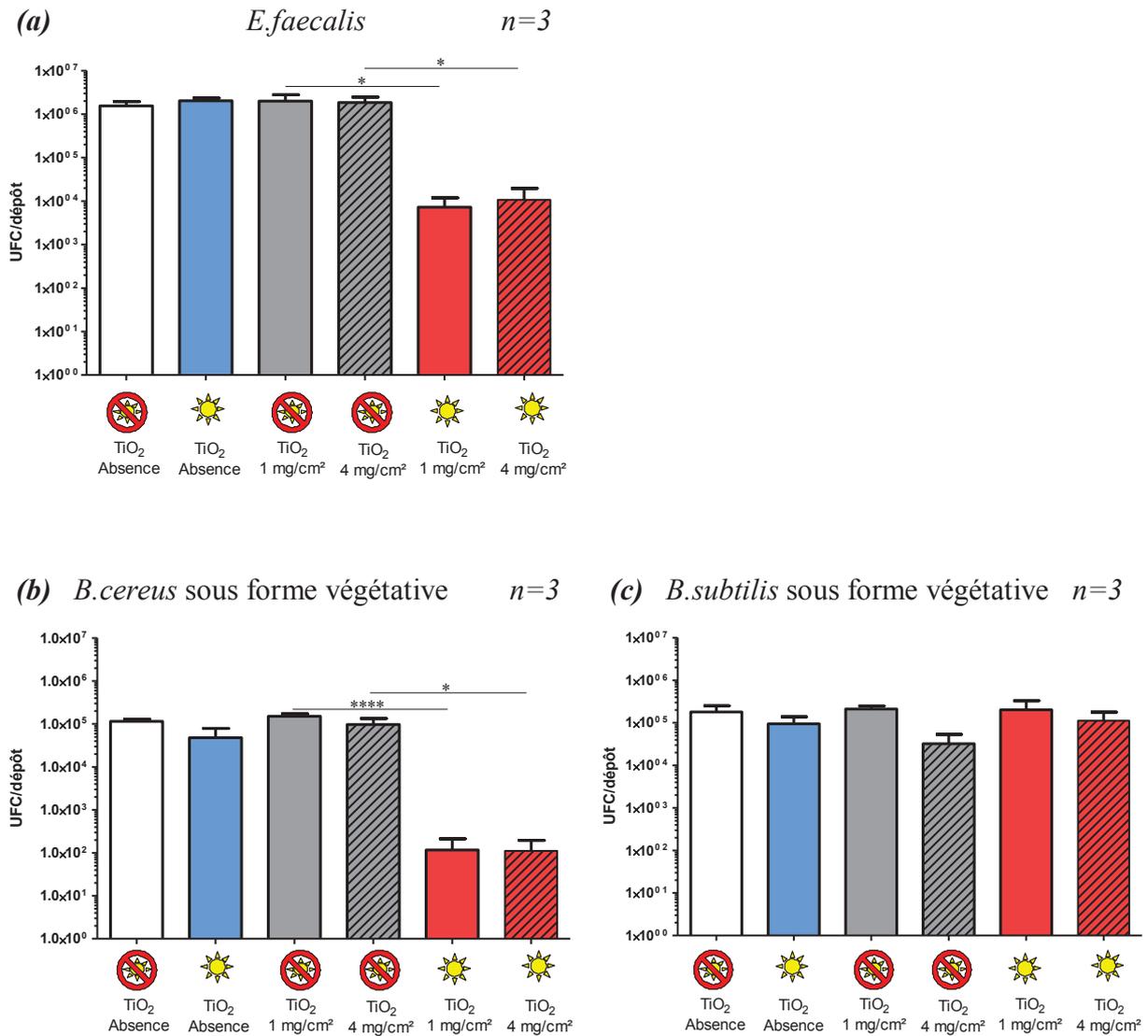


Figure 41 Détermination par dénombrement sur milieux gélosés de l'effet du rayonnement UV-A (20 min à 30 W/m<sup>2</sup>), de l'effet cytotoxique du TiO<sub>2</sub> (1 mg/cm<sup>2</sup> et 4 mg/cm<sup>2</sup>) et de l'effet photocatalytique du TiO<sub>2</sub> (20 min sous rayonnement UV-A de 30 W/m<sup>2</sup> avec une densité surfacique de TiO<sub>2</sub> de 1 mg/cm<sup>2</sup> ou 4 mg/cm<sup>2</sup>) sur la viabilité cellulaire de 3 bactéries à Gram positif : *E. faecalis* (a); *B. cereus* sous forme végétative (b) et *B. subtilis* sous forme végétative (c).

Analyse statistique test *t* de Student avec \*P < 0,05 et \*\*\*P < 0,001.

**Evaluation de l'effet antimicrobien pour les spores bactériennes et les champignons**

Quelles que soient les conditions d'études retenues (effet du rayonnement, cytotoxique du TiO<sub>2</sub> ou effet photocatalytique du TiO<sub>2</sub>), aucune réduction n'a été obtenue pour les formes sporulées de *B.cereus* (figure 42 (a)) et pour les formes sporulées de *B.subtilis* (figure 42 (b))

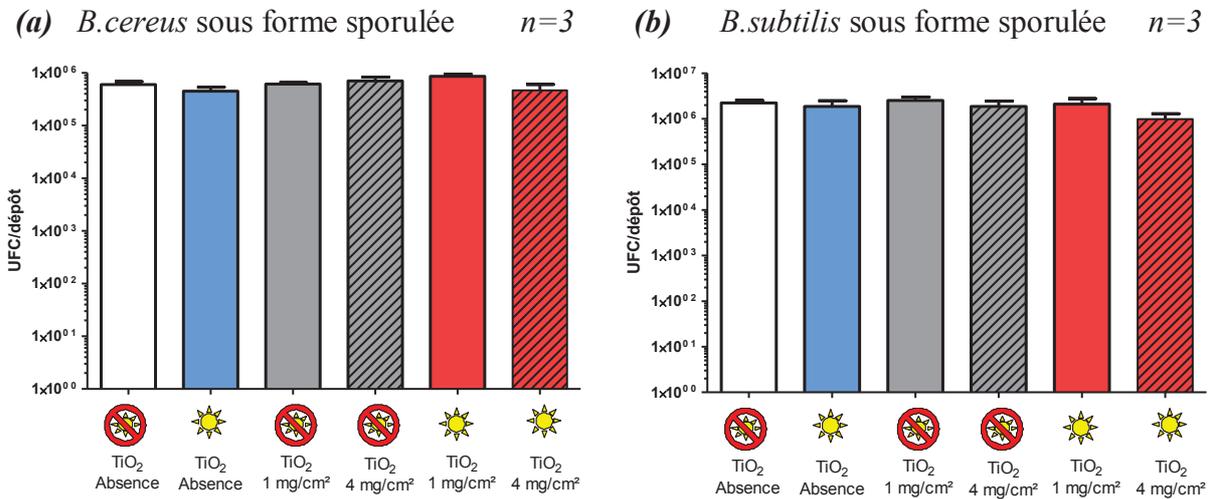


Figure 42 Détermination par dénombrement sur milieux gélosés de l'effet du rayonnement UV-A (20 min à 30 W/m<sup>2</sup>), de l'effet cytotoxique du TiO<sub>2</sub> (1 mg/cm<sup>2</sup> et 4 mg/cm<sup>2</sup>) et de l'effet photocatalytique du TiO<sub>2</sub> (20 min sous rayonnement UV-A de 30 W/m<sup>2</sup> avec une densité surfacique de TiO<sub>2</sub> de 1 mg/cm<sup>2</sup> ou 4 mg/cm<sup>2</sup>) sur la viabilité cellulaire de 2 bacilles sous formes sporulées : *B.cereus* (a) et *B.subtilis* (b).

Comme dans le cas des formes sporulées, aucune réduction logarithmique n'a été observée pour *A.brasiliensis* (figure 43 (a)) et pour *C.albicans* (figure 43 (b)).

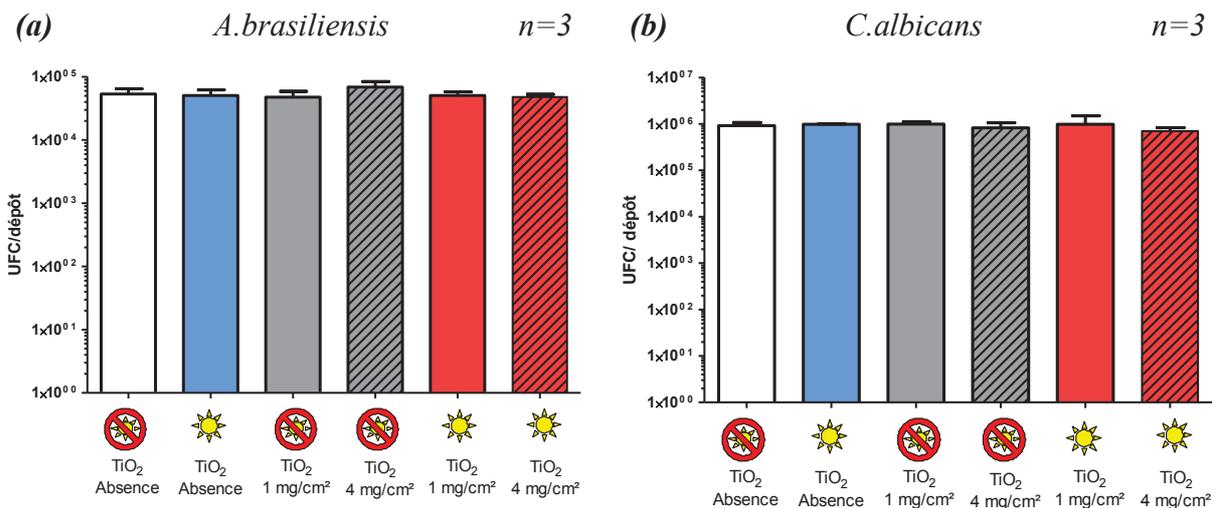


Figure 43 Détermination par dénombrement sur milieux gélosés de l'effet du rayonnement UV-A (20 min à 30 W/m<sup>2</sup>), de l'effet cytotoxique du TiO<sub>2</sub> (1 mg/cm<sup>2</sup> et 4 mg/cm<sup>2</sup>) et de l'effet photocatalytique du TiO<sub>2</sub> (20 min sous rayonnement UV-A de 30 W/m<sup>2</sup> avec une densité surfacique de TiO<sub>2</sub> de 1 mg/cm<sup>2</sup> ou 4 mg/cm<sup>2</sup>) sur la viabilité cellulaire de 2 champignons : *A.brasiliensis* (a) et *C.albicans* (b).

### 2.3. Tableau récapitulatif de l'efficacité antimicrobienne obtenue sur lors du dépôt de TiO<sub>2</sub> sur lame de verre

Le tableau 20 reprend les réductions logarithmiques obtenues pour chaque espèce microbienne testée (espèces bactériennes/spores/champignons) après un traitement photocatalytique pendant 20 min sous irradiance UV-A à 30 W/m<sup>2</sup>. L'effet photocatalytique antimicrobien le plus prononcé a été obtenu pour les bactéries à Gram négatif avec une réduction de 2 log à 5 log, tandis que nous avons observé une réduction au maximum de 3 log pour les bactéries à Gram positif et une absence de réduction que ce soit pour les spores bactériennes ou les champignons.

Tableau 20 Tableau récapitulatif de l'effet antimicrobien du TiO<sub>2</sub> sur différents contaminants (bactéries, spores bactériennes, champignons), avec différentes densités surfaciques en TiO<sub>2</sub>, pour 20 min de rayonnement UV-A avec une irradiance de 30 W/m<sup>2</sup>

Réduction (en log)	Contaminants	Dépôt de TiO <sub>2</sub> (mg/cm <sup>2</sup> )
5	<i>S.Abony</i>	4
	<i>A.baumannii</i>	1 ; 4
	<i>K.pneumoniae</i>	1 ; 4
	<i>E.cloacae</i>	4
4	<i>Y.enterocolitica</i>	1 ; 4
	<i>S.maltophilia</i>	4
	<i>E.cloacae</i>	4
	<i>P.aeruginosa</i>	1 ; 4
	<i>E.coli</i>	0,5 ; 1 ; 4
3	<i>S.maltophilia</i>	1
	<i>E.cloacae</i>	1
	<i>B.cereus végétatif</i>	1 ; 4
2	<i>S.Abony</i>	1
	<i>E.faecalis</i>	1 ; 4
	<i>S.epidermidis</i>	1 ; 4
	<i>S.aureus</i> résistant à la méticilline	1
1	<i>S.aureus</i> résistant à la méticilline	4
	<i>S.aureus</i>	1 ; 4
	<i>K.sedentarius</i>	1 ; 4
< 0,01	<i>B.subtilis végétatif</i>	1 ; 4
	<i>B.cereus</i> spores	1 ; 4
	<i>B.subtilis</i> spores	1 ; 4
	<i>A.brasiliensis</i>	1 ; 4
	<i>C.albicans</i>	1 ; 4

### **3. Influence et représentativité du mode d'évaluation sur surface**

Lors des études réalisées avec dépôt de TiO<sub>2</sub> sur surface, l'efficacité antimicrobienne photocatalytique a été évaluée pour deux environnements de composition diamétralement opposée : **en environnement riche** en éléments nutritifs et sur **surface « pauvre » exempt de nutriments**. Ce sous-chapitre a pour but de déterminer l'influence des modes de tests utilisés (nature du dépôt de TiO<sub>2</sub>, mode de comptage...) dans le but de comprendre les différences et les similitudes d'efficacité antimicrobiennes obtenues. Des interprétations seront apportées quant aux différences de résultats logarithmiques en fonction des microorganismes ciblés. Enfin nous essaierons d'extrapoler ces modèles d'études à des environnements réels tout en ayant un regard objectif et critique.

#### **3.1. Influence de la nature du dépôt de TiO<sub>2</sub>**

D'ores et déjà, il est important de considérer que les deux dépôts de TiO<sub>2</sub> sur surface sont très différents puisque lors de l'étude de screening sur milieu gélosé, TiO<sub>2</sub> est en contact du milieu gélosé alors que dans le cas du revêtement sur surface inerte, TiO<sub>2</sub> est directement déposé sur le verre et se présente par conséquent plutôt sous forme « sèche » (poudre).

#### **3.2. Influence de la méthode de test sur la rapidité d'obtention des résultats**

Dans le cadre de la détermination de l'efficacité antimicrobienne avec TiO<sub>2</sub> en milieu gélosé nutritif, il s'agissait d'une étude rapide de screening faisant varier plusieurs paramètres (quantité initiale de l'inoculum, dépôt surfacique en TiO<sub>2</sub> et irradiance) et permettant ainsi pour une condition définie de déposer la vingtaine d'espèces microbiennes sur un même milieu gélosé, alors que lors de l'étude sur surface « sèche » des dénombrements successifs sur milieux gélosés ont été nécessaires et ce pour chaque espèce microbienne testée. Ainsi pour l'étude sur milieux gélosés nutritifs, les résultats combinant les 3 paramètres d'étude et la vingtaine de microorganismes sont obtenus rapidement (moins de 15 jours), tandis que pour l'étude sur lamelle en verre, plusieurs semaines ont été nécessaires.

#### **3.3. Mode de comptage**

Pour les deux conditions, il s'agit certes d'une estimation de la croissance sur milieu gélosé (effet qualitatif visuel pour l'étude sur milieu gélosé nutritif et effet quantitatif pour l'étude sur lamelle en verre), mais les **échelles de réduction logarithmique utilisées sont différentes** puisque :

- lors de l'étude en milieu gélosé nutritif réalisée à partir de critères visuels subjectifs, nous ne pouvons pas observer de réductions supérieures à **2 log**
- lors de l'étude sur lamelle en verre, nous pouvons observer des réductions de **5 log** de la viabilité cellulaire

### 3.4. Interprétation des différences d'inactivation photocatalytiques obtenues en fonction des microorganismes ciblés

Dans ce paragraphe, nous distinguerons tout d'abord les différences d'inactivation photocatalytiques obtenus entre bactéries à **Gram négatif** et bactéries à **Gram positif** puis nous aborderons le cas des spores et des champignons. Enfin une conclusion sera apportée sur l'ensemble des microorganismes considérés en s'appuyant plus particulièrement sur les résultats obtenus pour l'étude du TiO<sub>2</sub> déposé sur lames de verre.

#### 1) Différences d'inactivation entre les bactéries à **Gram négatif** et les bactéries à **Gram positif**

##### Cas de dépôt de TiO<sub>2</sub>/milieu gélosé MH

Dans l'étude avec TiO<sub>2</sub> en milieux gélosés nutritifs, la répartition et la classification des bactéries à **Gram négatif** et à **Gram positif** au sein des cinq catégories prédéfinies (tableau 18) restent quelque peu **hétérogène** mais nous pouvons constater que globalement, pour ces conditions d'étude, les bactéries à **Gram positif** sont plus sensibles à la photocatalyse que les bactéries à **Gram négatif** avec 8 bactéries à **Gram positif** sensibles à la photocatalyse pour 3 bactéries à **Gram négatif** sensibles. Au vu de ces résultats nous ne pouvons pas proposer une explication unique qui discriminerait strictement les différences de réduction obtenues. La différence de structure de la paroi entre ces bactéries ainsi que leur différence de sensibilité aux ROS produits lors de la photocatalyse pourraient expliquer ces résultats.

Pour rappel, la paroi cellulaire des bactéries à **Gram positif** est essentiellement composée d'une couche très épaisse mais **poreuse** de peptidoglycane représentant environ 90 % de la paroi cellulaire, tandis que les bactéries à **Gram négatif** sont composées d'une fine couche de peptidoglycane représentant environ 10 % seulement de la paroi recouverte d'une bicouche phospholipidique externe (membrane externe) principalement composée de lipopolysaccharide (LPS) et de lipoprotéine.<sup>266</sup> Le peptidoglycane est formé d'une partie glucidique (le polysaccharide) et d'une partie peptidique. Il entoure les cellules bactériennes et leur confère leur rigidité mécanique. Il a aussi un rôle de protection de la cellule contre la lyse osmotique. Chez les bactéries à **Gram négatif**, c'est la membrane externe qui est la première ligne de défense contre le milieu extérieur.

Des résultats similaires ont été obtenus chez Page *et al.* lors de l'analyse de l'effet antimicrobien du TiO<sub>2</sub> vis-à-vis de *S.aureus*, *B.cereus* et *E.coli*, les deux bactéries à **Gram positif** étaient beaucoup plus sensibles à la photocatalyse avec 3 à 4 log de réduction contre 0,5 log pour *E.coli*.<sup>267</sup> Selon ces auteurs, ces différences seraient dûes à la présence chez les bactéries à **Gram négatif** d'une barrière semi-perméable aux radicaux hydroxyles : la

<sup>266</sup> Markowska-Szczupak A, Ulfig K, Morawski AW: **The application of titanium dioxide for deactivation of bioparticulates: an overview.** *Catalysis Today* 2011, **169**:249 - 257.

<sup>267</sup> Page K, Palgrave RG, Parkin IP, Wilson M, Savin SLP, Chadwick AV: **Titanium and silver-titanium composite films on glass—potent antimicrobial coatings.** *Journal of materials chemistry* 2007, **17**(95-104).

membrane externe. Ils supposent ainsi que les radicaux hydroxyles peuvent préférentiellement interagir avec les lipides de la membrane externe plutôt que de la franchir.

Travaillant sur milieu gélosé nutritif saturé en eau, le radical hydroxyle est généré suite à l'activation du TiO<sub>2</sub> (réaction des trous (h<sup>+</sup>) photogénérés avec l'eau adsorbée). Ainsi chez les bactéries à **Gram négatif**, la membrane externe du fait de sa composition protégerait en quelque sorte la membrane cytoplasmique de l'attaque des radicaux hydroxyles. A l'inverse chez les bactéries à **Gram positif** le peptidoglycane, réseau maillé tridimensionnel rigide mais poreux pourrait les laisser pénétrer pour attaquer directement la membrane cytoplasmique et induire la mort cellulaire. Il est important toutefois de considérer que d'autres ROS générées (radical anion superoxyde O<sub>2</sub><sup>•-</sup>, peroxyde d'hydrogène H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>...) interviennent dans ces effets antibactériens et se comportent probablement comme les radicaux hydroxyles, ce qui complique les interprétations. Il ne s'agit ainsi que d'une **hypothèse pouvant expliquer les quelques différences de réduction entre bactéries à Gram positif et bactéries à Gram négatif**. Notons également qu'il ne s'agit que d'une étude de screening et que des différences de réductions plus distinctes entre les bactéries à **Gram positif** et les bactéries à **Gram négatif** ont été observées dans le cas de l'étude réalisée avec dépôt de TiO<sub>2</sub> sur surface « sèche » (ou « pauvre »).

#### Cas de dépôt de TiO<sub>2</sub> sur lame de verre

Pour cette étude, à l'inverse de la précédente, ce sont les bactéries à **Gram négatif** qui ont été le plus facilement inactivées (réductions logarithmiques de 2 à 5 log) en comparaison avec les réductions logarithmiques obtenues pour les bactéries à **Gram positif** (maximum de réduction de 3 log).

Dans ce cas, nous pensons que la structure de la paroi de la bactérie est importante. En effet, il a été montré par Van Grieken *et al.* que les bactéries à **Gram négatif** avaient une adhésion supérieure sur TiO<sub>2</sub> immobilisé par rapport aux bactéries à **Gram positif**.<sup>268</sup> Ceci viendrait du fait que les bactéries à **Gram négatif** possèdent dans leur membrane externe du lipopolysaccharide (LPS) qui favorise leur adhésion sur surface hydrophile.<sup>269</sup> Or le contact physique bactéries-TiO<sub>2</sub> est fondamental pour induire une réduction de la viabilité cellulaire.<sup>270</sup> De ce fait, il n'est pas étonnant que les bactéries à **Gram négatif** soient plus sensibles dans cette configuration à la photocatalyse. De plus, toutes les bactéries à **Gram négatif** utilisées sont des **bactéries d'origine hydrique**. De ce fait, sur milieu « sec », il n'est pas à exclure que le stress hydrique puisse également amplifier chez les bactéries à **Gram négatif** l'effet photocatalytique.

<sup>268</sup> Van Grieken R, Marugan J, Sordo C, Pablos C: **Comparison of the photocatalytic disinfection of *E.coli* suspensions in slurry, wall and fixed-bed reactors.** *Catalysis Today* 2009, **144**:48-54.

<sup>269</sup> Li B, Logan BE: **Bacterial adhesion to glass and metal-oxide surfaces.** *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* 2004, **36**(2):81-90.

<sup>270</sup> Gogniat G, Thyssen M, Denis M, Pulgarin C, Dukan S: **The bactericidal effect of TiO<sub>2</sub> photocatalysis involves adsorption onto catalyst and the loss of membrane integrity.** *FEMS microbiology letters* 2006, **258**(1):18-24.

✓ Cas particulier des formes végétatives de *B.cereus* et de *B.subtilis*

Dans le cas de *B.cereus* sous forme végétative qui sont des bacilles à Gram positif variables,<sup>271,272</sup> une réduction de 3 log a été obtenue. Cette réduction est intermédiaire entre les réductions obtenues pour les Gram négatif (réduction allant de 3 log à 5 log) et les réductions obtenues pour les Gram positif (réduction au maximum de 3 log). En revanche, pour les formes végétatives de *B.subtilis*, bactérie aérobie stricte, nous n'avons pas obtenu de réduction de la viabilité cellulaire. Il est difficile d'expliquer cette différence mais une des hypothèses pourrait être le fait que dans le genre *Bacillus*, *B.subtilis* est une bactérie aérobie stricte contrairement à *B.cereus* et serait plus à même de se défendre contre le stress oxydatif. Cependant, il ne faut pas généraliser cette explication vis-à-vis des bactéries aérobies strictes car on remarque que *S.maltophilia* et *P.aeruginosa* qui sont des bactéries aérobies strictes présentent une réduction élevée.

**2) Absence de réduction photocatalytique pour les formes sporulées et les champignons**

En ce qui concerne les spores, nous n'avons obtenu aucune réduction en présence de TiO<sub>2</sub> irradié que ce soit pour l'étude sur milieu gélosé nutritif ou sur lame de verre. Les spores sont des formes de résistance qui peuvent survivre à différents environnements extrêmes (dessiccation, hautes températures, milieux pauvres en nutriments, radiation gamma, radiation UV, désinfectants chimiques...<sup>273</sup> Elles sont composées d'une paroi épaisse ce qui peut leur conférer une résistance au stress oxydatif<sup>274</sup> et au processus photocatalytique.<sup>275</sup>

Dans une étude de Lee *et al.*, des essais ont été réalisés sur *E.coli* et sur des spores de *B.cereus* en présence de P25 Degussa-Evonik activée sous lumière solaire UV. Aucune réduction n'a été obtenue dans le cas des spores de *B.cereus*, tandis qu'après 1 h sous rayonnement solaire, les formes végétatives d'*E.coli* ont été totalement détruites.<sup>276</sup>

Plus récemment en 2009, Kau *et al.* se sont intéressés à l'inactivation des formes sporulées de *Bacillus* (étude réalisée chez *B.subtilis*, *B.thuringiensis*, *B.cereus* et *B.anthraxis*), avec dépôt de TiO<sub>2</sub> en couche mince. Aucune réduction n'a été obtenue après 25 minutes sous lumière visible (irradiance de 90 mW/cm<sup>2</sup>). En revanche grâce au dopage du TiO<sub>2</sub> à l'azote, les performances de dégradation photocatalytique ont pu être améliorées permettant ainsi la destruction de 25 % à 40 % des formes sporulées.<sup>277</sup>

<sup>271</sup> De Vos P, Garrity M, Jones D, Krieg N, Ludwig W, Rainey F, Schleifer K-H, Whitman B: **Bergey's manual of systematic bacteriology** In: *Second edition The Firmicutes*. vol. 3; 2009: 22.

<sup>272</sup> Puvabanditsin S, Zaafran A, Garrow E, Diwan R, Mehta D, Phattraprayoon N: ***Bacillus cereus* meningoencephalitis in a neonate**. *HKJ Paediatr* 2007, **12**:293-296.

<sup>273</sup> Liou JW, Chang HH: **Bactericidal Effects and Mechanisms of Visible Light-Responsive Titanium Dioxide Photocatalysts on Pathogenic Bacteria**. *Arch Immunol Ther Exp (Warsz)* 2012.

<sup>274</sup> Riesenman PJ, Nicholson WL: **Role of the spore coat layers in *Bacillus subtilis* spore resistance to hydrogen peroxide, artificial UV-C, UV-B, and solar UV radiation**. *Applied and environmental microbiology* 2000, **66**(2):620-626.

<sup>275</sup> Josset S, Keller N, Lett MC, Ledoux MJ, Keller V: **Numeration methods for targeting photoactive materials in the UV-A photocatalytic removal of microorganisms**. *Chemical Society reviews* 2008, **37**(4):744-755.

<sup>276</sup> Lee SH, Pumprueg S, Moudgil B, Sigmund W: **Inactivation of bacterial endospores by photocatalytic nanocomposites**. *Colloids and surfaces B, Biointerfaces* 2005, **40**(2):93-98.

<sup>277</sup> Kau JH, Sun DS, Huang HH, Wong MS, Lin HC, Chang HH: **Role of visible light-activated photocatalyst on the reduction of anthrax spore-induced mortality in mice**. *PLoS one* 2009, **4**(1):e4167.

Pour les deux **champignons, uniquement testés pour l'étude sur lame de verre**, *A. brasiliensis* qui est un champignon imparfait (*Fungi imperfecti*<sup>278</sup>) et *C. albicans* qui est une levure, il n'y a pas eu de réduction significative après un traitement photocatalytique de 20 min à 30 W/m<sup>2</sup> quelle que soit la densité surfacique. Les champignons (mycètes) sont des organismes eucaryotes uni-cellulaires ou pluri-cellulaires. Sur le plan biochimique, la paroi des champignons est composée de polysaccharides (glucanes, mannanes, chitine) et de protéines.<sup>279</sup> Elle confère à ces derniers un rôle de soutien et protégerait de l'action néfaste des ROS.<sup>280,279</sup> La chitine est en fait un polymère constitué de résidus de N-acétyl-D glucosamine lié par des liaisons  $\beta$ -1,4 et elle est souvent décrite comme une structure de soutien chez les champignons.<sup>281</sup> Il est cependant important de préciser que le groupe des champignons est très divers, filamenteux, levures d'où des différences d'inactivation photocatalytique.<sup>266</sup>

Dans le cas d'*A. brasiliensis*, aucune réduction significative n'a été obtenue. Des résultats similaires ont été montrés dans un article de Seven *et al.*, en milieu liquide, avec utilisation de lumière solaire (lampe à vapeur de sodium) et TiO<sub>2</sub> P25 Degussa-Evonik. Les trois espèces bactériennes sélectionnées (*E. coli*, *P. aeruginosa*, *S. aureus*) ont été détruites en 40 min, tandis que pour les deux champignons testés (*S. cerevisiae*, *C. albicans*), des durées de 120 min ont été nécessaires pour leur élimination. Dans le cas d'*A. brasiliensis*, ce microorganisme est décrit comme résistant étant donné qu'aucune diminution significative n'a été relevée.<sup>282</sup>

Etant donné qu'aucune réduction de la viabilité cellulaire n'a été obtenue lors du traitement photocatalytique pour les spores bactériennes et les champignons, nous pourrions tester des durées d'exposition plus longues ou augmenter l'irradiance (la quantité de TiO<sub>2</sub> déposée ne semblant pas influencer ici sur l'efficacité de réduction).

### **3) Conclusion sur l'efficacité d'inactivation photocatalytique en fonction des microorganismes ciblés**

Dans le cas de **TiO<sub>2</sub> déposé en milieu gélosé nutritif** il a été montré que globalement les bactéries à Gram positif étaient plus sensibles à la photocatalyse que les bactéries à Gram négatif. **Ces résultats pourraient être expliqués par des différences de structure membranaire** : en effet les bactéries à Gram négatif sont composées d'une fine couche de peptidoglycane mais qui est recouverte d'une membrane externe. A l'inverse chez les bactéries à Gram positif, il n'y a pas de membrane externe, de ce fait les ROS pourraient plus

<sup>278</sup> Chabase D, Bouchara J-P, de Gentile L, Brun S, Cimon B, Penn P: **Cahier de Formation Bioforma**; 2002.

<sup>279</sup> Calzavara-Pinton PG, Venturini M, Sala R: **A comprehensive overview of photodynamic therapy in the treatment of superficial fungal infections of the skin**. *Journal of photochemistry and photobiology B, Biology* 2005, **78**(1):1-6.

<sup>280</sup> Murdoch LE, Mckenzie K, M. Maclean M, Macgregor SJ, Anderson JG: **Lethal effects of high-intensity violet 405-nm light on *Saccharomyces cerevisiae*, *Candida albicans*, and on dormant and germinating spores of *Aspergillus niger***. *Fungal biology* 2013. <http://dx.doi.org/10.1016/j.funbio.2013.05.004> consulté le 6 juillet 2013

<sup>281</sup> Merzendorfer H: **The cellular basis of chitin synthesis in fungi and insects: common principles and differences**. *European Journal of cell biology* 2011, **90**:759-769.

<sup>282</sup> Seven O, Dindar B, Aydemir S, Metin D, Ozinel MA, Icli S: **Solar photocatalytic disinfection of a group of bacteria and fungi aqueous suspensions with TiO<sub>2</sub>, ZnO and Sahara desert dust**. *Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry* 2004, **165**:103-107.

facilement pénétrer la couche épaisse de peptidoglycane poreuse pour attaquer la membrane cytoplasmique. De ce point de vue la membrane externe aurait un rôle de protection vis-à-vis de l'attaque des ROS dans le cas des bactéries à **Gram négatif**.

D'après les résultats établis sur une courte durée d'illumination (20 min), nous avons pu mettre en évidence que l'efficacité de l'inactivation photocatalytique avec **dépôt de TiO<sub>2</sub> sur lames de verre en milieu pauvre (« sec »)** est fortement liée à la structure membranaire et à l'origine du biotope bactérien. Ainsi dans le cas de dépôt de TiO<sub>2</sub> sur surface type lame de verre, l'adhésion des bactéries à **Gram négatif** sur le support est privilégié du fait de la présence du LPS. Ainsi le contact entre les bactéries et TiO<sub>2</sub> serait favorisé réduisant de ce fait la distance d'action des ROS générées et améliorant l'efficacité d'inactivation. Ainsi dans les cas où TiO<sub>2</sub> est déposé sur surface, l'efficacité d'inactivation photocatalytique suivraient l'ordre : bactéries à **Gram négatif** >> bactéries à **Gram positif** > spores et champignons.

Mitoraj *et al.* ont également observé sur surface ces différences d'inactivation entre les bactéries à **Gram négatif**, les bactéries à **Gram positif** et les champignons. Leurs expériences ont été réalisées à l'aide de TiO<sub>2</sub> dopé au carbone activé sous lumière visible ( $\lambda > 455$  nm), ou sous lumière UV-visible. Comme pour nos travaux, ils ont obtenu des cinétiques d'inactivation beaucoup plus lentes dans le cas de *C.albicans* ou d'*A.brasiliensis* que dans le cas des bactéries, avec une cinétique d'inactivation suivant l'ordre : *E.coli* > *S.aureus*  $\approx$  *E.faecalis* >> *C.albicans*  $\approx$  *A.brasiliensis*.<sup>283</sup>

En 2003, Kühn *et al.* ont comparé l'inactivation photocatalytique de *C.albicans* à celle de quatre autres bactéries incriminées dans des défauts d'hygiène (*E.coli*, *P.aeruginosa*, *S.aureus* et *E.faecium*). Dans cette étude, le TiO<sub>2</sub> P25 Degussa a été déposé sur du plexiglas et activé sous lumière UV-A. Pour ces bactéries, une réduction de plus de 6 log a été obtenue pour 60 min d'illumination, tandis que dans le cas de *C.albicans* seulement 2 log de réduction ont été enregistrés. Ainsi il avait été établi que l'efficacité d'élimination suivait l'ordre : *E.coli* > *P.aeruginosa* > *S.aureus* > *E.faecium* > *C.albicans*.<sup>284</sup>

Ces résultats nous confortent dans l'idée que l'enveloppe des microorganismes est la cible initiale de la réaction photocatalytique et que cette dernière est impliquée dans la mort cellulaire.<sup>285</sup>

Les résultats obtenus par les deux techniques utilisées nous confortent également dans l'idée qu'il n'est pas possible d'extrapoler les résultats d'*E.coli* à d'autres types bactériens et qu'ils sont surtout dépendants du mode de test utilisé.

<sup>283</sup> Mitoraj D, Janczyk A, Strus M, Kisch H, Stochel G, Hezko PB, Macyk W: **Visible light inactivation of bacteria and fungi by modified titanium dioxide**. *Photochem Photobiol Sci* 2007, **6**(6):642-648.

<sup>284</sup> Kühn KP, Chaberny IF, Massholder K, Stickler M, Benz VW, Sonntag HG, Erdinger L: **Disinfection of surfaces by photocatalytic oxidation with titanium dioxide and UVA light**. *Chemosphere* 2003, **53**(1):71-77.

<sup>285</sup> Huang Z, Maness P-C, Blake D, Wolfrum E, Smolinski S, Jacoby W: **Bactericidal mode of titanium dioxide photocatalysis**. *Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry* 2000, **130**:163 -170.

### 3.5. Influence de la densité surfacique en TiO<sub>2</sub> sur l'efficacité d'inactivation

Après avoir vu cette différence d'inactivation photocatalytique liée à la composition membranaire, nous pouvons nous intéresser aux différences de réduction obtenues pour une même espèce microbienne en fonction des densités surfaciques en TiO<sub>2</sub> utilisées: pour l'étude sur milieu gélosé nutritif, 5 densités surfaciques en TiO<sub>2</sub> ont été utilisées avec 0 ; 0,5 ; 1 ; 2 et 4 mg/cm<sup>2</sup> et pour l'étude sur lame de verre, 3 ont été utilisées avec 0 ; 1 et 4 mg/cm<sup>2</sup>. Dans le cas où TiO<sub>2</sub> est déposé en milieu gélosé, celui ne se présente pas sous forme de poudre totalement disponible pour réagir avec les contaminants puisqu'il est additionné de milieu gélosé MH. De ce fait, bien que la seconde couche de TiO<sub>2</sub>/gélose MH soit relativement peu épaisse (1 mm de hauteur), il ne faut pas oublier que l'ajout de milieu gélosé nutritif sur TiO<sub>2</sub> peut réduire considérablement l'accès des rayonnements UV-A sur TiO<sub>2</sub> ainsi que l'accès des contaminants au photocatalyseur ce qui réduit l'efficacité d'inactivation photocatalytique (voir paragraphe suivant).

De ce fait, de faibles densités surfaciques en TiO<sub>2</sub> comme 0,5 ou 1 mg/cm<sup>2</sup> (exposées pendant 60 min de rayonnement UV-A à 30 W/m<sup>2</sup>) n'entraînent une réduction de la viabilité cellulaire que pour 3 espèces bactériennes (les formes végétatives de *B.cereus* (2), et *B.subtilis* (10) et *K.sedentarius* (17), tableau 17). En revanche pour la densité surfacique de 4 mg/cm<sup>2</sup> (avec la même irradiance que précédemment), une réduction de la viabilité cellulaire a été observée pour 9 espèces bactériennes (les formes végétatives de *B.cereus* (2), et *B.subtilis* (10), *E.faecium* (11), SARM (14), *Y.enterocolitica* (15), *V.cholerae* (16), *K.sedentarius* (17), *S.epidermidis* (18), tableau 17). Ainsi pour la gamme de densité surfacique en TiO<sub>2</sub> utilisée dans ces conditions, plus la densité surfacique est importante, plus il y a de TiO<sub>2</sub> accessible au rayonnement et au contaminant ce qui augmente le nombre de microorganismes touchés (de manière qualitatif et quantitatif). Par ailleurs, rien ne nous assure que la teneur optimale en TiO<sub>2</sub> permettant d'inactiver le plus de microorganismes soit atteinte à 4 mg/cm<sup>2</sup>. Pour répondre à cette question il faudrait tester une concentration surfacique encore plus élevée et comparer l'efficacité de réduction photocatalytique en termes de nombre d'espèces touchées et de pourcentage d'inactivation avec les résultats du dépôt en TiO<sub>2</sub> de 4 mg/cm<sup>2</sup>.

En revanche pour l'étude sur **surface « sèche »**, nous avons constaté que pour la majorité des espèces bactériennes, il n'y a pas eu de différences de réduction en fonction des densités surfaciques en TiO<sub>2</sub> utilisées (1 ou 4 mg/cm<sup>2</sup>). En effet, pour de nombreuses espèces bactériennes (*A.baumannii*, *K.pneumoniae*, *Y.enterocolitica*, *P.aeruginosa*, *E.coli*, *B.cereus* végétatif, *E.faecalis*, *S.epidermidis*, *S.aureus* et *K.sedentarius*), le maximum de réduction logarithmique a été obtenu pour un dépôt de TiO<sub>2</sub> de 1 mg/cm<sup>2</sup>.

D'une manière générale, l'effet bactéricide augmente avec la charge en photocatalyseur, en raison d'une plus grande surface disponible pour réagir. Cependant, il existe une charge/densité surfacique optimale au-delà de laquelle les performances photocatalytiques n'augmentent plus. Ceci est principalement dû à une diminution de l'éclairage des couches inférieures du TiO<sub>2</sub> (effet d'écrantage/profondeur de pénétration des photons), mais aussi à la limitation de la diffusion interne des bactéries dans l'épaisseur du revêtement.

Comme nous n'avons pas observé d'amélioration de l'effet bactéricide en présence d'un dépôt en TiO<sub>2</sub> à 4 mg/cm<sup>2</sup> comparés aux résultats obtenus avec un dépôt en TiO<sub>2</sub> à 1 mg/cm<sup>2</sup>,

nous pouvons donc supputer que le plateau est atteint dès le dépôt en TiO<sub>2</sub> de 1 mg/cm<sup>2</sup>. Dans le cas d'*E.coli* où nous avons testé un dépôt supplémentaire en TiO<sub>2</sub> à 0,5 mg/cm<sup>2</sup>, il n'y a pas de différence de réduction de viabilité cellulaire entre 0,5 mg/cm<sup>2</sup> et 4 mg/cm<sup>2</sup> de TiO<sub>2</sub>, ce qui pourrait laisser supposer que le palier soit inférieur à 0,5 mg/cm<sup>2</sup> pour *E.coli* et même peut-être pour d'autres espèces bactériennes.

Les polluants chimiques, dont la taille est de l'ordre de l'angström, sont plus susceptibles de diffuser/pénétrer dans la porosité du revêtement du TiO<sub>2</sub>, tandis que les bactéries, dont la taille est de l'ordre du micron, devraient pénétrer plus difficilement dans le revêtement. De ce fait, il ne serait pas surprenant que la teneur optimale en TiO<sub>2</sub> soit plus élevée lorsque les réactifs sont chimiques que lorsque les réactifs sont de type biologique.

Une étude réalisée avec TiO<sub>2</sub> PC105 (Millenium, Grimsby, UK, activé sous lumière visible (2,7 à 3,99 W/m<sup>2</sup>) et UV (0,05 à 0,12 W/m<sup>2</sup>)) déposé sur membrane acétate de cellulose et utilisée pour l'inactivation d'*E.coli* (dépôt de 300 UFC sur membrane de filtration) a déterminé un palier d'inactivation de l'ordre de 0,4 mg/cm<sup>2</sup> ce qui corrobore nos résultats (<0,5 mg/cm<sup>2</sup>).<sup>286</sup> Les auteurs estiment également que pour des densités surfaciques en TiO<sub>2</sub> PC105 de l'ordre de 0,6 à 1,5 mg/cm<sup>2</sup>, le photocatalyseur est déposé en plusieurs couches ce qui favoriserait la recombinaison des paires électrons-trous dans l'épaisseur du revêtement. Par ailleurs, Hermann *et al.*, 1999, mentionnent que pour des réacteurs photocatalytiques en lit fixe, la surface réactive optimale du TiO<sub>2</sub> est de l'ordre de 1,3 mg/cm<sup>2</sup>,<sup>287</sup> mais ceci concerne des réactifs chimiques.

Somme toute, de manière surprenante pour trois espèces bactériennes seulement, nous avons observé une amélioration de l'effet photocatalytique en présence d'un dépôt en TiO<sub>2</sub> de 4 mg/cm<sup>2</sup> comparé aux réductions obtenues avec un dépôt de TiO<sub>2</sub> à 1 mg/cm<sup>2</sup>. C'est le cas de *S.Abony*, *E.cloacae*, *S.maltophilia*, avec une amélioration de la réduction respectivement de 3 log, 1 log et 1 log quand on augmente la densité surfacique du dépôt de TiO<sub>2</sub> de 1 mg/cm<sup>2</sup> à 4 mg/cm<sup>2</sup>. Nous ne savons expliquer ce phénomène.

La **densité surfacique optimale** dépend donc du milieu environnant, mais plus surprenant, peut être également de la **bactérie ciblée**.

### 3.6. Effet de la composition de la surface (nutriments, eau) sur l'efficacité d'inactivation photocatalytique

L'étude de la réduction photocatalytique en présence de TiO<sub>2</sub>/ milieu gélosé MH montre que la répartition des microorganismes en liaison avec leur structure membranaire est quelque peu aléatoire. Bien que cette hétérogénéité de réponse soit probablement liée au fait que chaque espèce microbienne est équipée d'un arsenal enzymatique qui lui est propre et qui influe

<sup>286</sup> Caballero L, Whitehead KA, Allen NS, Verran J: **Inactivation of *E.coli* on immobilized TiO<sub>2</sub> using fluorescent light.** *Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry* 2009, **202**:92-98.

<sup>287</sup> Herrmann J-M: **Heterogeneous photocatalysis : fundamentals and applications to the removal of various types of aqueous pollutants.** *Catalysis Today* 1999, **53**:115-129.

inévitablement sur la réponse aux différents traitements (stress UV-A/cytotoxique du TiO<sub>2</sub>/photocatalytique), il est important de prendre en considération l'influence de la composition du milieu d'étude sur l'efficacité d'inactivation. En effet :

- en présence de matière organique (milieux gélosés nutritifs), les **ROS** générées en surface du catalyseur pourraient **dégrader la matière organique** au dépend des espèces bactériennes (phénomène de compétition entre la dégradation de la matière organique et celle des microorganismes) pouvant ainsi conduire à la formation de sous-produits éventuellement disponibles pour la cellule.<sup>288</sup>
- pour les microorganismes dits sensibles à la **dessiccation** comme principalement *P.aeruginosa*, la présence d'eau à la surface de la gélose nutritive constitue un **facteur favorable à la croissance** qui pourrait contrecarrer l'effet photocatalytique (et en particulier le stress oxydatif photogénéré).

A l'inverse, l'étude avec revêtement de TiO<sub>2</sub> sur lame en verre représente un **milieu inerte** où certains microorganismes sont **susceptibles d'être dégradés plus facilement**, du fait de conditions stressantes (dessiccation, manque de nutriments). Or les bactéries à Gram négatif ciblées sont des bactéries d'origine hydrique. De ce fait nous ne pouvons pas exclure le fait que le stress hydrique puisse également renforcer l'effet photocatalytique.

### 3.7. Représentativité des modes d'évaluation

L'étude sur milieu gélosé nutritif est donc représentative d'une évaluation de l'effet photocatalytique pour des environnements riches en nutriments et favorables à la survie microbienne notamment en terme de température optimale de croissance. Par extrapolation, nous pourrions imaginer qu'en présence de milieux nutritifs naturels (exemple : les biofilms), les bactéries soient plus difficilement éliminées par photocatalyse que sur milieux inertes.

A l'inverse, les surfaces « pauvres » pourraient être représentatives de tous types de revêtement de surface retrouvés dans les habitats (sols, murs...), les lieux publics, les dispositifs médicaux, l'industrie agroalimentaire, pharmaceutique...

Ainsi, nous pourrions considérer que les deux milieux d'étude utilisés correspondent plutôt à des environnements extrêmes en termes de composition. Dans la réalité, ces conditions ne seront que très rarement retrouvées (sauf applications spécifiques) et nous aurons dans la plupart du temps à faire à des revêtements/surfaces intermédiaires en termes de composition (eau, matière organique, rugosité...). Par conséquent, l'extrapolation de nos résultats obtenus aux conditions réelles reste ambitieuse et forcément biaisée du fait de multiples paramètres propres à chaque environnement tels que la composition en nutriments, la composition en microorganismes, le pH, la température... De plus, nos études ont été menées en ne prenant en considération la présence que d'un seul microorganisme, alors qu'en condition « réelle », les environnements d'études sont généralement complexes et que les microorganismes sont rarement retrouvés sous forme planctonique mais plutôt dans une matrice hautement hydratée

---

<sup>288</sup> Moncayo-Lasso A, Mora-Arismendi LE, Rengifo-Herrera JA, Sanabria J, Benitez N, Pulgarin C: **The detrimental influence of bacteria (*E. coli*, *Shigella* and *Salmonella*) on the degradation of organic compounds (and vice versa) in TiO<sub>2</sub> photocatalysis and near-neutral photo-Fenton processes under simulated solar light.** *Photochem Photobiol Sci* 2012, **11**:821-827.

polysaccharidique (le biofilm), cette dernière constituant bien souvent un environnement protecteur face aux différentes agressions.

## **II. Etude en milieu liquide**

Cette partie est consacrée à la détermination de l'efficacité antibactérienne de la photocatalyse en milieu liquide. Les objectifs sont d'évaluer par différentes méthodes cette efficacité, en faisant varier différents paramètres inhérents à l'action photocatalytique (durée sous rayonnement, concentration en  $\text{TiO}_2$ ). Pour ce faire, deux techniques ont été utilisées : la cytométrie capillaire qui en plus de déterminer l'efficacité de réduction logarithmique par une analyse de l'intégrité membranaire fournit également des informations quant aux phénomènes d'agrégation, et la technique traditionnelle de dénombrement sur milieu gélosé.

En effet, le choix d'une méthode adéquate pour évaluer cette efficacité photocatalytique est primordial ; cette méthode doit avant tout être sensible, reproductible, automatisable et rapide. Parmi les nombreuses méthodes de détermination de la viabilité cellulaire, l'analyse de l'intégrité membranaire par cytométrie capillaire couplée à l'utilisation de sondes fluorescentes se présente comme une technique prometteuse répondant aux critères préalablement définis.<sup>289,290,291,292</sup> Comparée à la technique de dénombrement sur milieux gélosés, la cytométrie capillaire présente de nombreux avantages puisqu'il s'agit d'une technique automatisée qui effectue les mesures sur un seul prélèvement, ce qui réduit le nombre d'étapes de préparation et augmente en conséquent la reproductibilité.

Utilisée dans de nombreuses applications en routine (immunologie, hématologie, oncologie, cytogénétique...), ou dans le domaine de la recherche, la cytométrie capillaire à notre connaissance n'a que peu été utilisée pour l'évaluation de l'effet photocatalytique bactéricide, mis à part dans l'étude de Gogniat *et al.*, 2006.<sup>293</sup> Nous avons donc sélectionné cette technique pour évaluer rapidement la viabilité cellulaire en complément de la technique traditionnelle de dénombrement sur milieux gélosés.

Cette étude en milieu liquide sera divisée en quatre sous-chapitres : le **premier** sera consacré à la présentation des **réacteurs photocatalytiques** utilisés, à la préparation des tests et aux modes opératoires requis lors de ces travaux en milieu liquide. Le **second** présentera le principe de l'analyse par **cytométrie** (principe de l'appareillage, des sondes fluorescentes utilisées –Syto 9 et Iodure de Propidium-...) ainsi que les réglages préliminaires du cytomètre qu'il est absolument nécessaire de réaliser pour définir les différentes zones de fluorescence. Grâce à cette technique, nous pourrons également apprécier **la formation des agrégats bactéries-TiO<sub>2</sub>**, paramètre indispensable à prendre en considération lorsque  $\text{TiO}_2$  est mis en

---

<sup>289</sup> Breeuwer P, Abee T: **Assessment of viability of microorganisms employing fluorescence techniques**. *International journal of food microbiology* 2000, **55**(1-3):193-200.

<sup>290</sup> Allegra S, Berger F, Berthelot P, Grattard F, Pozzetto B, Riffard S: **Use of flow cytometry to monitor *Legionella pneumophila***. *Applied and environmental microbiology* 2008, **74**:7813-7816.

<sup>291</sup> Josset S, Keller N, Lett MC, Ledoux MJ, Keller V: **Numeration methods for targeting photoactive materials in the UV-A photocatalytic removal of microorganisms**. *Chemical Society reviews* 2008, **37**(4):744-755.

<sup>292</sup> Berney M, Hammes F, Bosshard F, Weilenmann HU, Egli T: **Assessment and interpretation of bacterial viability by using the LIVE/DEAD BacLight Kit in combination with flow cytometry**. *Applied and environmental microbiology* 2007, **73**(10):3283-3290.

<sup>293</sup> Gogniat G, Thyssen M, Denis M, Pulgarin C, Dukan S: **The bactericidal effect of  $\text{TiO}_2$  photocatalysis involves adsorption onto catalyst and the loss of membrane integrity**. *FEMS microbiology letters* 2006, **258**(1):18-24.

suspension avec les contaminants. Enfin dans ce sous-chapitre, la cytométrie capillaire nous permettra de déterminer **l'efficacité des différents traitements** en étudiant **l'intégrité membranaire**. Pour les mêmes traitements appliqués et les mêmes conditions opératoires, le **troisième** sous-chapitre présentera les résultats obtenus par **dénombrements sur milieux gélosés**. Enfin, le **quatrième** sous-chapitre sera une **comparaison** entre les **résultats de détermination de la viabilité cellulaire** obtenue par **cytométrie capillaire** et ceux obtenus par **dénombrements sur milieux gélosés**. Des explications quant aux éventuelles différences de réductions logarithmiques observées seront apportées tout en considérant les avantages et les inconvénients de chaque technique.

## **1. Réacteurs photocatalytiques, préparation des tests et modes opératoires**

### **1.1. Préparation des suspensions bactériennes**

Une suspension bactérienne à  $10^8$  UFC/mL est préparée pour chaque espèce bactérienne testée (*E.coli* ; *P.aeruginosa* ; *S.aureus* ; *B.cereus*) selon le protocole décrit dans le chapitre 2 IV. 400  $\mu$ L de cette suspension sont ajoutés à 40 mL de bouillon MH (Biokar Diagnostics) et mis à incuber pendant 4 h à 37 °C afin d'obtenir une culture en phase exponentielle de croissance de l'ordre de  $10^8$  UFC/mL (figure 44). A partir de cette suspension bactérienne des contrôles indispensables aux réglages du cytomètre sont réalisés. En effet, ces contrôles - **bactéries vivantes** et **bactéries mortes**- servent à la détermination des différentes zones de fluorescence. Il est important de préciser que ces contrôles doivent être refaits pour chaque expérience, étant donné que les limites des zones de fluorescence peuvent varier légèrement d'une manipulation à l'autre et influencer sur les résultats (variation due à la croissance bactérienne, à l'affinité des fluorochromes avec les acides nucléiques, au laser...).

Pour le contrôle **bactéries mortes**, celles-ci ont été tuées par l'hypochlorite de sodium (8 mL de la suspension bactérienne en présence d'1 mL de NaClO de degré chlorométrique 4,5-5 pendant 15 min). Du fait de son pH élevé (*via* l'action des ions hydroxydes), l'hypochlorite de sodium induit notamment des réactions de saponification (acides gras), des réactions de chloraminations et la neutralisation des acides aminés.<sup>294</sup> De par son action perforatrice sur les membranes cellulaires, il induit un effet bactéricide et la bactérie peut ainsi conserver sa structure ou conduire à la formation d'agrégats complexes de divers composants cellulaires (protéines, ADN...). Ce puissant désinfectant altère rapidement l'intégrité membranaire (inhibition enzymatique irréversible) ainsi que le métabolisme cellulaire.<sup>299</sup> Du fait de ces propriétés oxydantes, l'hypochlorite de sodium présente des similitudes d'action à la photocatalyse hétérogène appliquée à la dégradation des microorganismes; les bactéries mortes par ce mécanisme constituent donc un témoin adéquat.

Afin d'éliminer l'hypochlorite de sodium de l'échantillon bactérien, 2 lavages à l'eau  $\phi$  ont été réalisés après centrifugation à 3000 x g pendant 5 min. Le contrôle bactérie vivante a

---

<sup>294</sup> Estrela C, Estrela CR, Barbin EL, Spano JC, Marchesan MA, Pecora JD: **Mechanism of action of sodium hypochlorite**. *Brazilian dental journal* 2002, **13**(2):113-117.

également subi cette centrifugation. Pour chaque témoin, le culot est remis en suspension dans 10 mL d'eau  $\phi$ . Une strie sur gélose TS de chaque témoin est également réalisée afin de valider ces contrôles d'un point de vue de leur activité bactéricide (inhibition ou non de croissance sur milieux gélosés nutritifs).

La suspension bactérienne est alors diluée au  $1/50^{\text{ème}}$  afin d'obtenir un inoculum final de l'ordre de  $10^6$  UFC/mL, cette population étant adéquate pour l'utilisation du kit live/dead qui sera détaillé ultérieurement.

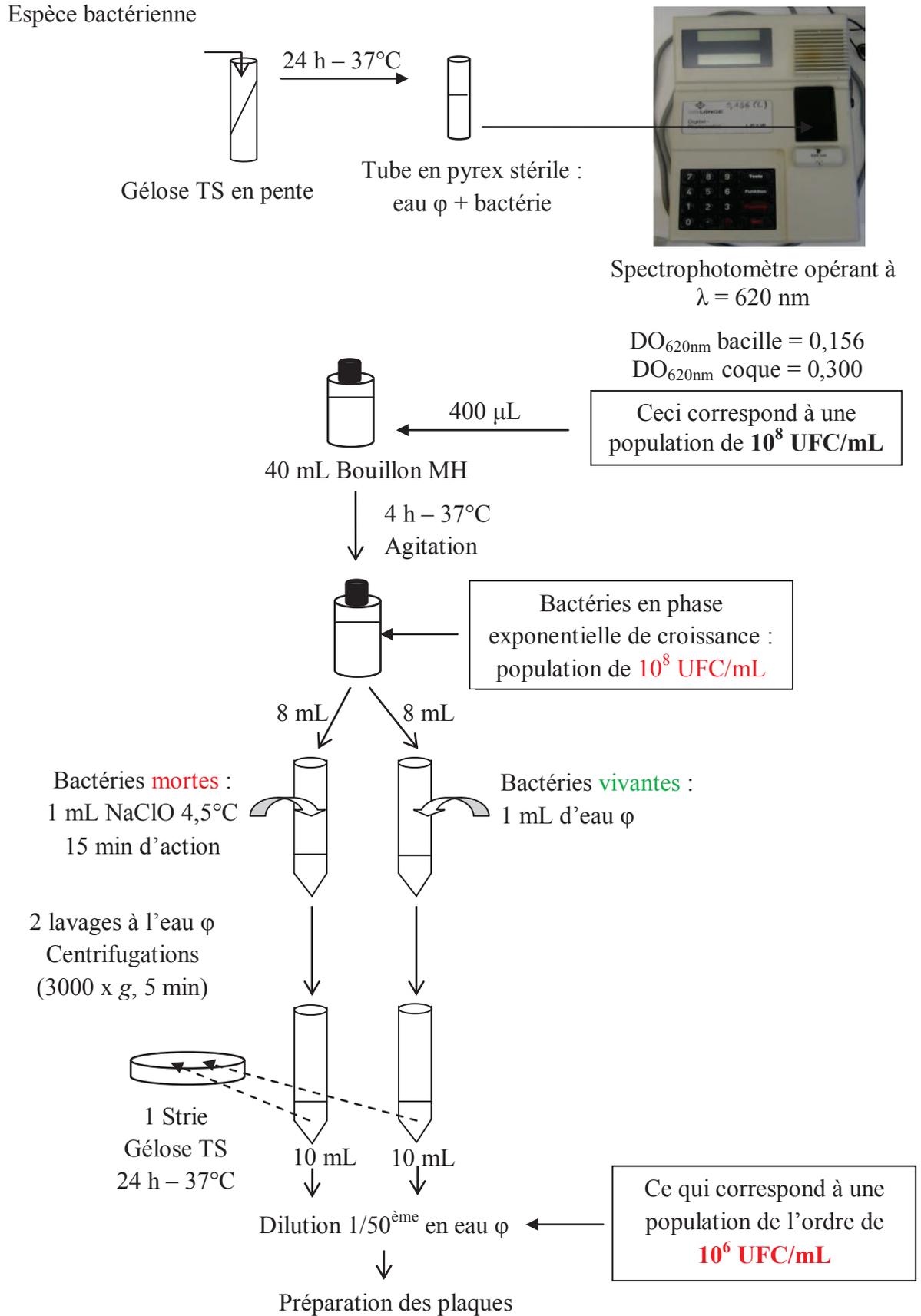


Figure 44 Schéma de préparation des suspensions bactériennes pour l'analyse par cytométrie capillaire

## 1.2. Plan d'une plaque type. Réacteurs photocatalytiques

Les tests sont réalisés à l'aide d'une plaque multi-puits à 96 puits.

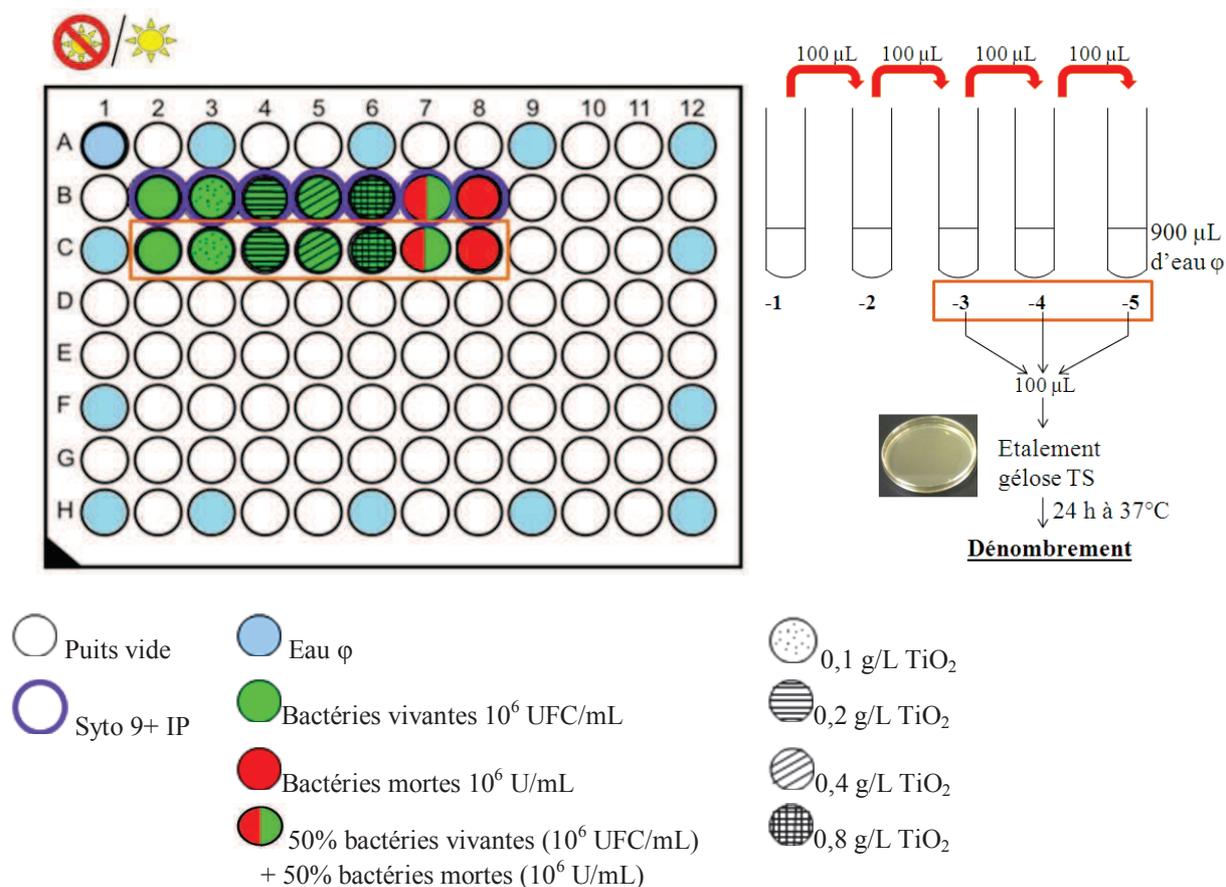


Figure 45 Plan d'une plaque type 96 puits

Trois plaques de type 96 puits sont réalisées pour chaque test (selon le plan présenté en figure 45). Pour chaque plaque, les cinq premiers puits (ligne B2 à B6) contiennent 90  $\mu$ L de bactéries vivantes à  $10^6$  UFC/mL ainsi que  $TiO_2$  à différentes concentrations ( $TiO_2$  apporté sous 10  $\mu$ L): 0 g/L de  $TiO_2$  pour B2; 0,1 g/L pour B3 ; 0,2 g/L pour B4 ; 0,4 g/L pour B5 et 0,8 g/L pour B6. Le puits B2 constitue le puits témoin bactéries vivantes. Le puits B8 contient uniquement des bactéries tuées par l'hypochlorite de sodium (bactéries à  $10^6$  U/mL). Le puits B7 est composé de 45  $\mu$ L de bactéries vivantes à  $10^6$  UFC/mL et de 45  $\mu$ L de bactéries mortes à  $10^6$  U/mL.

Cette ligne B est réalisée en double (ligne C).

Trois plaques sont réalisées :

- une plaque conservée à l'obscurité,
- deux autres plaques exposées au rayonnement UV-A (pendant 30 min pour l'une et pendant 60 min pour l'autre) avec une irradiance de  $30 \text{ W/m}^2$ .

Lors des tests, chaque plaque est placée sous agitation orbitale (1000 rpm).

Les puits B2 à B6 (ainsi que leurs doubles de la ligne C : C2 à C6) constituent donc les réacteurs photocatalytiques, avec un volume de suspension de 100  $\mu\text{L}$ . Les concentrations en  $\text{TiO}_2$  de 0,1 ; 0,2 ; 0,4 et 0,8 g/L correspondent respectivement à 10 ; 20 ; 40 et 80 mg de  $\text{TiO}_2$  dans les puits B3 (C3) à B6 (C6).

**La ligne B de chaque plaque est analysée au cytomètre capillaire** à l'aide du kit live-dead. Après test, 100  $\mu\text{L}$  du réactif live-dead préparé extemporanément sont ajoutés aux puits de la ligne B pour chacune des trois plaques.

**La ligne C sert pour le dénombrement sur milieux gélosés**, et 100  $\mu\text{L}$  d'eau  $\phi$  sont ajoutés dans les puits de la ligne C dans le but d'équilibrer les 100  $\mu\text{L}$  du kit live/dead ajouté à la ligne B.

Pour l'étude de dénombrement sur milieux gélosés, seuls les puits sans fluorochrome seront donc étalés (soit la ligne C sur la plaque) sur gélose TS, étant donné qu'au cours d'études préliminaires, nous nous sommes aperçus que le fluorochrome inhibait la croissance cellulaire en se liant à l'ADN. Les résultats obtenus après 24 h d'incubation à 37°C sont donc comparés avec ceux obtenus par cytométrie capillaire.

## **2. Détermination de l'intégrité membranaire en milieu liquide par cytométrie capillaire**

### **2.1. La cytométrie capillaire : principe et généralités**

La cytométrie en flux (CMF) est une technologie qui permet l'analyse **individuelle** de cellules se trouvant initialement au sein d'une population cellulaire hétérogène. La CMF permet une caractérisation **qualitative** (structurale ou fonctionnelle) et **quantitative** de particules en suspension dans un **liquide**.

Des milliers de cellules sont analysées par seconde sur la base des signaux optiques diffusés ou émis par chaque cellule traversant un rayon lumineux (rayon laser ou rayon d'une lampe à vapeur de mercure) (figure 46). Ces signaux sont liés à différents phénomènes optiques : phénomène de diffusion lumineuse (diffraction et réfraction), auto-fluorescence et fluorescence induite.

Les différents signaux lumineux diffusés sont focalisés et séparés par un système de miroirs et de filtres, puis transmis à un système de photomultiplicateurs ou photodiodes où ils seront captés, amplifiés et numérisés puis finalement traités et stockés par un ordinateur.<sup>295</sup>

D'autres cytomètres en flux permettent également le tri cellulaire.

<sup>295</sup> <http://cytobase.montp.inserm.fr/cours/cours.html#mozTocId232064> consulté le 8 mars 2013

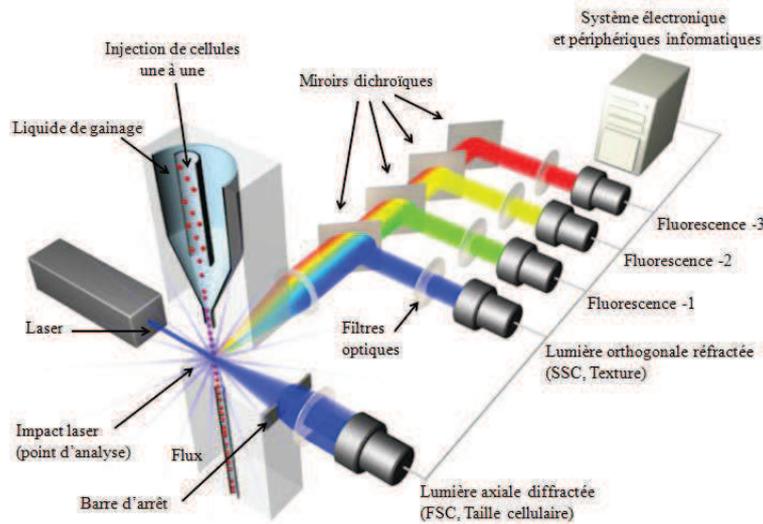


Figure 46 Principe de fonctionnement d'un cytomètre en flux

## 2.2. Les systèmes fluide, optique et électronique du cytomètre en flux

Le fonctionnement d'un cytomètre en flux repose sur 3 systèmes :

### 4) Le système d'entraînement des cellules

#### ✓ Le système fluide en CMF classique

Le système fluide réalise le centrage hydrodynamique des cellules. En effet, les cellules en suspension traversent un canal central puis sont injectées au centre d'un liquide de gaine dont l'écoulement est plus rapide (figure 47). Le flux est laminaire et les cellules sont contraintes de s'aligner l'une derrière l'autre en file indienne pour traverser le laser. C'est ce qui permet l'**analyse individuelle** des cellules.

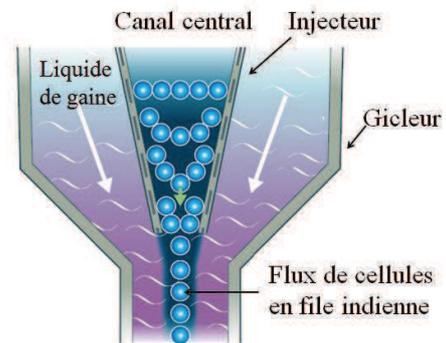


Figure 47 Composition du système fluide

#### ✓ Cas du système d'entraînement des cellules avec le cytomètre capillaire

Il est à préciser que le cytomètre utilisé (Guava Technologie) est un cytomètre capillaire. Par conséquent, le système fluide est légèrement différent : il n'y a pas de liquide de gaine et l'échantillon est absorbé à travers un capillaire. Cette absorption est régulée à l'aide d'une pompe à fluide de vitesse variable.<sup>296</sup>

<sup>296</sup> <http://pdfcast.org/download/guava-easyocyte-system-user-s-guide.pdf> consulté le 8 mars 2013

### 5) Le système optique

Les signaux optiques diffusés par la cellule seront analysés suivant 2 directions : suivant l'axe de propagation du laser et suivant un angle de 90° (figure 48):

- la lumière du laser diffractée dans l'axe rend compte de la section apparente des cellules, la **taille**, c'est le **Forward Scatter Channel (FSC)**
- la lumière du laser réfractée orthogonalement renseigne sur la **complexité** ou sur la **granulosité** de chaque cellule, il s'agit du **Side Scatter Channel (SSC)**
- la lumière réfractée orthogonalement autre que celle du laser incident correspond à de la **Fluorescence (FL intrinsèque ou induite)**.

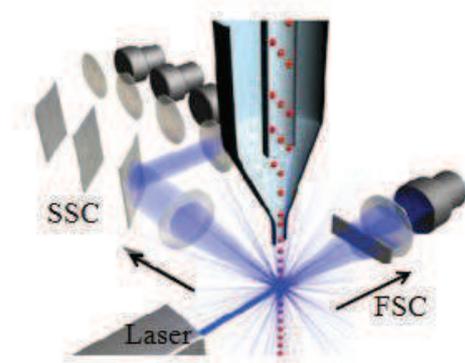


Figure 48 Deux paramètres physiques du système optique : le Forward Scatter Channel (FSC) et le Side Scatter Channel (SSC)

Ces signaux optiques émis sont focalisés puis séparés par une alternance de miroirs et de filtres optiques, en fonction de leur longueur d'onde (figure 49).

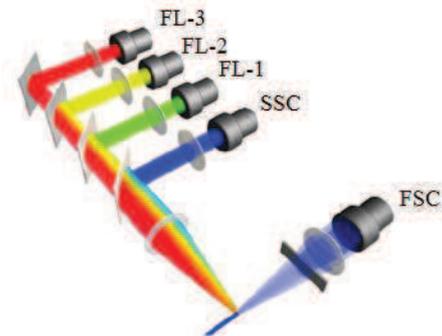


Figure 49 Différents filtres optiques : fluorescence (FL) ; Forward Scatter Channel (FSC) ; Side Scatter Channel (SSC)

### 6) Le système électronique

L'intensité lumineuse est ensuite convertie en un courant électrique à l'aide d'un photodétecteur (photodiode ou photomultiplicateur (PMT)). Les différents signaux électriques sont ensuite convertis en signaux numériques avec une amplification du signal.

La mesure de chaque détecteur est considérée comme un « paramètre ». Les données acquises sur chaque paramètre sont reconnues comme des « événements » et se réfèrent au **nombre** de cellules, à une **caractéristique physique** ou à un **marqueur d'intérêt**.

### 2.3. Kit live/dead back light (Invitrogen)

Pour nos expériences, nous avons utilisé le kit de fluorescence live/dead (Invitrogen, L13152)<sup>297</sup> qui est composé de deux sondes fluorescentes, le Syto 9 et l'Iodure de Propidium (IP), chaque sonde étant caractérisée par deux spectres :

- le spectre d'excitation
- le spectre d'émission

Dans le cas de notre étude la lumière absorbée est celle du laser bleu incident ( $\lambda_{\text{excitation}} = 488$  nm) et la fluorescence émise est celle des deux fluorochromes utilisés : le Syto 9 et l'Iodure de Propidium (IP) ( $\lambda_{\text{émission Syto 9}} = 530$  nm et  $\lambda_{\text{émission IP}} = 630$  nm) (figure 50).

L'écart entre les valeurs maximales d'excitation et d'émission est appelée valeur ou déplacement de Stokes. Le déplacement de Stokes est caractérisé par  $\lambda_{\text{excitation}} < \lambda_{\text{émission}}$ . Plus cet écart est important, meilleure est la distribution spectrale. Il est à préciser que la forme du spectre ne dépend pas de  $\lambda_{\text{excitation}}$ .

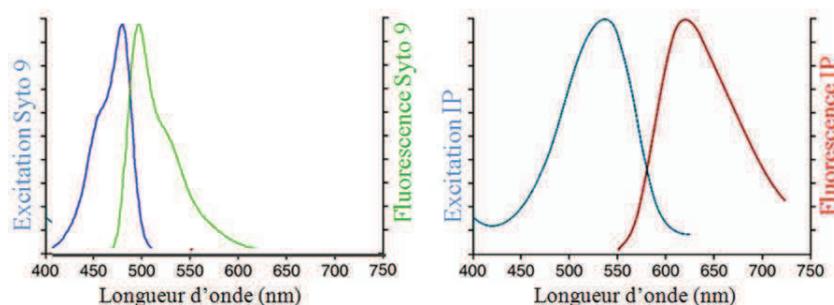


Figure 50 Spectre d'absorption et de fluorescence du Syto9/ADN et de l'IP/ADN.

#### Caractéristiques des deux sondes utilisées

**Le Syto 9** se lie à l'ADN et à l'ARN des cellules eucaryotes ou procaryotes, y compris des bactéries. Comme tous les fluorochromes de la classe Syto, il se caractérise par :

- une absorption molaire (ou coefficient d'extinction) élevée supérieure à  $50,000 \text{ cm}^{-1} \cdot \text{M}^{-1}$
- une fluorescence intrinsèque extrêmement faible avec un rendement quantique inférieur à 0,01 quand il n'est pas lié aux acides nucléiques
- une diffusion passive à travers quasi toutes les membranes cellulaires (figure 51)
- une compatibilité avec de nombreux fluorochromes, notamment l'IP.<sup>298</sup>

**L'Iodure de Propidium (IP)** se lie également à l'ADN et à l'ARN en s'intercalant entre les bases (1 molécule toutes les 4 à 5 bases), il se caractérise par :

- son hydro-solubilité. Les membranes cellulaires intactes sont peu perméables à l'IP tandis que les membranes endommagées le laissent pénétrer.

<sup>297</sup> <http://tools.invitrogen.com/content/sfs/manuals/mp07007.pdf> consulté le 8 mars 2013

<sup>298</sup> <http://www.mobitec.de/probes/docs/sections/0801.pdf> consulté le 8 mars 2013.

- une absorption molaire relativement faible
- un rendement quantique élevé quand il est lié aux acides nucléiques (augmentation de la fluorescence de 20 à 30 fois). Il est généralement utilisé comme contre colorant ou pour **marquer les cellules mortes** (figure 51).<sup>298</sup> Dans le cas du marquage de cellules mortes, on constate une diminution du rendement de fluorescence du Syto 9 aussitôt que l'IP pénètre la cellule marquée au Syto 9, dûe à une compétition des deux fluorochromes pour les mêmes sites de fixation (phénomène de quenching).<sup>299</sup>



Figure 51 Schéma de principe du kit live/dead commercialisé par Invitrogen. Le Syto 9 en vert pénètre aussi bien dans les bactéries vivantes que mortes, alors que l'iodure de propidium (IP) ne pénètre que dans les bactéries mortes

#### 7) Analyse par le cytomètre capillaire et présentation des paramètres utilisés

Le cytomètre capillaire utilisé est le Guava EasyCyte Plus System (figure 52) équipé des logiciels Guava Express® Plus/ExpressPro (Merck Millipore Guava Tech). Il est composé d'un laser bleu ( $\lambda=488$  nm) et de 4 filtres d'émission (525 nm, 583 nm, 680 nm et 785 nm) (figure 53 et tableau 21). Afin d'étudier l'impact de l'effet photocatalytique sur la viabilité cellulaire des différentes espèces bactériennes, des réglages préliminaires ont été effectués.

Tableau 21 Caractéristiques du cytomètre capillaire Guava Easy Cyte Plus System

Paramètres	Caractéristiques
Laser	Bleu $\lambda_{488}$ nm
Logiciel	Cytosoft 5.1
Nombre d'évènements analysés	10 000
Filtres d'émission	525 ; 583 ; 680 et 785 nm

<sup>299</sup> Berney M, Weilenmann HU, Egli T: **Flow-cytometric study of vital cellular functions in *Escherichia coli* during solar disinfection (SODIS).** *Microbiology* 2006, **152**(Pt 6):1719-1729.



Figure 52 Cytomètre capillaire et son équipement informatique

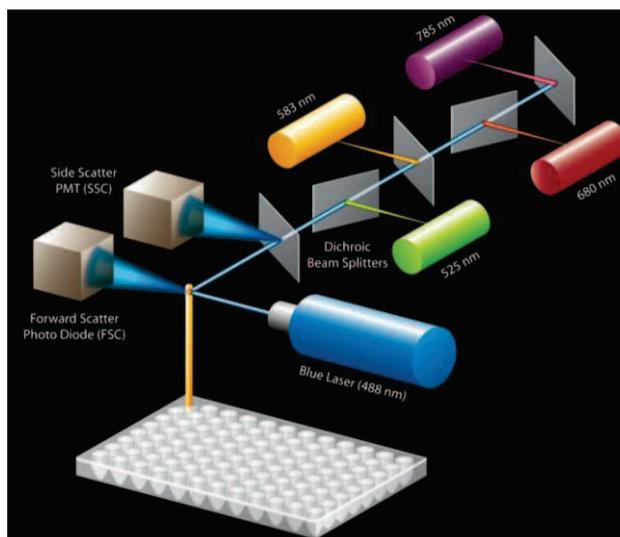


Figure 53 Laser bleu à  $\lambda = 488 \text{ nm}$  et ses 4 filtres d'émission (525 nm, 583 nm, 680 nm et 785 nm)

### 8) Représentation graphique des données

Les données sont présentées sous formes d'**histogrammes** ou de **cytogrammes** appelées également « diagrammes de dispersion » ou « dot plot ». Les histogrammes représentent la distribution des intensités pour un seul paramètre que le manipulateur choisi, alors que les cytogrammes représentent la corrélation entre deux paramètres.<sup>300</sup>

#### ✓ Histogramme

Sur les histogrammes, le nombre d'évènements est généralement représenté en ordonnée tandis qu'en abscisse figure par exemple le SSC, FSC ou la fluorescence. L'histogramme présenté (figure 54) informe sur la quantité d'évènements contenus dans l'échantillon correspondant à l'intensité de fluorescence rouge (RED-HLog).

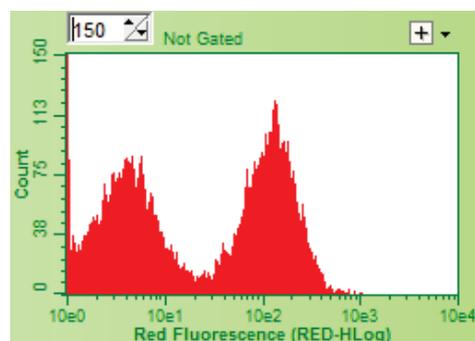


Figure 54 Histogramme représentant le nombre d'évènements correspondant à l'intensité de fluorescence rouge (RED-HLog)

Ce type de représentation peut être utile pour rapidement évaluer la normalité d'une répartition (répartition gaussienne), ou déterminer l'existence de sous-populations au sein de l'échantillon.

*NB : HLog sont des unités arbitraires.*

#### ✓ Cytogramme

Sur les cytogrammes (figure 55), chaque point représente un évènement et les coordonnées de chaque point sont relatifs aux intensités détectées pour chacun des deux paramètres (FSC/SSC)

<sup>300</sup> [http://crl.berkeley.edu/about\\_flow\\_cytometry.html](http://crl.berkeley.edu/about_flow_cytometry.html) consulté le 8 mars 2013.

ou fluorescence verte/fluorescence rouge). Sur le cytogramme de la figure 55 (a) chaque évènement détecté est représenté par un point en fonction de ces paramètres d'intensité physiques (paramètre de la granulosité et de la taille de chaque évènement). Sur le cytogramme de la figure 55 (b), chaque évènement fluorescent est représenté en fonction des intensités de fluorescence rouge et de fluorescence verte détectées (RED-HLog et GREEN-Hlog).

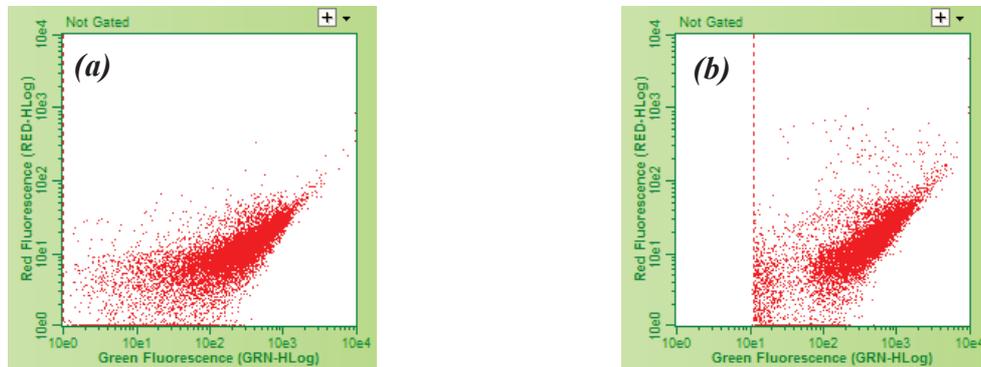


**Figure 55** Cytogramme présentant les paramètres physiques (SSC : granulosité ; FSC : taille) pour chaque évènement détecté de l'échantillon (a); cytogramme présentant pour chaque évènement analysé l'intensité de fluorescence rouge (RED-HLog) en fonction de l'intensité de fluorescence verte (GREEN-HLog) (b)

*NB : il est à noter que la couleur rouge des points est une couleur choisie arbitrairement et n'est en aucun cas un reflet de la fluorescence rouge.*

### 9) Seuil de l'analyse

C'est la limite inférieure à la détection par un photomultiplicateur. Il s'agit de mettre un seuil ou « threshold », pour que l'ordinateur n'analyse et n'affiche que les résultats liés aux particules dont le signal est supérieur au seuil fixé. Pour l'exemple, un seuil de 10e1 a été fixé sur la figure 56 (b) pour le paramètre « intensité de fluorescence verte ». Cette limitation permet d'exclure de l'analyse les particules auto-fluorescentes ou bien les débris de plus petite taille (figure 56 (a)).



**Figure 56** Cytogramme sans seuil de fluorescence (a) ; cytogramme avec un seuil de fluorescence verte à 10e1 GREEN-HLog (b)

### 10) Utilisation des fenêtres ou des «gates»

Il est très intéressant de pouvoir sélectionner graphiquement une sous-population sur un cytogramme pour pouvoir en définir les caractéristiques indépendamment des autres populations présentes dans l'échantillon. Sur le cytogramme de la figure 57 (a) représentant l'émission de fluorescence rouge (RED-HLog) en fonction de la fluorescence verte (GREEN-HLog), il n'y a pas de gate et nous pouvons distinguer 4 sous-populations (entourées en bleu). Cette même analyse est ensuite représentée sous forme d'un histogramme non gâté (figure 57 (b)). Cet histogramme détermine le nombre d'évènements d'un échantillon en fonction de l'intensité de fluorescence rouge (RED-HLog). De ce point de vue, la courbe ne correspondant pas typiquement à une courbe gaussienne ce qui laisse supposer que plusieurs populations présentant des intensités de fluorescence différentes constituent cet histogramme.

Le second cytogramme contient quand à lui une gate notée M1 (figure 57 (c)). L'historgramme correspondant de cette gate est présenté en figure 57 (d). Il représente également le nombre d'évènements fluorescents en rouge en fonction de l'intensité de fluorescence rouge (RED-HLog) mais seulement pour une population qui correspond à la gate M1 du cytogramme (figure 57 (c)). Cette gate permet ainsi de mieux apprécier les caractéristiques physiques et de fluorescence de cette population ciblée.

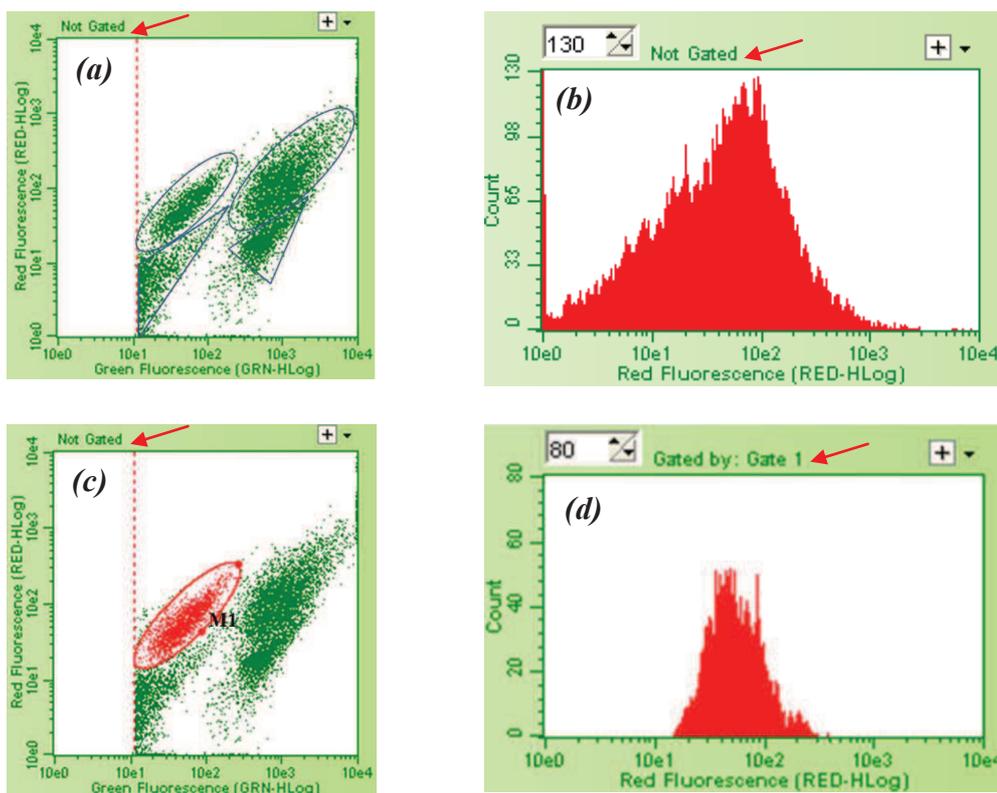


Figure 57 Cytogramme de la fluorescence rouge en fonction de la fluorescence verte sans gate, avec la distinction de 4 populations différentes (a); histogramme représentant le nombre d'évènements en fonction de la fluorescence rouge sans gate (b); cytogramme de la fluorescence rouge en fonction de la fluorescence verte avec une gate notée M1 (c); histogramme identique au (b) mais avec une gate correspondant à la population sélectionnée dans le cytogramme (c) (d).

## 2.4. Réglages préliminaires du cytomètre

### 1) Détermination de l'auto-fluorescence et de la fluorescence non spécifique

Il est essentiel avant de commencer les analyses, de fixer le seuil de l'auto-fluorescence des différentes « espèces » ou milieux mis en jeu lors des différentes manipulations, à savoir l'eau physiologique stérile non filtrée (eau  $\phi$ ), les bactéries et le  $\text{TiO}_2$ , mais aussi de préciser la fluorescence non spécifique de ces espèces en présence des fluorochromes (Syto 9 + IP), afin d'être en mesure de déterminer le signal propre aux bactéries (vivantes ou mortes) marquées par les fluorochromes.

Ainsi, tout d'abord il a été évalué :

- l'auto-fluorescence en eau  $\phi$  des bactéries seules à  $10^6$  UFC/mL (figure 58 (a))
- l'auto-fluorescence du  $\text{TiO}_2$  à 0,8 g/L (figure 58 (b))
- la fluorescence non spécifique des fluorochromes (Syto 9 et IP) en eau  $\phi$  (figure 58 (c))
- la fluorescence non spécifique des fluorochromes (Syto 9 et IP) en présence de  $\text{TiO}_2$  à 0,8 g/L (figure 58 (d)).

Cette auto-fluorescence et cette fluorescence non spécifique en présence des fluorochromes sont présentées sous forme de cytogrammes permettant une séparation de chaque évènement détecté en fonction des intensités de deux fluorescences : à savoir selon l'axe vertical, la répartition des évènements en fonction de l'intensité de fluorescence rouge (RED-Hlog) et selon l'axe horizontal, la répartition de ces mêmes évènements en fonction de l'intensité de fluorescence verte (GREEN-Hog).

### Les cytogrammes d'auto-fluorescence

Que ce soit pour *E.coli* (figure 58 (a)) ou le  $\text{TiO}_2$  (figure 58 (b)) en absence de sondes fluorescentes, le seuil d'auto-fluorescence est relativement bas : il est majoritairement de l'ordre de  $10e0$  pour l'intensité de fluorescence verte (GREEN-HLog) et inférieur à  $10e2$  pour celui de la fluorescence rouge (RED-HLog).

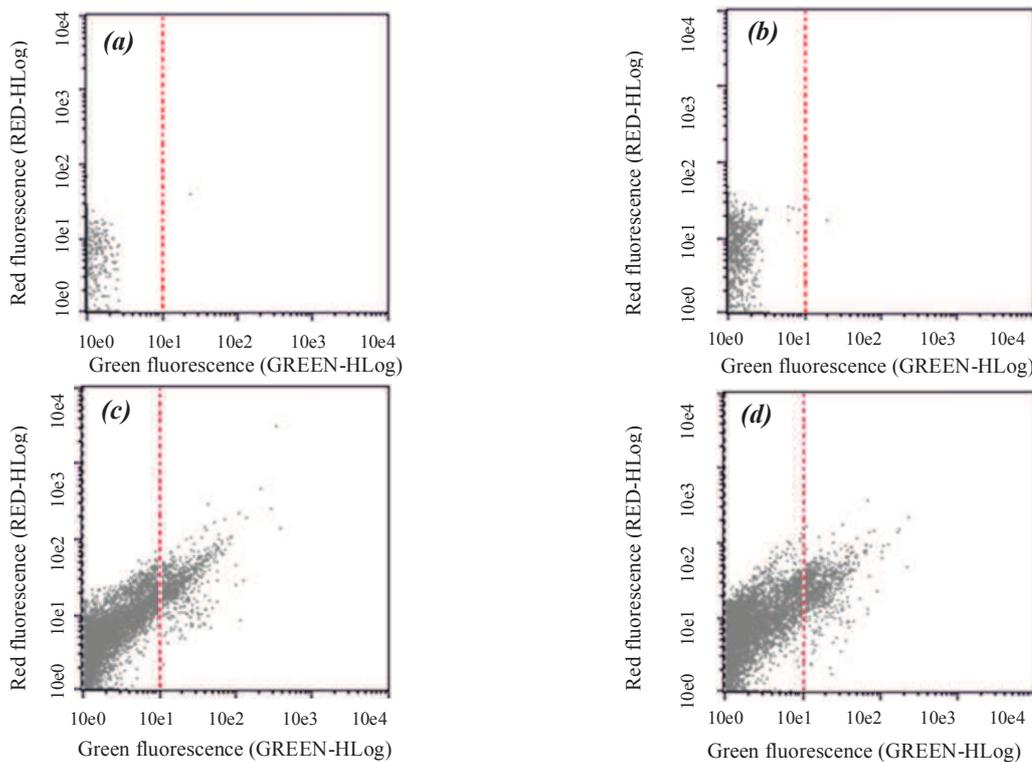
Le niveau d'auto-fluorescence a également été évalué pour les bactéries tuées par l'hypochlorite de sodium. Il est apparu que quelles que soient les espèces bactériennes (*E.coli*, *P.aeruginosa*, *S.aureus* et *B.cereus* sous forme végétative) et leur état de viabilité (qu'elles soient vivantes ou mortes), les signaux d'auto-fluorescence sont identiques, de sorte que seul le signal d'auto-fluorescence d'*E.coli* a été présenté ici (figure 58 (a)).

De même, l'étude de l'auto-fluorescence des suspensions de  $\text{TiO}_2$  a montré que le signal d'auto-fluorescence reste très faible pour les deux intensités de fluorescence prises en considération, quelles que soient les concentrations en  $\text{TiO}_2$  de 0,1 g/L, 0,2 g/L, 0,4 g/L et 0,8 g/L de  $\text{TiO}_2$ .

**Les cytogrammes de fluorescence non spécifique**

L'étude de la fluorescence non spécifique de l'eau  $\phi$  (figure 58 (c)) et du  $\text{TiO}_2$  (figure 58 (d)) en présence des fluorochromes montre que les évènements détectés sont plus nombreux que pour les deux premiers cytogrammes et que ces évènements se répartissent suivant une diagonale séparant l'axe de la fluorescence verte (GREEN-HLog) et l'axe de la fluorescence rouge (RED-HLog). Ainsi, en présence de fluorochromes, une fluorescence non spécifique apparait et pourrait correspondre à des impuretés présentes dans l'eau  $\phi$ , de sorte qu'un seuil devra nécessairement être appliqué afin de ne pas prendre en considération ces évènements non spécifiques de fluorescence. Ce seuil correspond cependant à un signal de fluorescence relativement faible. Ainsi, afin d'obtenir des cytogrammes moins « encombrés », nous avons fixé un seuil de significativité de la fluorescence verte en éliminant dans les analyses suivantes, les particules ayant une fluorescence verte d'intensité inférieure à «  $10e1$  unités arbitraires » (figure 58).

Dans les systèmes étudiés, ceci permet d'éliminer totalement les phénomènes d'auto-fluorescence et une part importante de ceux de fluorescence non spécifique.

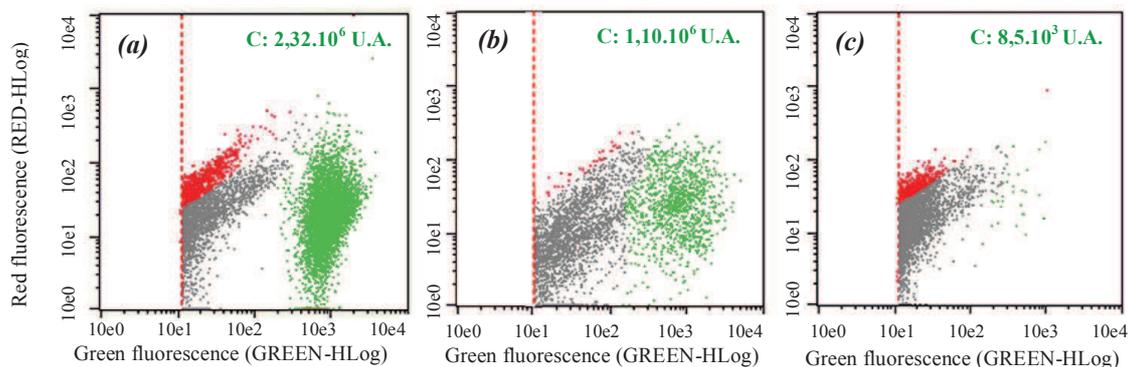


**Figure 58** Cytogrammes déterminant l'auto-fluorescence des particules analysées par cytométrie capillaire; *E. coli* (a);  $\text{TiO}_2$  0,8 g/L (b); Eau  $\phi$  + Syto 9 + IP (c) ;  $\text{TiO}_2$  0,8 g/L + Syto 9 + IP (d)

## 2) Détermination de la fluorescence spécifique liée aux bactéries marquées par les fluorochromes (Syto 9 + IP)

Afin de définir la délimitation des différentes zones de fluorescence, différents puits contrôles ont été préparés pour chaque espèce bactérienne (*E.coli*, *P.aeruginosa*, *B.cereus* et *S.aureus*) :

- un puits contenant uniquement des bactéries vivantes à  $10^6$  UFC/mL (figure 59 (a))
- un puits contenant 50 % de bactéries vivantes soit une population de l'ordre de  $5.10^5$  UFC/mL), et 50 % de bactéries mortes à  $5.10^5$  U/mL tuées par l'hypochlorite de sodium à 4,5 de degré chlorométrique (figure 59 (b)).
- un dernier puits ne contenant que des bactéries mortes à  $10^6$  U/mL (figure 59 (c)).



**Figure 59** Cytogrammes déterminant la fluorescence spécifique d'*E. coli* marquée par les fluorochromes (Syto 9 + IP) ; *E. coli* vivantes à  $10^6$  UFC/mL (a) ; 50 % d'*E. coli* vivantes à  $10^6$  UFC/mL + 50 % tuées par l'hypochlorite de sodium à  $10^6$  U/mL (b) ; *E. coli* tuées par l'hypochlorite de sodium à  $10^6$  U/mL (c). Différentes zones de fluorescence sont colorées en vert, rouge et gris et correspondent respectivement aux évènements présentant une fluorescence caractéristique des **bactéries vivantes**, des **bactéries mortes** et des débris cellulaires de fluorescence.

C correspond au nombre d'évènements en Unité Arbitraire (U.A.) possédant des caractéristiques de fluorescence typiques des bactéries vivantes (colorées en vert)

A partir de ces contrôles, nous avons pu définir trois zones distinctes de fluorescence :

- **1)** une zone de fluorescence caractérisée par un signal de la fluorescence verte assez élevée (ce signal ayant un seuil supérieur à  $10e2$  GREEN-HLog) et un signal de la fluorescence rouge pouvant être assez étendue (de  $10e0$  à  $10e2$  RED-HLog). **Cette zone colorée en vert correspond aux bactéries dont l'intégrité membranaire est intacte : il s'agit des évènements présentant des caractéristiques de fluorescences typiques des bactéries vivantes.** En raison de l'intégrité membranaire des bactéries, le Syto 9 a pu se fixer aux acides nucléiques bactériens (ADN et ARN), tandis que les membranes intactes n'ont pas permis l'entrée de l'IP. Cette zone est bien visible dans le puits contrôle contenant les bactéries vivantes.

Sur chacun des cytogrammes est mentionné **C :...U.A.** : cette valeur en Unité Arbitraire correspond au nombre d'évènements détectés possédant des caractéristiques de fluorescence typiques des bactéries vivantes. Ainsi dans le puits ne contenant que des bactéries vivantes, il est estimé qu'il y a environ  $2,32.10^6$  U.A. d'évènements fluorescents dans cette région (figure 59 (a)).

Sur le deuxième cytogramme (figure 59 (b)), nous pouvons constater que l'ajout de 50 % de bactéries mortes à 50 % de bactéries vivantes induit une diminution par 2 du nombre d'évènements détectés dans cette région par rapport à ce qui est observé dans la figure 59 (a) soit un nombre d'évènements de l'ordre de  $1.10^6$  U.A.

De même, dans le puits contrôle ne contenant que des bactéries mortes (figure 59 (c)), les évènements détectés dans cette région sont très peu nombreux, environ  $8,5.10^3$  U.A.. Nous pouvons émettre les hypothèses suivantes : soit il s'agit d'une fluorescence non spécifique des évènements détectés, soit il s'agit de la limite de détection de l'appareil dans cette région de fluorescence (qui serait dans ce cas très basse).

- **2)** une zone de fluorescence caractérisée par un signal de la fluorescence rouge de l'ordre de  $10e1$  RED-HLog à  $10e2$  RED-HLog. **Cette zone de fluorescence colorée en rouge sur les cytogrammes correspond typiquement aux bactéries dont la membrane est lésée** : du fait de cette perméabilité membranaire, l'IP et le Syto 9 ont pu pénétrer et se fixer sur les acides nucléiques. Comparée aux bactéries vivantes, l'intensité du signal de la fluorescence verte (GREEN-HLog) est plus faible : ceci est dû à une compétition des deux fluorochromes pour les mêmes sites de fixation des acides nucléiques ; autrement dit l'IP qui peut maintenant pénétrer à travers les membranes lésées peut « déplacer » le Syto 9.<sup>301</sup>

Cette zone est par ailleurs bien visible dans le puits contrôle où il n'y a que des bactéries vivantes (figure 59 (a)), ce qui peut surprendre de premier abord. Toutefois, il ne faut pas oublier qu'après la croissance bactérienne exponentielle en bouillon nutritif, les bactéries ont été centrifugées et le culot bactérien a été remis en suspension en eau physiologique, ce qui peut léser les bactéries. Dans notre cas, ce nombre d'évènements (colorés en rouge) reste très minoritaire (environ  $3,09.10^5$  U.A.) en comparaison avec le nombre d'évènements considérés comme des bactéries dont l'intégrité membranaire est conservée (environ  $2,32.10^6$  U.A.).

Pour un mélange 50 % bactéries tuées par l'hypochlorite de sodium et 50 % de bactéries vivantes, cette zone est beaucoup moins marquée car les bactéries tuées par l'hypochlorite de sodium ont pu conduire à la formation de débris cellulaires, détectés dans la dernière zone de fluorescence présentée ci-dessous (**3**).

Enfin dans le puits ne contenant que des bactéries tuées, le nombre d'évènements dans cette zone de fluorescence reste minimale ; l'addition d'hypochlorite de sodium ayant conduit à la formation de débris cellulaires et à la formation de divers agrégats empêchant la fixation des fluorochromes.

- **3)** une dernière zone de fluorescence pour laquelle les signaux d'émission de fluorescence des deux paramètres détectés (rouge et vert) restent relativement plus faibles que ceux décrits auparavant. Cette zone colorée en gris correspond typiquement aux signaux d'autofluorescence de l'eau  $\phi$  et aux débris cellulaires, et pour les systèmes

---

<sup>301</sup> Lehtinen J, Nuutila J, Lilius EM: **Green fluorescent protein-propidium iodide (GFP-PI) based assay for flow cytometric measurement of bacterial viability.** *Cytometry Part A : the journal of the International Society for Analytical Cytology* 2004, **60**(2):165-172.

contenant TiO<sub>2</sub>, à la fluorescence non spécifique du TiO<sub>2</sub> qui est également retrouvée dans cette région.

Si l'on compare les trois cytogrammes présentés en figure 59, nous pouvons constater que le fait d'augmenter la concentration de bactéries tuées par l'hypochlorite de sodium (absence, 50 % et 100 % de bactéries tuées, visualisation respectivement figure 59(a), figure 59 (b) et figure 59 (c)), induit une augmentation du nombre d'évènements fluorescents dans cette région ; ce qui semble tout à fait logique car l'ajout d'hypochlorite de sodium entraîne la formation de débris cellulaires et de divers agrégats complexes composés de lipides, protéines... empêchant peu à peu la fixation des fluorochromes.

*Seuls les cytogrammes d'E.coli sont présentés ici, mais les différentes zones de fluorescence ont été déterminées pour chaque bactérie comme détaillé ci-dessus.*

### **3) Conclusion sur la délimitation des différentes zones de fluorescences**

Après avoir pris en compte lors des analyses l'auto-fluorescence et la fluorescence non spécifique de chaque entité intervenant lors de l'étude de la réaction photocatalytique, nous avons déterminé la fluorescence spécifique correspondant typiquement aux :

- bactéries vivantes
- bactéries mortes
- débris cellulaires.

La détermination de ces différentes régions de fluorescence et en particulier celle correspondant aux bactéries considérées comme vivantes, nous servira par la suite à déterminer la réduction du nombre d'évènements présentant une fluorescence caractéristique des bactéries vivantes suite aux différents traitements auxquels les populations bactériennes sont soumis (dont bien sûr les traitements photocatalytiques) et à établir les graphiques correspondants.

Partant du constat qu'une bactérie vivante peut conduire à la formation d'un nombre considérable de débris cellulaires, il nous paraît difficile d'établir une quelconque analyse statistique à partir de ces débris cellulaires et bactéries mortes. De plus, il n'est pas exclu que l'oxydation photocatalytique conduise à la formation de débris cellulaires de si faible taille, qu'ils ne seraient alors même plus détectés par le cytomètre. De ce fait, nous n'avons retenu dans les analyses statistiques que les évènements détectés dans la zone de **fluorescence correspondant à des bactéries dont l'intégrité membranaire est considérée comme conservée**. Cette région de fluorescence colorée arbitrairement en **vert** présente un signal de fluorescence dans le vert assez élevé, traduisant l'entrée du Syto 9 dans la cellule, et est accompagnée d'un signal de fluorescence **rouge** relativement faible, traduisant une non pénétration de l'IP dans la cellule.

## 2.5. Mise en évidence de la formation des agrégats bactéries-TiO<sub>2</sub> grâce aux paramètres de diffraction et de réfraction de la lumière du cytomètre.

Au cours de cette étude, nous nous sommes intéressés à l'interaction bactéries-TiO<sub>2</sub> grâce aux paramètres de diffraction et de réfraction de la lumière du cytomètre. Cette étude a été menée en faisant varier la concentration en TiO<sub>2</sub> (0 g/L ; 0,1 g/L, 0,2 g/L, 0,4 g/L et 0,8 g/L) pour différentes durées d'exposition au rayonnement UV-A (0 min, 30 min et 60 min) en présence d'une population initiale bactérienne de 10<sup>6</sup> UFC/mL.

Ainsi, sans l'ajout de marqueur de fluorescence, nous avons analysé pour chaque condition, les signaux optiques [bactéries seules (vivantes ou mortes), TiO<sub>2</sub> seul ou système TiO<sub>2</sub>+bactéries (vivantes ou mortes)] suivant deux directions:

- suivant l'axe de propagation du laser qui rend compte de la section apparente des évènements, soit la **taille**, il s'agit en fait du **Forward Scatter (FSC)**
- suivant un angle de 90° qui rend compte de la **complexité** ou de la **granulosité** de chaque évènement, il s'agit du **Side Scatter (SSC)**.

Comme pour l'intensité de fluorescence, ces paramètres sont exprimés en Unités Arbitraires (U.A).

La figure 60 montre l'influence de la concentration en TiO<sub>2</sub> sur les paramètres FSC et SSC des systèmes mixtes bactéries *E.coli*-TiO<sub>2</sub>, que ces bactéries soient vivantes ou mortes. Les cytogrammes présentés ont été réalisés après conservation des plaques 60 min à l'obscurité (sous agitation orbitale), mais les mêmes résultats ont été obtenus que les plaques aient été exposées au rayonnement UV-A pendant 30 ou 60 min ou non (résultats non montrés).

Par ailleurs, on peut noter que les mêmes types de cytogrammes ont été observés pour d'autres espèces bactériennes qu'*E.coli* (*P.aeruginosa*, *B.cereus* et *S.aureus*).

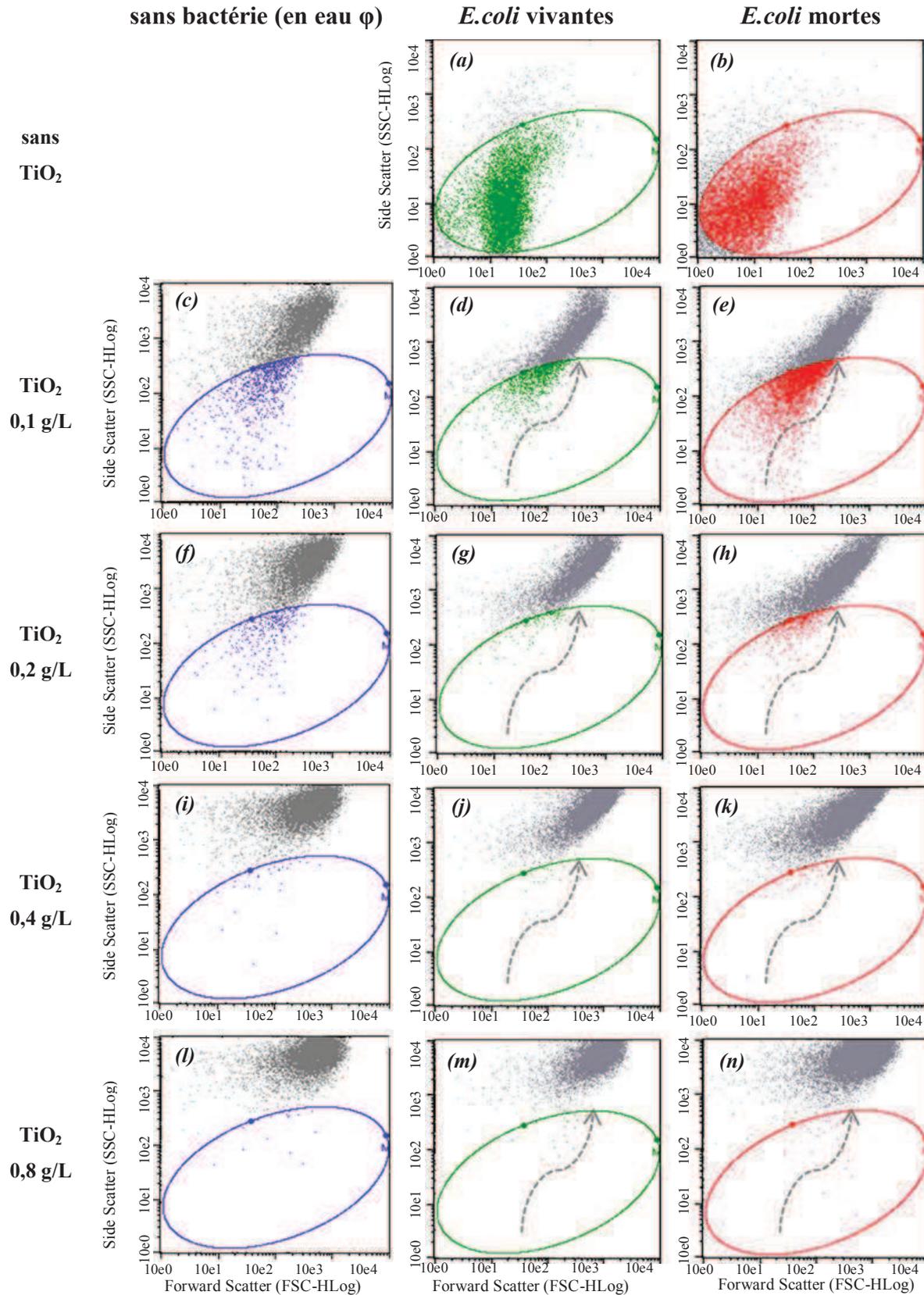


Figure 60 Influence de la concentration en  $\text{TiO}_2$  sur les paramètres Forward Scatter (FSC) et Side Scatter (SSC) en présence d'*E. coli* vivantes ( $10^6$  UFC/mL) ou *E. coli* mortes ( $10^6$  U/mL), en absence de rayonnement UV-A.

: déplacement des bactéries sur les agrégats de  $\text{TiO}_2$

### 1) Paramètres FSC et SSC pour les bactéries

Les bactéries vivantes (figure 60 (a)), les bactéries mortes et débris cellulaires (figure 60 (b)) occupent une seule et unique région bien déterminée au niveau du cytogramme Side Scatter (SSC) en fonction du Forward Scatter (FSC), celle-ci est délimitée par une fenêtre (ellipse).

Cette région caractérise les particules de petite taille et de faible granulosité traduisant ainsi une non agglomération des bactéries. En effet, pour les bactéries vivantes, la moyenne du signal FSC est de l'ordre de 17 U.A. et la moyenne du signal SSC est de l'ordre de 7 U.A. De même, pour les bactéries mortes, la moyenne du signal FSC est de l'ordre de 8 U.A et celui du signal SSC est de l'ordre de 14 U.A. Le fait de trouver un signal FSC de moitié pour les bactéries mortes par rapport aux bactéries vivantes, nous conforte dans l'idée de l'existence de débris bactériens générés par l'hypochlorite de sodium.

### 2) Paramètres FSC et SSC pour les particules de TiO<sub>2</sub> seules en eau $\phi$

Sur les cytogrammes obtenus en absence de bactéries et pour différentes concentrations en TiO<sub>2</sub> : 0,1 g/L (figure 60 (c)), 0,2 g/L (figure 60 (f)), 0,4 g/L (figure 60 (i)), 0,8 g/L (figure 60 (l)), nous constatons que les particules de TiO<sub>2</sub> s'agrègent. Nous observons une augmentation significative des deux paramètres déterminant la taille des événements (FSC) et la granulosité ou complexité des événements (SSC). Cette augmentation des deux paramètres est corrélée à l'augmentation de la concentration en TiO<sub>2</sub> puisqu'on passe de 150 U.A. à 488 U.A. pour le paramètre FSC et de 1120 U.A à 4467 U.A. pour le paramètre SSC pour une augmentation de la concentration en TiO<sub>2</sub> de 0,1 g/L à 0,8 g/L.

Il n'est pas surprenant que les particules de TiO<sub>2</sub> s'agrègent étant donné qu'elles sont mises en suspension dans de l'eau  $\phi$  dont le pH est d'environ 7 et que le PZC du TiO<sub>2</sub> P25 est de 6,5. En effet, à un pH proche du PZC, ce sont les forces attractives de Van Der Waals qui dominent majoritairement au dépend des forces électrostatiques de répulsion,<sup>302,303,304</sup> ce qui entraîne la formation d'agrégats de TiO<sub>2</sub> pouvant dépasser le micromètre.<sup>305</sup> Dans la publication de Pagnout *et al.*, 2012, il est rapporté que cette agrégation est très rapide car en moins de cinq minutes, la taille moyenne des agrégats de TiO<sub>2</sub> P25 à 0,1 g/L a atteint environ 400 nm.<sup>304</sup>

### 3) Paramètres FSC et SSC dans le cas d'un mélange bactérien avec des particules de TiO<sub>2</sub> en eau $\phi$

Dès 0,1 g/L de TiO<sub>2</sub>, que ce soit pour les bactéries vivantes (figure 60 (d)) ou les bactéries mortes (figure 60 (e)), nous pouvons constater un déplacement (schématisé par une flèche)

<sup>302</sup> Tseng WJ, Lin KC: **Rheology and colloidal structure of aqueous TiO<sub>2</sub> nanoparticle suspensions.** *Materials Science and Engineering: A* 2003, **355**(1-2):186-192.

<sup>303</sup> Horst AM, Neal AC, Mielke RE, Sislian PR, Suh WH, Madler L, Stucky GD, Holden PA: **Dispersion of TiO<sub>2</sub> nanoparticle agglomerates by *Pseudomonas aeruginosa*.** *Applied and environmental microbiology* 2010, **76**(21):7292-7298.

<sup>304</sup> Pagnout C, Jomini S, Dadhwal M, Caillet C, Thomas F, Bauda P: **Role of electrostatic interactions in the toxicity of titanium dioxide nanoparticles toward *Escherichia coli*.** *Colloids and surfaces B, Biointerfaces* 2012, **92**:315-321.

<sup>305</sup> Malato S, Fernandez-Ibanez P, Maldonado MI, Blanco J, Gernjak W: **Decontamination and disinfection of water by solar photocatalysis: recent overview and trends.** *Catalysis Today* 2009, **147**:1 - 59.

des signaux FSC et SSC enregistrés pour les bactéries vivantes ou mortes, de la zone initiale (sans TiO<sub>2</sub>) vers une zone d'intensité plus élevée.

En définitive, que ce soit pour les bactéries vivantes ou les bactéries mortes, l'ajout de TiO<sub>2</sub> induit une augmentation des signaux FSC et SSC mettant en évidence la formation d'agrégats bactéries-TiO<sub>2</sub>. Les moyennes de ces paramètres pour les différents systèmes étudiés sont présentées dans le tableau 22.

**Tableau 22** Moyenne des paramètres FSC et SSC en U.A. en présence de TiO<sub>2</sub> et d'*E.coli* vivantes (10<sup>6</sup> UFC/mL) ou mortes (10<sup>6</sup> U/mL), en absence de rayonnement

[TiO <sub>2</sub> ] (en g/L)	FSC (taille) en U.A.			SSC (granulosité) en U.A.		
	sans bactérie	bactéries vivantes	bactéries mortes	sans bactérie	bactéries vivantes	bactéries mortes
<b>0</b>		17	8		7	14
<b>0,1</b>	150	210	198	1120	1103	950
<b>0,2</b>	359	408	348	3215	3045	1042
<b>0,4</b>	419	620	479	3650	3900	3208
<b>0,8</b>	488	777	750	4467	4869	4852

De par les valeurs FSC et SSC obtenues (tableau 22), nous pouvons également dire que la taille et la complexité des agrégats sont dépendants de la concentration en TiO<sub>2</sub> : ainsi, plus la concentration en TiO<sub>2</sub> est élevée, plus les agrégats bactéries-TiO<sub>2</sub> sont de taille importante et denses. Remarquons également que la taille des agrégats bactéries-TiO<sub>2</sub> est similaire à la taille des agrégats de TiO<sub>2</sub>, de ce fait l'ajout de bactéries qu'elles soient vivantes ou mortes n'influe pas sur la taille de ces agrégats.

Nous ne pouvons fournir aucune donnée sur la taille des agrégats étant donné qu'il s'agit d'échelle en unité arbitraire. Néanmoins, il est fort probable qu'il s'agisse d'agrégats de la taille du dixième de millimètre. En effet, les bactéries ont une taille de l'ordre de 1 à 3 µm et il s'avère que les agrégats de bactéries-TiO<sub>2</sub> formés ont une taille environ 50 à 100 fois supérieure (d'après les résultats du tableau 22).

A pH optimal bactérien (5 à 7,5), les bactéries présentent toujours une charge négative de surface. Cependant au pH mesuré (7), le potentiel zéta de TiO<sub>2</sub> P25 est très faible, il est de l'ordre de -15 mV (figure 19). De ce fait la possible répulsion de TiO<sub>2</sub> est faible et les particules de TiO<sub>2</sub> s'agrègent. Dans ces agrégats sont inclus les bactéries, ces agrégats mixtes bactéries-TiO<sub>2</sub> seront particulièrement visibles dans la section suivante. N'oublions pas également que les phénomènes d'agrégation sont des phénomènes complexes qui mettent en jeu divers paramètres inter-reliés comme la composition du milieu, le pH, les forces ioniques, la composition en électrolytes, la température...<sup>304,306</sup>

<sup>306</sup> Neal. A: **What can be inferred from bacterium–nanoparticle interactions about the potential consequences of environmental exposure to nanoparticles?** *Ecotoxicology* 2008, 17:362-371.

Etant donné que nous n'avons pas observé de différences d'agrégation entre les systèmes bactéries vivantes-TiO<sub>2</sub> et les systèmes bactéries mortes-TiO<sub>2</sub>, ni entre les différentes espèces bactériennes (résultats non montrés), nous pouvons donc supposer que les interactions régissant ces phénomènes d'agrégation ne sont pas dépendant de l'état physiologique de la bactérie, ni même de sa composition membranaire.

En somme, **il s'avère que les phénomènes d'agrégation bactéries vivantes-TiO<sub>2</sub> ou bien bactéries mortes-TiO<sub>2</sub> sont largement influencés par la concentration en TiO<sub>2</sub> puisque plus la concentration en TiO<sub>2</sub> est augmentée, plus les agrégats sont de taille et de granulosité importante.** Il s'avère également que ces phénomènes d'agrégation sont identiques en absence et en présence d'irradiation UV-A et ne dépendent pas non plus de la nature des espèces bactériennes. Ces interactions seraient donc plus liées à d'autres paramètres physico-chimiques du milieu comme le pH ou la température que par la nature des espèces bactériennes.

### Confirmation de l'agrégation bactéries-TiO<sub>2</sub> par microscopie à fluorescence

En parallèle de nos analyses par cytométrie capillaire, nous avons effectué des analyses en microscopie à fluorescence (microscope Leica DM4000 B) confirmant cette interaction entre les bactéries et les particules de TiO<sub>2</sub>. Cette analyse nous a permis de visualiser le mode d'organisation des bactéries avec les agrégats de TiO<sub>2</sub>. Sur la figure 61 (a), nous avons utilisé un filtre d'excitation dans le bleu passe-bande de  $\lambda$  450/490 équipé d'un miroir dichroïque de  $\lambda$  510 nm permettant de détecter la fluorescence verte émise par le Syto 9 : nous pouvons voir que les bactéries *E.coli* vivantes marquées par le Syto 9 (spots très fluorescents en vert) sont piégées dans les agrégats de TiO<sub>2</sub> à 0,4 g/L (vert un peu plus flouté).

De même, grâce au filtre d'excitation dans le vert passe-bande de  $\lambda$  560/40 équipé d'un miroir dichroïque de  $\lambda$  595 nm permettant de détecter la fluorescence rouge émise par l'IP et caractéristique des bactéries mortes, nous pouvons observer sur la figure 61 (b), les bactéries mortes incluses dans les agrégats de TiO<sub>2</sub>. Il s'avère ainsi que les phénomènes d'agrégation bactéries – TiO<sub>2</sub> ne sont pas dépendants de l'état physiologique de la bactérie et que quel que soit l'état physiologique il n'y ait pas d'arrangement particulier puisqu'il s'agit d'**agrégat mixte** où les bactéries sont entourées de particules agrégées de TiO<sub>2</sub>. Ces images de microscopie à fluorescence confirment les résultats obtenus par cytométrie capillaire et permettent de visualiser le mode d'association des bactéries avec les agrégats de TiO<sub>2</sub>.

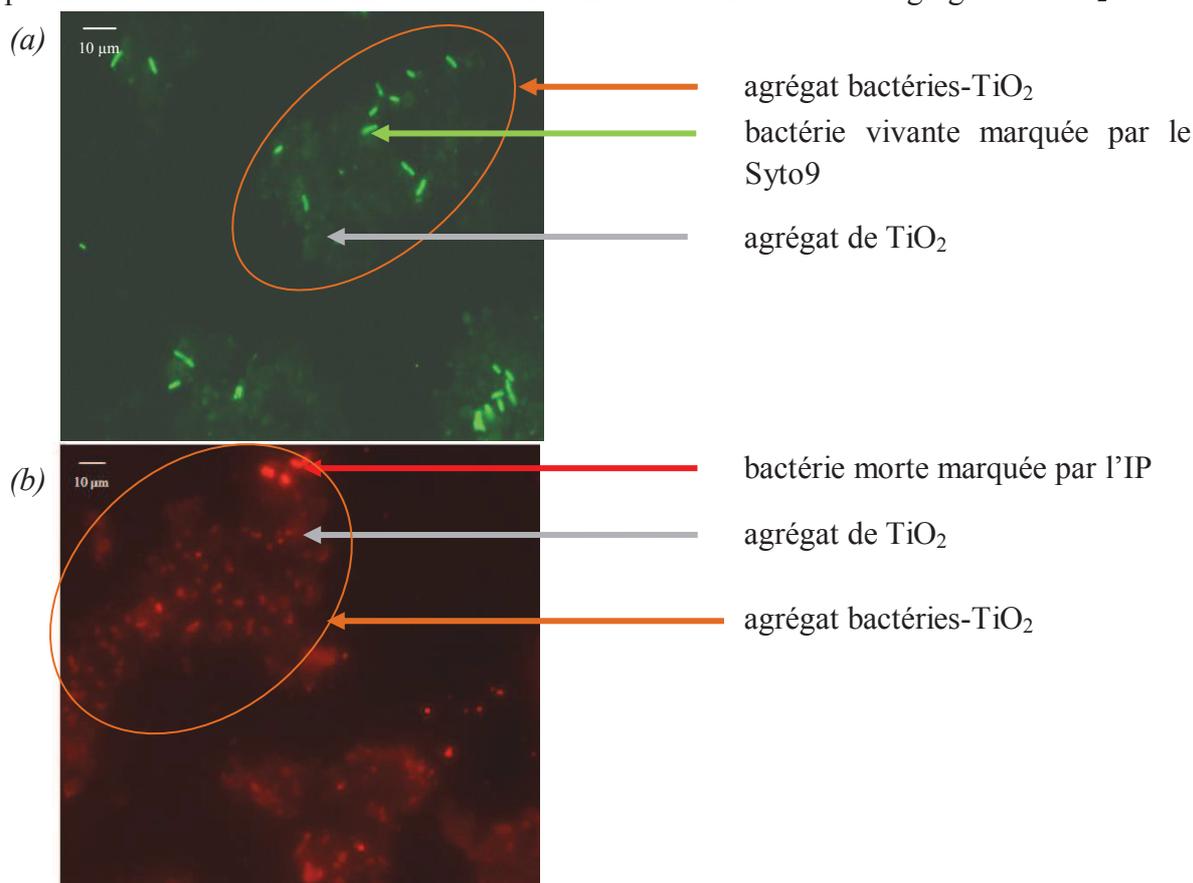


Figure 61 Visualisation par microscopie à fluorescence (a) des agrégats bactéries vivantes (*E.coli*) – TiO<sub>2</sub> (0,4 g/L) marquées par le Syto 9 – filtre d'excitation dans le bleu passe-bande de  $\lambda$  450/490 équipé d'un miroir dichromatique de  $\lambda$  510 nm pour la détection de la fluorescence verte- (b) agrégats bactéries mortes (*E.coli*)- TiO<sub>2</sub> (0,4 g/L) marqués par l'IP – filtre d'excitation dans le vert passe-bande de  $\lambda$  560/40 équipé d'un miroir dichromatique de  $\lambda$  595 nm pour la détection de la fluorescence rouge-

## 2.6. Détermination de l'impact des traitements sur l'intégrité membranaire (par cytométrie capillaire)

Lors de cette étude, nous nous sommes intéressés à l'état de l'intégrité membranaire après traitements par cytométrie capillaire. Au cours de cette étude, une population initiale d'*E.coli*, de *P.aeruginosa*, de *B.cereus* ou de *S.aureus*, de l'ordre de  $10^6$  UFC/mL a été exposée à différents traitements photocatalytiques avec cinq concentrations en  $\text{TiO}_2$  (0 g/L ; 0,1 g/L ; 0,2 g/L ; 0,4 g/L et 0,8 g/L) et trois durées d'exposition sous irradiance UV-A de  $30 \text{ W/m}^2$  (0 min ; 30 min ; 60 min)).

Pour chaque espèce bactérienne étudiée, l'effet de ces différents traitements sur l'intégrité membranaire (considérée comme un indicateur des dommages cellulaires et de la mort cellulaire)<sup>307</sup> a pu être apprécié rapidement par cytométrie capillaire *via* l'utilisation de sondes fluorescentes (Syto 9 et IP). L'émission de fluorescence du Syto 9 a été quantifiée pour chaque évènement grâce à l'intensité de signal dans la fluorescence verte (GREEN-HLog) et celui de l'IP par l'intensité de signal de fluorescence rouge (RED-HLog). Ainsi, comme précédemment décrit trois zones de fluorescence distinctes ont été définies :

- une zone de fluorescence correspondant aux **bactéries vivantes** (colorée en vert)
- une zone de fluorescence correspondant aux **bactéries mortes dont la membrane est endommagée** (colorée en rouge)
- une zone de fluorescence correspondant aux débris cellulaires et à la fluorescence non spécifique des particules de  $\text{TiO}_2$  (colorée en gris).

Pour chaque espèce bactérienne étudiée à partir de la moyenne des différents cytogrammes obtenus (minimum  $n=3$ ), nous avons établi des histogrammes de réduction logarithmique reprenant pour chaque condition les rapports ( $C/C_0$ ) ;  **$C_0$  correspond au nombre d'évènements en U.A. possédant des caractéristiques de fluorescence typiques des bactéries vivantes dans le puits contrôle et C correspond au nombre d'évènements en U.A. possédant des caractéristiques de fluorescence typiques des bactéries vivantes dans les puits traités.** A partir du nombre d'évènements présentant une fluorescence caractéristique des bactéries dont l'intégrité membranaire est conservée - et donc sur la base des résultats des tests statistiques one way Anova-, nous avons ainsi pu évaluer l'efficacité des différents traitements. Les figures 62, 64, 66 et 68 présentent des cytogrammes types pour respectivement *E.coli*, *P.aeruginosa*, les formes végétatives *B.cereus* et *S.aureus* pour chaque condition opératoire.

---

<sup>307</sup> Joux F, Lebaron P: Use of fluorescent probes to assess physiological functions of bacteria at single-cell level. *Microbes and infection / Institut Pasteur* 2000, 2(12):1523-1535.

### 1) Etude de l'effet photocatalytique sur *E.coli*

Les cytogrammes types obtenus dans le cas d'*E.coli* sont présentés en figure 62 et l'histogramme obtenu à partir des valeurs  $C/C_0$  en figure 63. Pour le puits contrôle (sans  $TiO_2$ , sans rayonnement, figure 62 (a) nous comptons environ  $2,32 \cdot 10^6$  U.A. d'évènements détectés dans la région correspondant aux bactéries vivantes.

#### Effet du rayonnement

Que ce soit pour une irradiation UV-A de 30 min ou de 60 min, nous n'observons pas de modification significative du nombre d'évènements présentant une fluorescence caractéristique des bactéries dont l'intégrité membranaire est conservée (figure 62 (a), (b), (c) et figure 63).

#### Effet cytotoxique du $TiO_2$

Cet effet est dépendant de la concentration en  $TiO_2$  puisque pour une concentration en  $TiO_2$  :

- de 0,1 g/L à 0,4 g/L, nous n'observons pas de modification significative du nombre d'évènements présentant une fluorescence caractéristique des bactéries dont l'intégrité membranaire est conservée (figure 62 (d), (g), (j) et figure 63)
- à 0,8 g/L de  $TiO_2$ , il y a un effet cytotoxique induisant une diminution très faible de 0,2 log de ce nombre d'évènements, par rapport au puits contrôle (figure 62 (m) et figure 63).

#### Effet photocatalytique du $TiO_2$

L'efficacité du traitement photocatalytique dépend à la fois du paramètre durée de rayonnement et concentration en  $TiO_2$  puisque pour :

- 30 min de rayonnement UV-A, uniquement à 0,8 g/L de  $TiO_2$ , nous observons une diminution significative de 1,7 log du nombre d'évènements présentant une fluorescence caractéristique des bactéries dont l'intégrité membranaire est conservée par rapport au puits sans  $TiO_2$  (figure 62 (n) et figure 63)
- 60 min de rayonnement UV-A, il n'y a pas d'effet photocatalytique observé à 0,1 g/L de  $TiO_2$ , mais pour 0,2 g/L ; 0,4 g/L et 0,8 g/L de  $TiO_2$ , nous observons une diminution significative respectivement de 1,5 log ; 2,5 log et 2,6 log du nombre d'évènements présentant une fluorescence caractéristique des bactéries dont l'intégrité membranaire est conservée par rapport au puits sans  $TiO_2$  (figure 62 (f), (i), (l), (o) et figure 63).

**Ainsi pour une durée de rayonnement donnée, plus la concentration en  $TiO_2$  augmente, plus l'efficacité du traitement photocatalytique augmente.**

D'une manière logique, nous pouvons constater qu'une diminution du nombre d'évènements détectés dans la zone de fluorescence correspondant aux bactéries vivantes est corrélée à une augmentation du nombre d'évènements détectés dans la zone de fluorescence correspondant aux bactéries mortes ou aux débris cellulaires (exemples : comparaison de la figure 62 (j) avec la figure 62 (l) ou bien comparaison de la figure 62 (m) avec la figure 62 (o)).

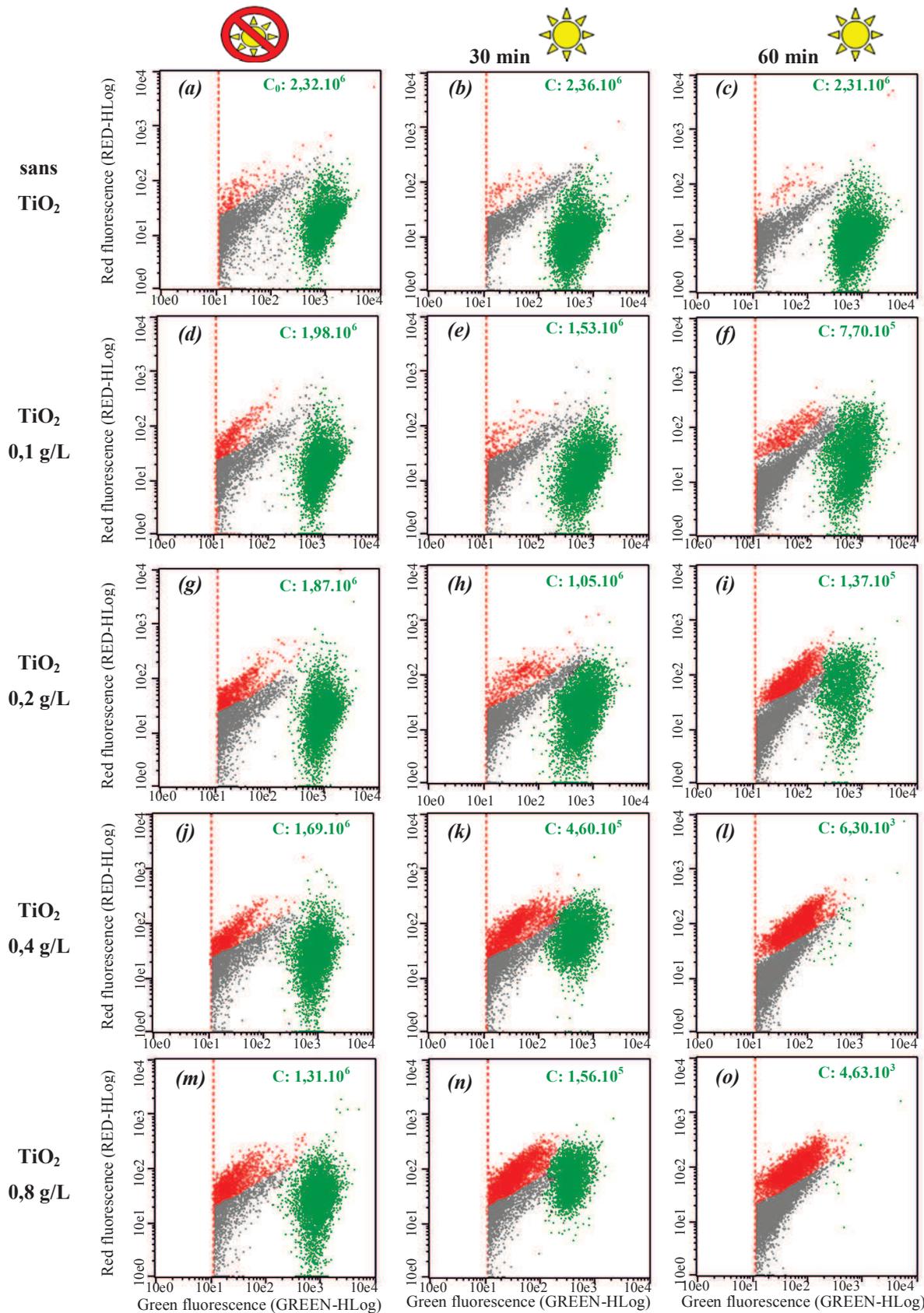


Figure 62 Influence des conditions opératoires ( $[TiO_2]$  et durée d'irradiation UV-A) sur l'intégrité membranaire d'*E.coli*, après marquage au Syto9/IP. Les 3 zones de fluorescence colorées en vert, rouge et gris correspondent respectivement aux bactéries présentant une intégrité membranaire conservée ; aux bactéries dont l'intégrité membranaire est altérée; aux débris cellulaires/agrégats de  $TiO_2$  dans l'eau  $\phi$ .  $C_0$ , C: évènements fluorescents, en U.A., dans la région des bactéries présentant une intégrité membranaire conservée pour respectivement la condition sans  $TiO_2$  sans UV-A et la condition testée ( $n=3$ ).

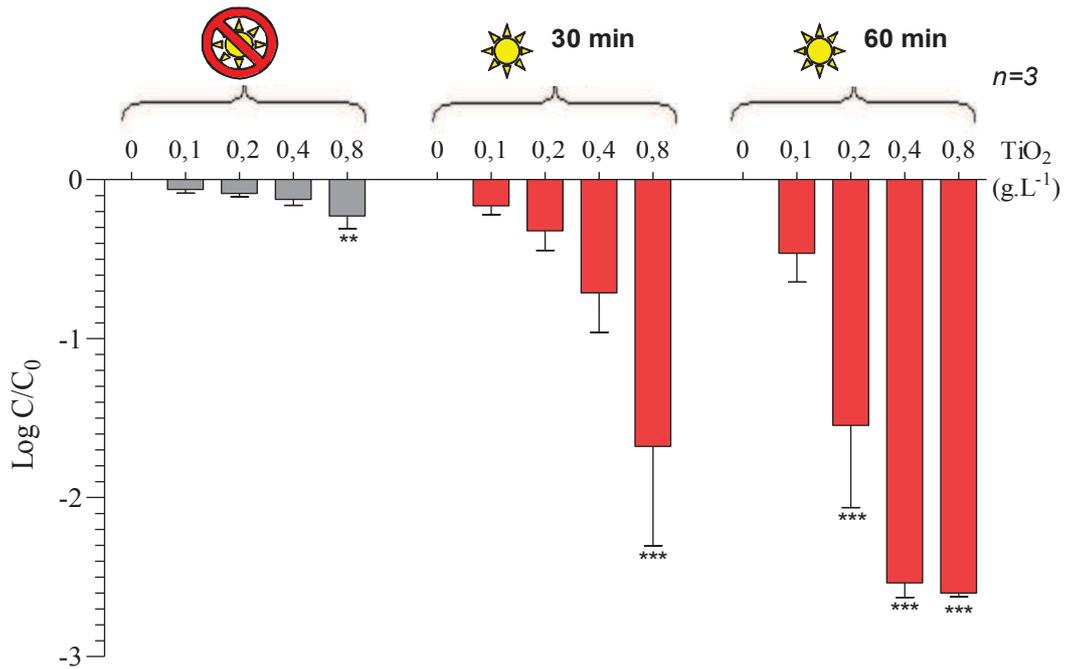


Figure 63 Influence des conditions opératoires ([TiO<sub>2</sub>] et durée d'irradiation UV-A) sur le nombre de bactéries présentant une intégrité membranaire conservée chez *E.coli* (10<sup>6</sup> UFC/mL) déterminée par cytométrie capillaire.

C<sub>0</sub>, C: évènements fluorescents, en U.A., dans la région des bactéries considérées comme vivantes pour respectivement la condition sans TiO<sub>2</sub> sans UV-A et la condition testée (n=3).

Analyse statistique one way Anova avec \*\*P < 0,01 et \*\*\*P < 0,001.

## 2) Etude de l'effet photocatalytique sur *P.aeruginosa*

Les cytogrammes types obtenus dans le cas de *P.aeruginosa* sont présentés en figure 64 et l'histogramme obtenu à partir des valeurs  $C/C_0$  en figure 65.

### Effet du rayonnement

Que ce soit pour une irradiation UV-A de 30 min ou de 60 min, nous n'observons pas de modification significative du nombre d'évènements présentant une fluorescence caractéristique des bactéries dont l'intégrité membranaire est conservée (figure 64 (a), (b), (c) et figure 65)

Effet cytotoxique du  $TiO_2$  sur le nombre d'évènements présentant une fluorescence caractéristique des bactéries dont l'intégrité membranaire est conservée

Quelles que soient les concentrations en  $TiO_2$ , nous n'avons pas observé de modification significative du nombre d'évènements (figure 64 (d), (g), (j), (m) et figure 65).

### Effet photocatalytique du $TiO_2$

L'effet du traitement photocatalytique dépend à la fois du paramètre durée de rayonnement et concentration en  $TiO_2$  puisque pour :

- 30 min de rayonnement UV-A, il n'y a pas d'effet photocatalytique à 0,1 g/L de  $TiO_2$ , pour 0,2 g/L ; 0,4 g/L et 0,8 g/L de  $TiO_2$ , nous observons une diminution significative respectivement de 0,8 log ; 0,8 log et 1,3 log du nombre d'évènements présentant une fluorescence caractéristique des bactéries dont l'intégrité membranaire est conservée par rapport au puits sans  $TiO_2$  (figure 64 (e), (h), (k), (n) et figure 65)
- 60 min de rayonnement UV-A, à 0,1 g/L, 0,2 g/L ; 0,4 g/L et 0,8 g/L de  $TiO_2$ , nous observons une diminution significative respectivement de 0,9 log ; 1,5 log ; 1,8 log et 2,0 log du nombre d'évènements présentant une fluorescence caractéristique des bactéries dont l'intégrité membranaire est conservée par rapport au puits sans  $TiO_2$  (figure 64 (f), (i), (l), (o) et figure 65).

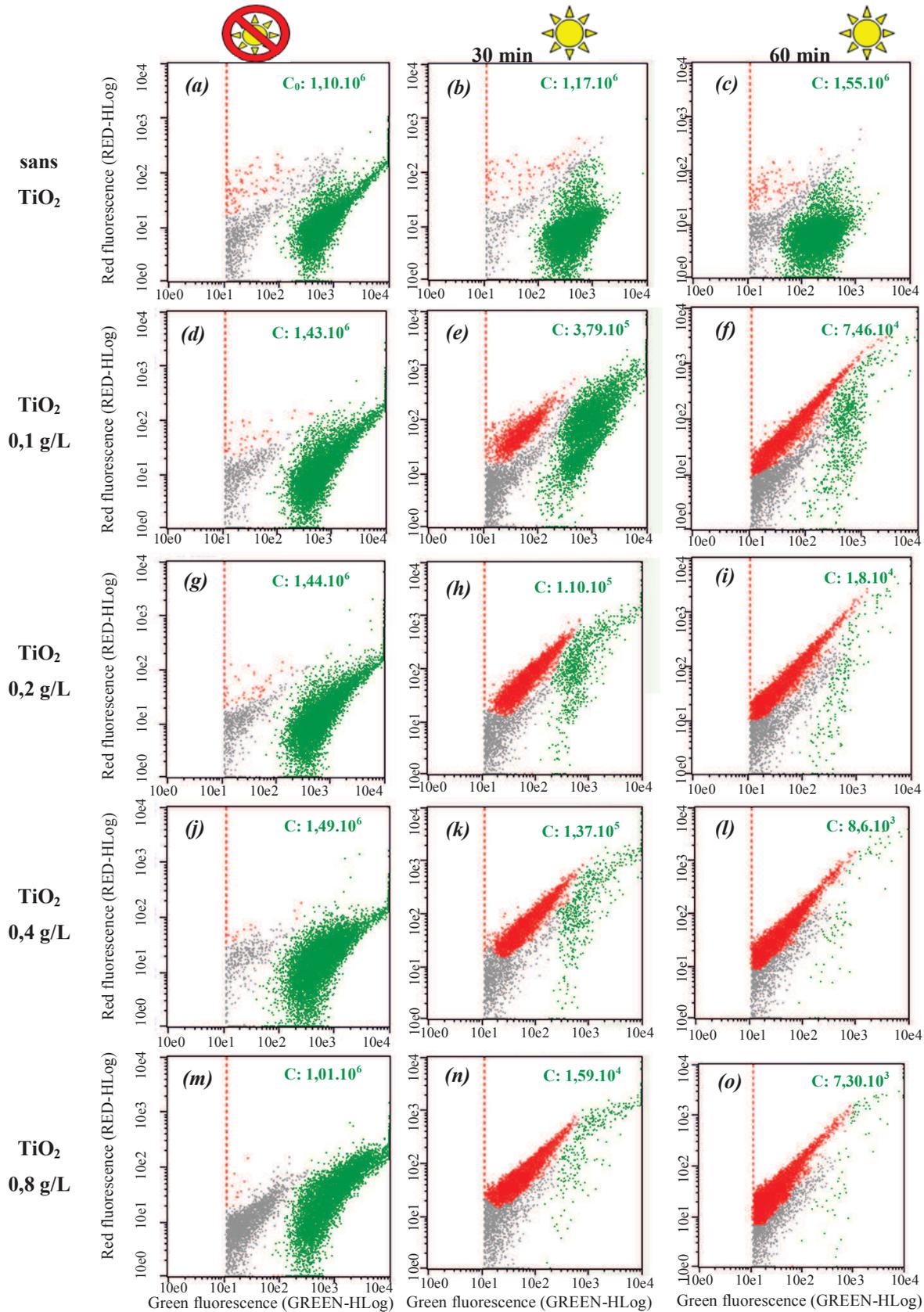


Figure 64 Influence des conditions opératoires ([TiO<sub>2</sub>] et durée d'irradiation UV-A) sur l'intégrité membranaire de *P.aeruginosa*, après marquage au Syto9/IP. Les 3 zones de fluorescence colorées en vert, rouge et gris correspondent respectivement aux bactéries présentant une intégrité membranaire conservée ; aux bactéries dont l'intégrité membranaire est altérée; aux débris cellulaires/agrégats de TiO<sub>2</sub> dans l'eau φ. C<sub>0</sub>, C: évènements fluorescents, en U.A., dans la région des bactéries présentant une intégrité membranaire conservée pour respectivement la condition sans TiO<sub>2</sub> sans UV-A et la condition testée (n=3).

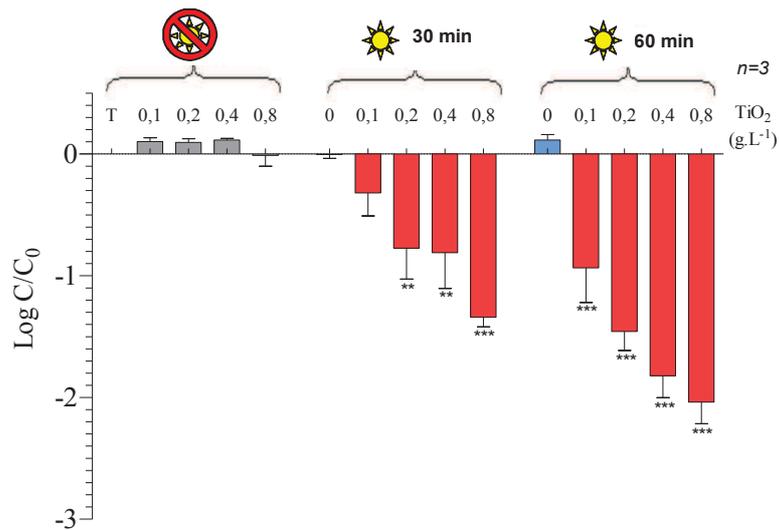


Figure 65 Influence des conditions opératoires ([TiO<sub>2</sub>] et durée d'irradiation UV-A) sur le nombre de bactéries présentant une intégrité membranaire conservée chez *P.aeruginosa* (10<sup>6</sup> UFC/mL) déterminée par cytométrie capillaire.

C<sub>0</sub>, C: évènements fluorescents, en U.A., dans la région des bactéries considérées comme vivantes pour respectivement la condition sans TiO<sub>2</sub> sans UV-A et la condition testée (n=3).

Analyse statistique one way Anova avec \*\*P < 0,01 et \*\*\*P < 0,001.

### 3) Etude de l'effet photocatalytique sur les formes végétatives de *B.cereus*

Les cytoigrammes types obtenus dans le cas de *B.cereus* sont présentés en figure 66 et l'histogramme obtenu à partir des valeurs  $C/C_0$  en figure 67.

#### Effet du rayonnement

Que ce soit pour une irradiation UV-A de 30 min ou de 60 min, nous n'observons pas de modification significative du nombre d'évènements présentant une fluorescence caractéristique des bactéries dont l'intégrité membranaire est conservée (figure 66 (a), (b), (c) et figure 67).

#### Effet cytotoxique du TiO<sub>2</sub>

Quelles que soient les concentrations en TiO<sub>2</sub> testés, nous n'avons pas observé de modification significative du nombre d'évènements (figure 66 (d), (g), (j), (m) et figure 67)

#### Effet photocatalytique du TiO<sub>2</sub>

L'effet du traitement photocatalytique dépend à la fois du paramètre durée de rayonnement et concentration en TiO<sub>2</sub> puisque pour :

- 30 min de rayonnement UV-A, à 0,1 g/L, 0,2 g/L ; 0,4 g/L et 0,8 g/L de TiO<sub>2</sub>, nous observons une diminution significative respectivement de 1,6 log, 2,1 log ; 2,2 log et 1,8 log du nombre d'évènements présentant une fluorescence caractéristique des bactéries dont l'intégrité membranaire est conservée par rapport au puits sans TiO<sub>2</sub> (figure 66 (e), (h), (k), (n) et figure 67)
- 60 min de rayonnement UV-A, à 0,1 g/L, 0,2 g/L ; 0,4 g/L et 0,8 g/L de TiO<sub>2</sub>, nous observons une diminution significative respectivement de 1,8 log ; 1,7 log ; 1,8 log et 1,9 log du nombre d'évènements présentant une fluorescence caractéristique des bactéries dont l'intégrité membranaire est conservée par rapport au puits sans TiO<sub>2</sub> (figure 66 (f), (i), (l), (o) et figure 67).

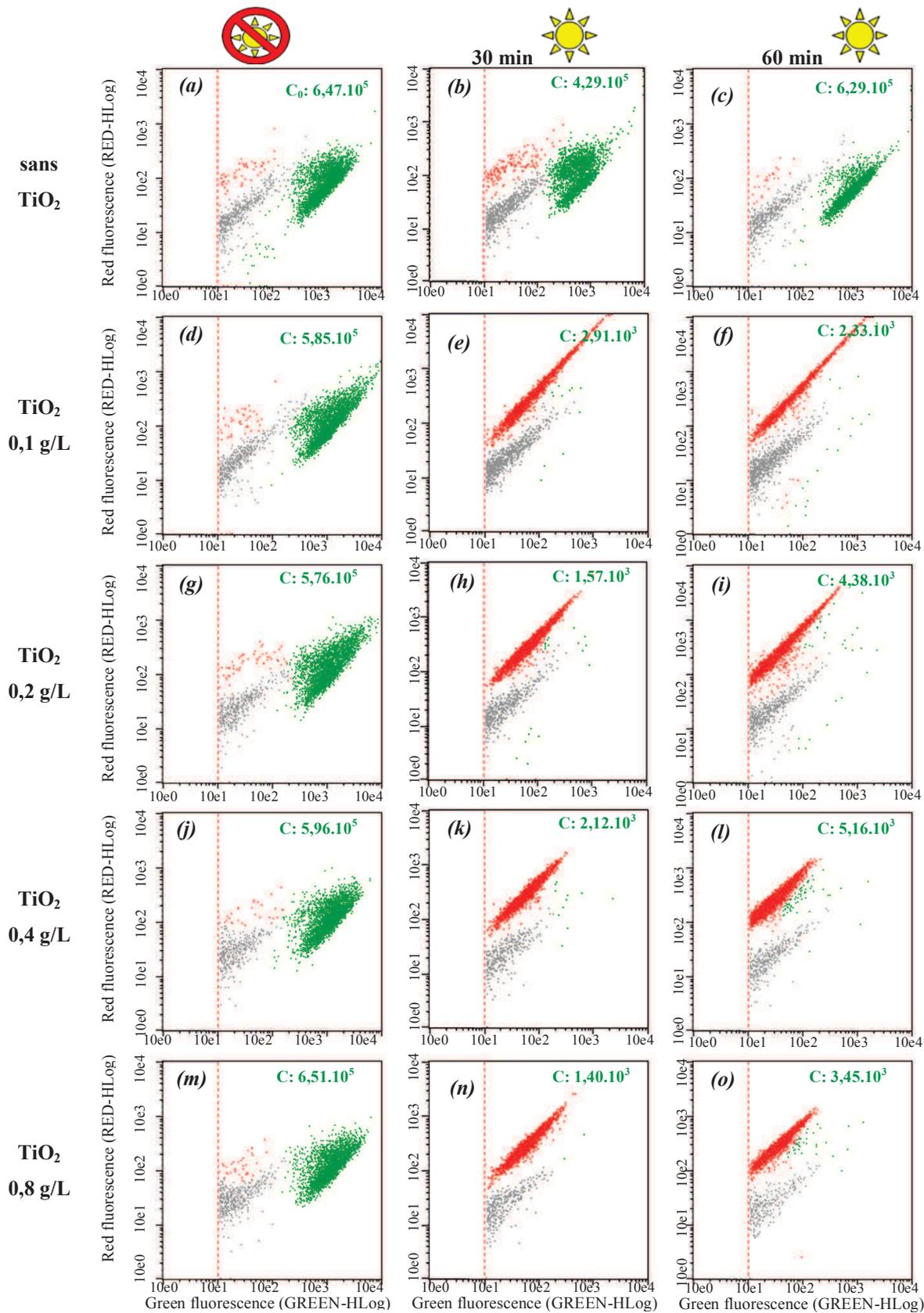


Figure 66 Influence des conditions opératoires ([TiO<sub>2</sub>] et durée d'irradiation UV-A) sur l'intégrité membranaire de *B.cereus*, après marquage au Syto9/IP. Les 3 zones de fluorescence colorées en vert, rouge et gris correspondent respectivement aux bactéries présentant une intégrité membranaire conservée ; aux bactéries dont l'intégrité membranaire est altérée; aux débris cellulaires/agrégats de TiO<sub>2</sub> dans l'eau φ. C<sub>0</sub>, C: évènements fluorescents, en U.A., dans la région des bactéries présentant une intégrité membranaire conservée pour respectivement la condition sans TiO<sub>2</sub> sans UV-A et la condition testée (n=3).

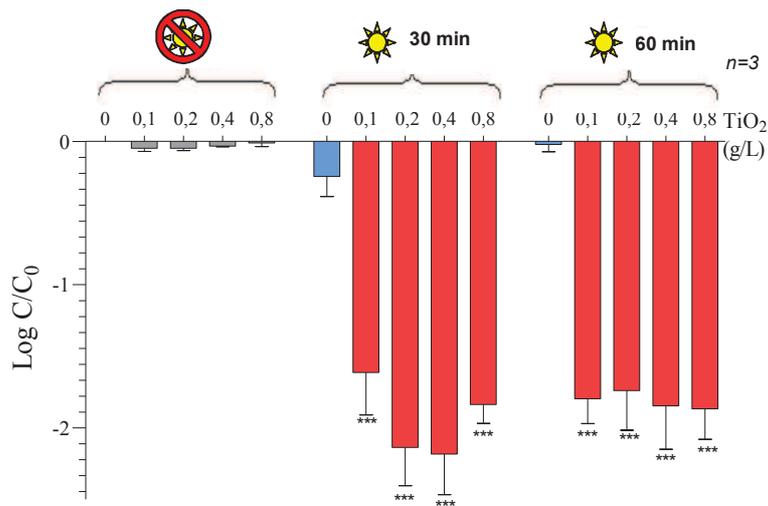


Figure 67 Influence des conditions opératoires ([TiO<sub>2</sub>] et durée d'irradiation UV-A) sur le nombre de bactéries présentant une intégrité membranaire conservée chez *B.cereus* (10<sup>6</sup> UFC/mL) déterminée par cytométrie capillaire.

C<sub>0</sub>, C: évènements fluorescents, en U.A., dans la région des bactéries considérées comme vivantes pour respectivement la condition sans TiO<sub>2</sub> sans UV-A et la condition testée (n=3).

Analyse statistique one way Anova avec \*\*\*P < 0,001.

#### 4) Etude de l'effet photocatalytique sur *S.aureus*

Les cytogrammes types obtenus dans le cas de *S.aureus* sont présentés en figure 68 et l'histogramme obtenu à partir des valeurs  $C/C_0$  en figure 69.

##### Effet du rayonnement

Pour une irradiation UV-A de 30 min, nous n'observons pas de modification significative du nombre d'évènements présentant une fluorescence caractéristique des bactéries dont l'intégrité membranaire est conservée, alors que pour 60 min, nous avons obtenu une diminution de 0,3 log du nombre d'évènements présentant une fluorescence caractéristique des bactéries dont l'intégrité membranaire est conservée par rapport au puits contrôle (figure 68 (a), (b), (c) et figure 69).

##### Effet cytotoxique du TiO<sub>2</sub>

Cet effet cytotoxique du TiO<sub>2</sub> dépend de la concentration en TiO<sub>2</sub> puisque pour une concentration en TiO<sub>2</sub> :

- de 0,1 g/L à 0,4 g/L, nous n'observons pas de modification significative du nombre d'évènements présentant une fluorescence caractéristique des bactéries dont l'intégrité membranaire est conservée (figure 68 (d), (g), (j) et figure 69)
- à 0,8 g/L de TiO<sub>2</sub>, il y a un effet cytotoxique induisant une très faible réduction de 0,1 log de ce nombre d'évènements par rapport au puits contrôle (figure 68 (m) et figure 69).

##### Effet photocatalytique du TiO<sub>2</sub>

L'efficacité du traitement photocatalytique dépend à la fois du paramètre durée de rayonnement et concentration en TiO<sub>2</sub> puisque pour :

- 30 min de rayonnement UV-A, à 0,1 g/L, 0,2 g/L ; 0,4 g/L et 0,8 g/L de TiO<sub>2</sub> nous observons une diminution significative respectivement de 2,2 log, 2,2 log ; 2,5 log et 2,8 log du nombre d'évènements présentant une fluorescence caractéristique des bactéries dont l'intégrité membranaire est conservée par rapport au puits sans TiO<sub>2</sub> (figure 68 (e), (h), (k), (n) et figure 69)
- 60 min de rayonnement UV-A, à 0,1 g/L, 0,2 g/L ; 0,4 g/L et 0,8 g/L de TiO<sub>2</sub>, nous observons une diminution significative respectivement de 2,1 log ; 2,1 log ; 2,5 log et 2,6 log du nombre d'évènements présentant une fluorescence caractéristique des bactéries dont l'intégrité membranaire est conservée par rapport au puits sans TiO<sub>2</sub> (figure 68 (f), (i), (l), (o) et figure 69).

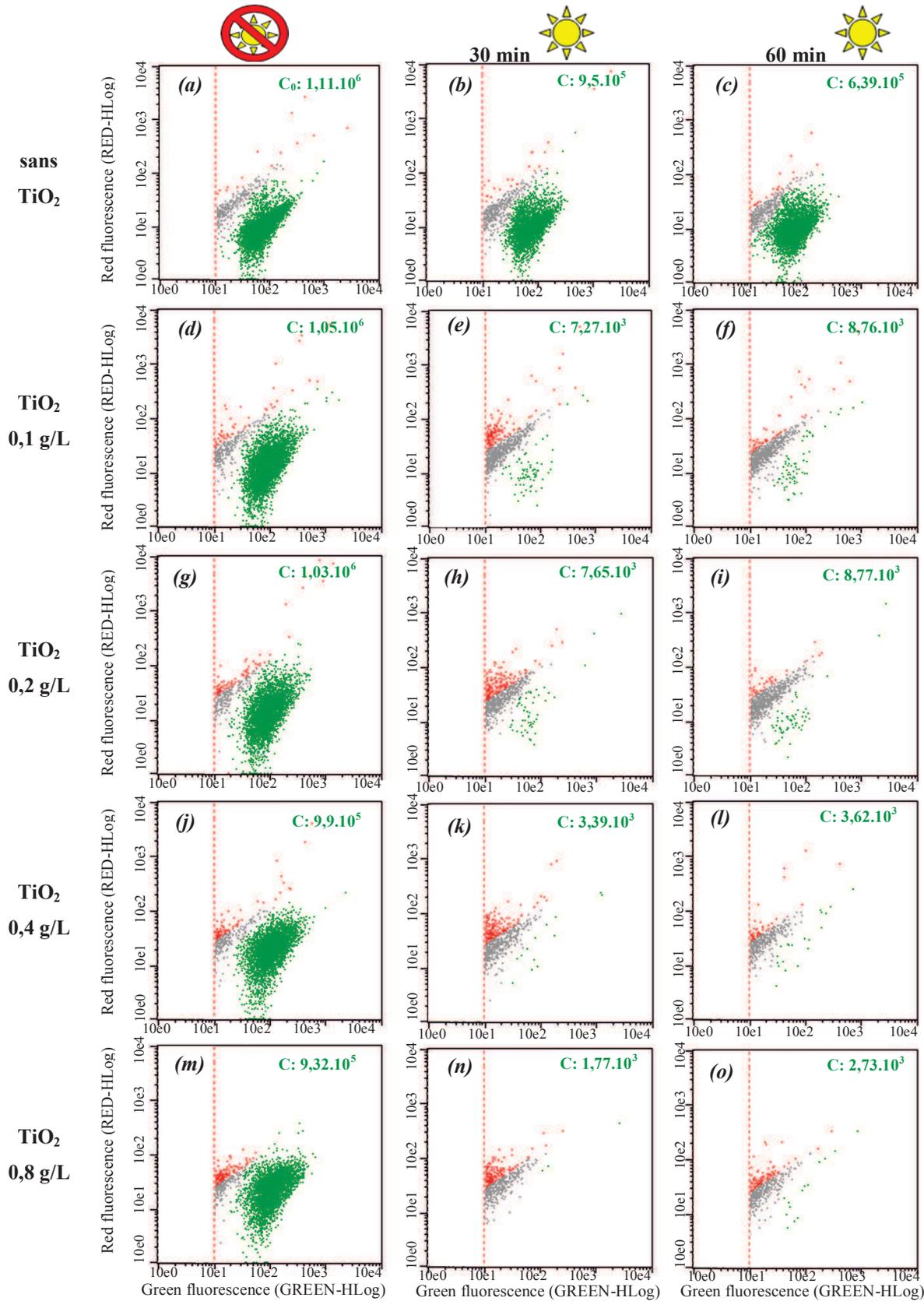
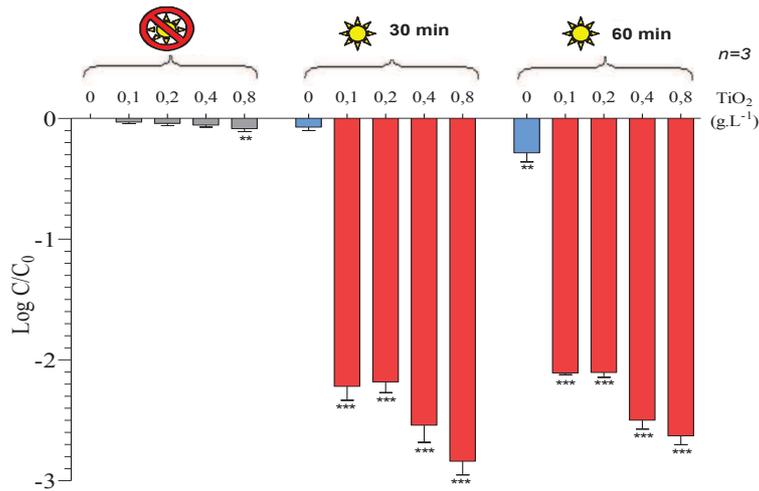


Figure 68 Influence des conditions opératoires ( $[TiO_2]$  et durée d'irradiation UV-A) sur l'intégrité membranaire de *S.aureus*, après marquage au Syto9/IP. Les 3 zones de fluorescence colorées en vert, rouge et gris correspondent respectivement aux bactéries présentant une intégrité membranaire conservée ; aux bactéries dont l'intégrité membranaire est altérée; aux débris cellulaires/agrégats de  $TiO_2$  dans l'eau  $\phi$ .  $C_0$ , C: évènements fluorescents, en U.A., dans la région des bactéries présentant une intégrité membranaire conservée pour respectivement la condition sans  $TiO_2$  sans UV-A et la condition testée (n=3).



**Figure 69** Influence des conditions opératoires ([TiO<sub>2</sub>] et durée d'irradiation UV-A) sur le nombre de bactéries présentant une intégrité membranaire conservée chez *S.aureus* (10<sup>6</sup> UFC/mL) déterminée par cytométrie capillaire.

C<sub>0</sub>, C: évènements fluorescents, en U.A., dans la région des bactéries considérées comme vivantes pour respectivement la condition sans TiO<sub>2</sub> sans UV-A et la condition testée (n=3).

Analyse statistique one way Anova avec \*\*P < 0,01 et \*\*\*P < 0,001.

### 5) Conclusion sur l'efficacité des traitements en termes d'intégrité membranaire

D'une manière générale, cette analyse de l'intégrité membranaire par cytométrie capillaire réalisée sur les quatre espèces bactériennes ciblées montre que le rayonnement UV-A seul ou que la présence de TiO<sub>2</sub> non soumis au rayonnement UV-A (effet cytotoxique du TiO<sub>2</sub>) ne sont pas suffisants pour induire une réduction importante (pas plus de 0,2 log de différence en comparaison avec le puits contrôle) du nombre d'évènements dans la région correspondant aux bactéries considérées comme vivantes (en comparaison avec le puits témoin, sans TiO<sub>2</sub>, sans rayonnement).

La faible réduction du nombre d'évènements observée dans la région correspondant aux bactéries considérées comme vivantes en présence uniquement de TiO<sub>2</sub> à 0,8 g/L pourrait être due au piégeage des bactéries au sein des différents agrégats de TiO<sub>2</sub> entraînant une toxicité de contact. Cette agrégation pourrait être à l'origine d'une interruption des transferts d'électrons ou de modifications des potentiels membranaires,<sup>308</sup> ce qui pourrait ainsi expliquer les perturbations de l'intégrité membranaire en présence de TiO<sub>2</sub> à forte concentration.

En revanche, sur les 32 conditions opératoires correspondant à des traitements photocatalytiques (4 espèces bactériennes, 2 durées d'exposition au rayonnement et 4 concentrations en TiO<sub>2</sub>), 27 ont induit une réduction significative du nombre d'évènements dans la région correspondant aux bactéries vivantes avec des réductions allant de 0,8 log à 2,8 log (tableau 23). Bien que ces réductions paraissent toutefois faibles, n'oublions pas qu'il s'agit d'une analyse basée sur la perte de la perméabilité membranaire réalisée juste après le

<sup>308</sup> Pagnout C, Jomini S, Dadhwal M, Caillet C, Thomas F, Bauda P: **Role of electrostatic interactions in the toxicity of titanium dioxide nanoparticles toward *Escherichia coli***. *Colloids and surfaces B, Biointerfaces* 2012, **92**:315-321.

traitement photocatalytique et que par conséquent ces réductions ne renseignent en rien sur la capacité des microorganismes à se diviser. Cette analyse de l'effet bactéricide par dénombrements sur milieux gélosés sera présentée dans la section suivante (Chapitre 3 II.3).

**Tableau 23** Tableau récapitulatif de la réduction logarithmique du nombre d'évènements présentant une fluorescence caractéristique des bactéries vivantes, obtenu par cytométrie capillaire lors de différents traitements photocatalytiques (cellule grisée : pas de différence significative)

[TiO <sub>2</sub> ] (g/L)						30 min 					60 min 						
	0	0,1	0,2	0,4	0,8	0	0,1	0,2	0,4	0,8	0	0,1	0,2	0,4	0,8		
<i>E.coli</i>					0,2					1,7					1,5	2,5	2,6
<i>P.aeruginosa</i>								0,8	0,8	1,3			0,9	1,5	1,8	2,0	
<i>B.cereus</i>						1,6	2,1	2,2	1,8			1,8	1,7	1,8	1,9		
<i>S.aureus</i>					0,1	2,2	2,2	2,5	2,8	0,3	2,1	2,1	2,5	2,6			

 pas de différence significative avec le puits sans TiO<sub>2</sub>

Les résultats obtenus montrent que l'efficacité des traitements photocatalytiques déterminée lors des analyses de l'intégrité membranaire dépend de la composition membranaire. En effet, pour les deux bactéries à Gram négatif (*E.coli* et *P.aeruginosa*), les deux paramètres que sont la durée du test et la concentration en TiO<sub>2</sub> influencent positivement la diminution du nombre d'évènements présentant une fluorescence typique des bactéries dont l'intégrité membranaire est conservée. Pour une durée donnée, une augmentation de la concentration en TiO<sub>2</sub> permet une amélioration de la réduction du nombre d'évènements; de même pour une concentration en TiO<sub>2</sub> donnée, une augmentation de la durée d'exposition au rayonnement UV-A entraîne également une amélioration de la réduction du nombre d'évènements. Ces deux effets sont cumulatifs et la réduction la plus élevée est obtenue avec les conditions opératoires les plus sévères - soit en combinant une concentration en TiO<sub>2</sub> de 0,8 g/L avec 60 min de rayonnement UV-A) - ce qui correspond pour *E.coli* à une réduction du nombre d'évènements présentant une intégrité membranaire conservée de l'ordre de 2,6 log et pour *P.aeruginosa* à une réduction de l'ordre de 2,0 log.

Il est tout à fait logique de constater des variations de l'efficacité de réduction en fonction des traitements appliqués. En effet, le fait d'augmenter ces deux paramètres que sont la concentration en TiO<sub>2</sub> et la durée d'exposition au rayonnement UV-A entraîne une augmentation de la quantité de ROS générée dans le milieu réactionnel. Ainsi pour une durée d'exposition au rayonnement UV-A donnée, plus la concentration en TiO<sub>2</sub> augmente plus il y a de ROS générée et meilleure est la réduction ; il en est de même pour une concentration en TiO<sub>2</sub> donnée. Nous verrons par la suite que ces ROS entraînent des modifications de l'intégrité membranaire, ce qui peut ainsi corroborer nos observations.

En revanche pour les deux bactéries à Gram positif (*B.cereus* et *S.aureus*), une réduction très importante du nombre d'évènements présentant une fluorescence typique des bactéries dont l'intégrité membranaire est conservée a été obtenue dès 0,1 g/L de TiO<sub>2</sub> avec 30 min de

rayonnement UV-A (condition photocatalytique minimale testée) : pour *B.cereus*, nous avons obtenu une réduction de 1,6 log et pour *S.aureus*, nous avons obtenu une réduction de 2,2 log.

Pour ces deux bactéries à Gram positif une augmentation des deux paramètres entraîne une légère amélioration de l'efficacité puisque le maximum de réduction obtenu pour *B.cereus* est de 2,2 log (pour 0,4 g/L de TiO<sub>2</sub> et 30 min de rayonnement) et pour *S.aureus* il est de 2,8 log (pour 0,8 g/L de TiO<sub>2</sub> et 30 min de rayonnement). Aucune réduction supérieure à 2,8 log n'a été obtenue dans le cas de *S.aureus* même pour des durées de rayonnement de 60 min, ce qui paraît étonnant car pour une même concentration en TiO<sub>2</sub> une augmentation de la durée de rayonnement devrait améliorer l'efficacité de réduction (si l'on compare par exemple les réductions obtenues avec 0,8 g/L de TiO<sub>2</sub> pour une durée de rayonnement de 30 min ou 60 min). Ceci pourrait être dû à des incertitudes expérimentales ou à la limite de détection du cytomètre. Etant donné que les écarts types sont relativement faibles, la deuxième hypothèse nous paraît plus probable.

Tout en étant consciente du fait que notre échantillonnage est faible (deux bactéries à Gram négatif et deux bactéries à Gram positif), cette analyse de l'intégrité membranaire par cytométrie capillaire montre qu'en milieu liquide il existerait une différence de sensibilité au processus photocatalytique liée à la composition membranaire. En effet quelles que soient les concentrations en TiO<sub>2</sub> utilisées avec une durée de rayonnement de 30 min et pour les concentrations en TiO<sub>2</sub> de 0,1 et de 0,2 g/L utilisées avec une durée de rayonnement de 60 min, nous observons de plus importantes réductions dans le cas des bactéries à Gram positif en comparaison avec les résultats de réduction obtenus pour les bactéries à Gram négatif (tableau 23). **De ce fait, les bactéries à Gram positif seraient plus rapidement inactivées que les bactéries à Gram négatif.** Ces résultats sont en accord avec les résultats obtenus lors de l'étude de TiO<sub>2</sub> déposé en milieu gélosé nutritif (Chapitre 3 I.1) et sont également en accord comme nous l'avons vu avec la publication de Page *et al.* où des réductions de la viabilité cellulaire pour les bactéries à Gram positif de 3 à 4 log (*S.aureus*, *B.cereus*) et une réduction de 0,5 log dans le cas d'*E.coli* ont été observées.<sup>309</sup> Ils attribuent ces différences de réduction à la présence chez les bactéries à Gram négatif d'une barrière semi-perméable aux radicaux hydroxyles : la membrane externe. En milieu liquide comme c'est le cas dans cette étude ou lors de l'étude de TiO<sub>2</sub> déposé en milieu gélosé nutritif où la quantité d'eau est assez importante (à la différence de l'étude réalisée avec TiO<sub>2</sub> en milieu « pauvre » ou « sec » sur lames de verre), les radicaux hydroxyles sont majoritairement formés. Bien que d'autres ROS interagissent, les radicaux hydroxyles attaqueraient préférentiellement les lipides de la membrane externe protégeant en quelque sorte l'intégrité de la membrane cytoplasmique. A l'inverse chez les bactéries à Gram positif, ils agiraient directement sur la membrane cytoplasmique traversant la couche de peptidoglycane constitué un réseau tridimensionnel relativement poreux. Ceci serait donc une hypothèse permettant d'expliquer les différences d'efficacité entre les bactéries à Gram négatif et les bactéries à Gram positif.

---

<sup>309</sup> Page K, Palgrave RG, Parkin IP, Wilson M, Savin SLP, Chadwick AV: **Titania and silver–titania composite films on glass—potent antimicrobial coatings.** *Journal of materials chemistry* 2007, 17(95-104).

### **3. Détermination de la viabilité cellulaire en milieu liquide par dénombrements sur milieux gélosés nutritifs**

Les résultats obtenus par cytométrie capillaire nous renseignent sur un nombre d'évènements fluorescents mesuré en log à l'instant  $t_{30}$  ou  $t_{60}$ . Nous avons voulu voir s'il y avait une corrélation entre les résultats de fluorescence caractéristique des bactéries dont l'intégrité membranaire est conservée et la **viabilité cellulaire** obtenue par dénombrement sur milieux gélosés à  $t_{24h}$ . Pour ce faire, nous avons comparé les résultats de cytométrie capillaire avec ceux obtenus par la technique traditionnelle de dénombrements sur milieux gélosés nutritifs. Cette partie présente donc l'influence des différentes conditions des traitements auxquels sont soumis les bactéries (UV-A/TiO<sub>2</sub>, TiO<sub>2</sub>, UV-A) sur leur **viabilité cellulaire, déterminée par dénombrement sur milieux gélosés**. Cette partie est donc le pendant de la partie précédente qui utilisait la cytométrie capillaire. Puis, la partie suivante (Chapitre 3 II.4) comparera les résultats obtenus avec ceux obtenus par cytométrie capillaire.

Les histogrammes obtenus à partir des réductions logarithmiques  $C/C_0$  pour *E.coli*, *P.aeruginosa*, *B.cereus* et *S.aureus* sont présentés respectivement en figure 70 (a), (b), (c) et (d).  $C_0$  correspond au nombre de colonies (rapportées en UFC/mL) obtenu pour la condition sans TiO<sub>2</sub>, sans rayonnement, et C au nombre de colonies (rapportées en UFC/mL) obtenu pour la condition testée.

#### Effet du rayonnement sur la viabilité cellulaire

Que ce soit pour les bactéries à Gram négatif, (*E.coli*, figure 70 (a) et *P.aeruginosa*, figure 70 (b)) ou les bactéries à Gram positif testées (les formes végétatives de *B.cereus*, figure 70 (c) et *S.aureus*, figure 70 (d)), les doses de rayonnements UV-A appliquées (30 min ou 60 min à 30 W/m<sup>2</sup>) n'ont pas entraîné de réduction de la viabilité bactérienne.

#### Effet cytotoxique du TiO<sub>2</sub> sur la viabilité cellulaire

Pour les 4 espèces bactériennes ciblées et les 4 concentrations en TiO<sub>2</sub>, aucun effet cytotoxique du TiO<sub>2</sub> n'a été constaté hormis pour la concentration en TiO<sub>2</sub> de 0,4 g/L sur *P.aeruginosa* où étrangement nous avons observé une augmentation de la viabilité cellulaire de 0,6 log en présence de TiO<sub>2</sub> comparé au puits sans TiO<sub>2</sub>. Nous ne savons expliquer ce phénomène, mais nous supposons qu'il peut s'agir de variabilité de mesures de manipulation.

#### Effet photocatalytique du TiO<sub>2</sub> sur la viabilité cellulaire

Pour *E.coli* (figure 70 (a)), et *P.aeruginosa* (figure 70 (b)):

- pour une durée d'exposition donnée, une augmentation de la concentration en TiO<sub>2</sub> induit une amélioration de l'effet antibactérien. Pour *E.coli*, 60 min de traitement avec 0,1 g/L, 0,2 g/L ; 0,4 g/L et 0,8 g/L de TiO<sub>2</sub> (figure 70 (a)) conduit à une réduction de la viabilité cellulaire respectivement de 1,5 log ; 2,8 log ; 3,0 log et 3,2 log. Le même profil d'inactivation peut également être observé pour 30 min de rayonnement ainsi que dans le cas de *P.aeruginosa* pour les deux temps de rayonnements testés soit 30 min et 60 min (figure 70 (b)).
- pour une concentration en TiO<sub>2</sub> donnée, une augmentation de la durée du test induit également une amélioration de l'effet antibactérien. En effet, pour *E.coli* (figure 70 (a)) en présence d'une concentration en TiO<sub>2</sub> de 0,2 g/L : pour 30 min de rayonnement la viabilité cellulaire est réduite de 0,9 log alors qu'avec 60 min de rayonnement, elle est réduite de 2,8 log. Les mêmes augmentations de réduction peuvent également être visualisées quelles que soient les concentrations en TiO<sub>2</sub> testés. Ceci est également valable dans le cas de *P.aeruginosa* (figure 70 (b)).

Pour ces deux bacilles à Gram négatif, une augmentation simultanée des paramètres temps/concentration en TiO<sub>2</sub> permet d'améliorer l'effet antibactérien. Ainsi, pour *E.coli*, l'effet antibactérien maximal obtenu avec nos conditions est de 3,2 log (obtenu pour 60 min de rayonnement et une concentration en TiO<sub>2</sub> de 0,8 g/L) et l'effet bactéricide maximal pour *P.aeruginosa* est de 5 log (obtenu pour 60 min de rayonnement UV-A et une concentration en TiO<sub>2</sub> à 0,4 g/L).

En revanche, pour *B.cereus* (figure 70 (c)) et pour *S.aureus* (figure 70 (d)), il n'y a pas d'effet antibactérien cumulé du temps d'exposition et de la quantité de TiO<sub>2</sub>:

- en effet, dès 30 min de rayonnement avec une concentration en TiO<sub>2</sub> à 0,1 g/L, les effets antibactériens observés sont maximales avec une réduction de la viabilité cellulaire de 5,3 log et 3,9 log respectivement pour *B.cereus* et *S.aureus*.

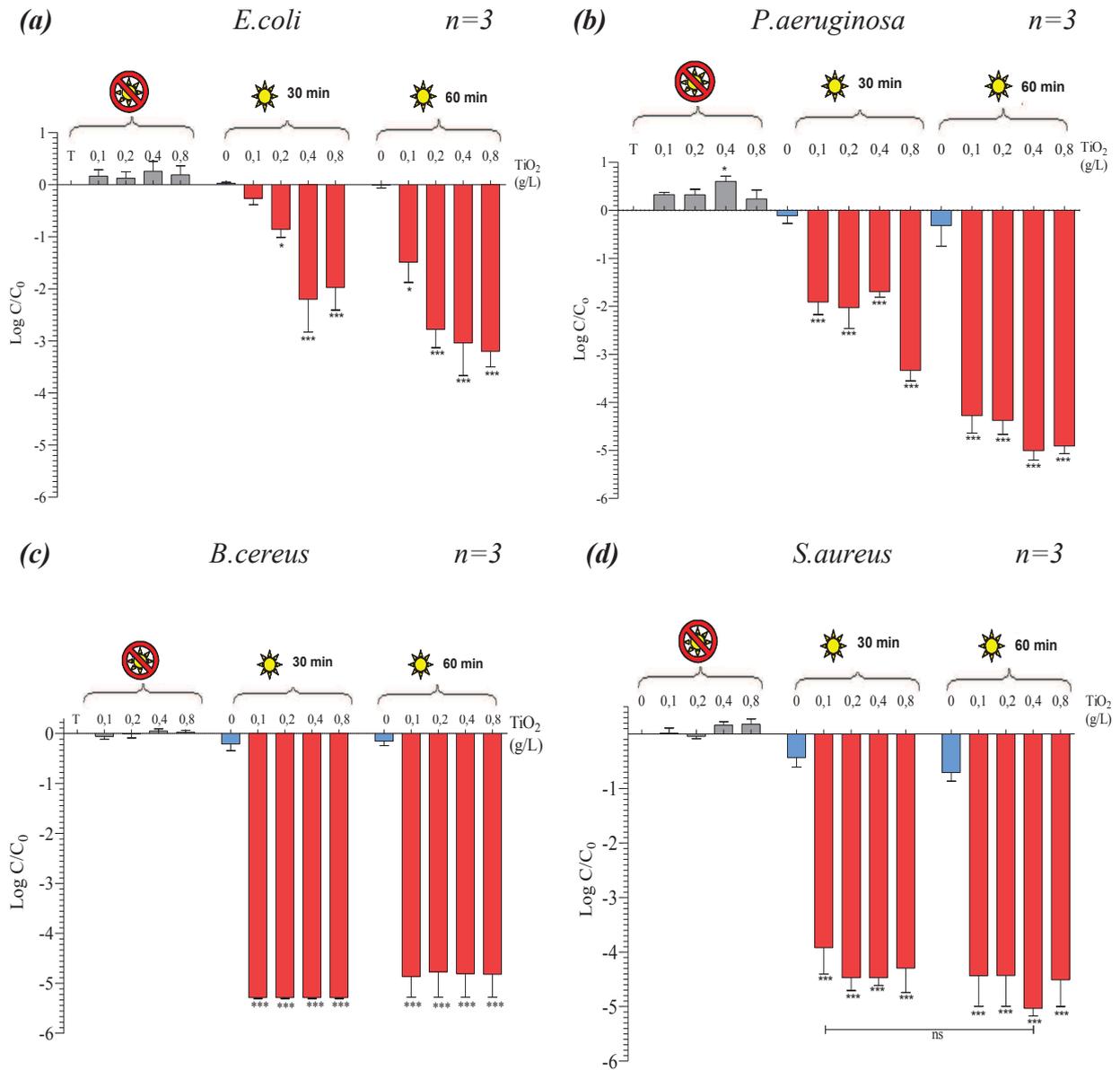


Figure 70 Influence de différents traitements photocatalytiques sur la viabilité cellulaire d'*E.coli* (a), de *P.aeruginosa* (b), de *B.cereus* (c) et *S.aureus* (d) avec une contamination initiale à  $10^6$  UFC/mL, déterminée par dénombrements sur milieux gélosés nutritifs.

$C_0$  : nombre de bactéries vivantes pour la condition sans UV-A ; sans  $TiO_2$ , en UFC/mL; C : nombre de bactéries vivantes pour la condition testée en UFC/mL.

Analyse statistique one way Anova avec \*P < 0,05 ; \*\*P < 0,01 et \*\*\*P < 0,001.

Cette analyse de l'effet antibactérien photocatalytique par dénombrements sur milieux gélosés montre que pour les bactéries étudiées :

- le rayonnement seul ou la cytotoxicité du TiO<sub>2</sub> ne sont pas suffisants pour induire une réduction significative de la viabilité cellulaire
- sur les 32 traitements photocatalytiques appliqués, 31 induisent une diminution significative de la viabilité cellulaire avec des réductions pouvant aller jusqu'à 5 log dans le cas de *P.aeruginosa* (60 min de rayonnement avec 0,4 g/L de TiO<sub>2</sub>), *B.cereus* et *S.aureus* (30 min de rayonnement avec 0,1 g/L de TiO<sub>2</sub>)
- *E.coli* et *P.aeruginosa*, bactéries à Gram négatif, en milieu liquide, sont moins sensibles au traitement photocatalytique que les formes végétatives de *B.cereus* et *S.aureus*, bactéries à Gram positif. En effet, pour les bacilles à Gram négatif, le maximum de réduction de 3,2 log pour *E.coli* et de 5 log pour *P.aeruginosa* est obtenu pour les conditions photocatalytiques les plus drastiques appliquées, alors que pour les bactéries à Gram positif, ce maximum de réduction est quasiment obtenu pour la plus faible condition photocatalytique testée (30 min de rayonnement UV-A et 0,1 g/L de TiO<sub>2</sub>). Des différences de réduction similaires sur les mêmes types de microorganismes (*E.coli*, *SARM* et *P.aeruginosa*) ont été observées par Dunlop *et al.* dans une étude de désinfection des surfaces grâce aux techniques de microscopie à fluorescence discriminant les bactéries vivantes des bactéries dont la membrane est endommagée.<sup>310</sup>

---

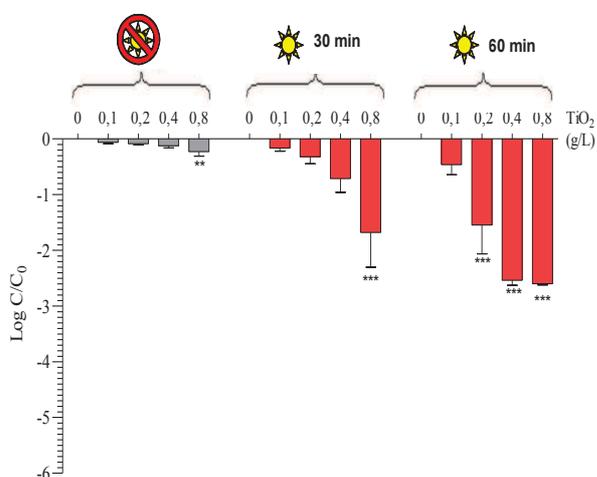
<sup>310</sup> Dunlop PSM, Sheeran CP, Byrne J, McMahon MAS, Boyle MA, McGuigan KG: **Inactivation of clinically relevant pathogens by photocatalytic coatings.** *Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry* 2010, **216**:303-310.

#### 4. Comparaison des deux méthodes de détermination de la viabilité cellulaire

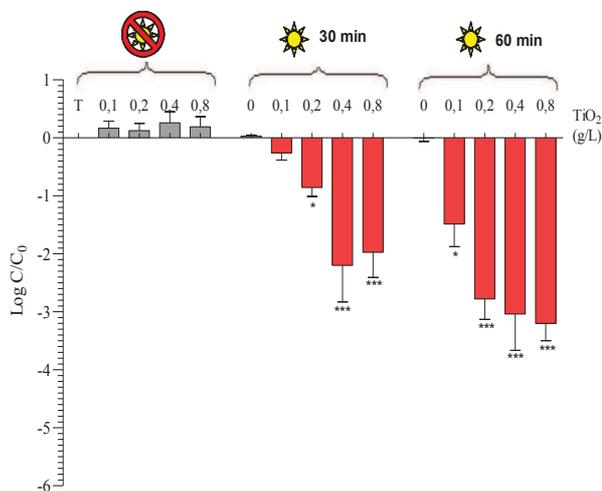
Dans cette partie, nous avons comparé les résultats obtenus par cytométrie capillaire avec ceux obtenus par dénombrement sur milieux gélosés afin de voir si une corrélation entre les deux techniques était possible.

Les histogrammes obtenus par les deux techniques présentent des profils identiques. Une baisse de la viabilité cellulaire déterminée par le dénombrement sur milieu gélosé correspondant bien à une diminution des U.A. déterminées par cytométrie capillaire (figure 71 et figure 72). Ces réductions logarithmiques de viabilité cellulaire obtenues pour les deux techniques sont reprises dans le tableau 24.

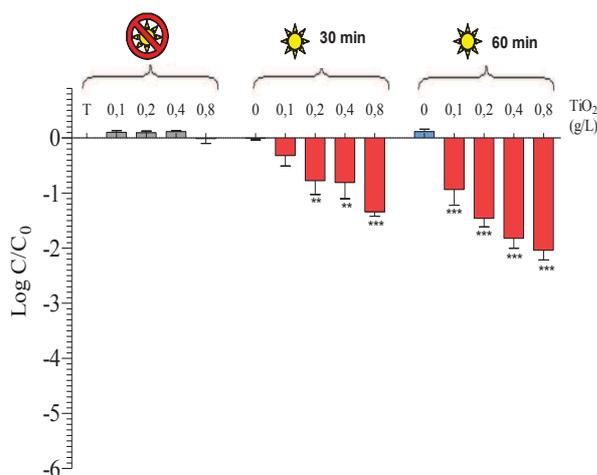
(a) *E.coli* (cytométrie capillaire) n=3



(b) *E.coli* (milieux gélosés nutritifs) n=3



(c) *P.aeruginosa* (cytométrie capillaire) n=3



(d) *P.aeruginosa* (milieux gélosés nutritifs) n=3

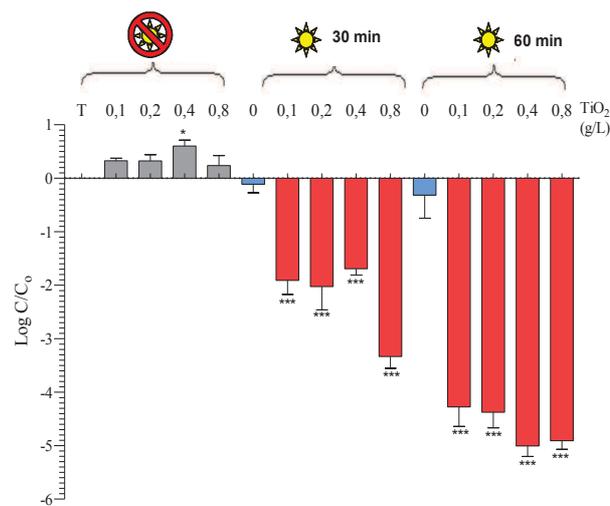


Figure 71 Influence de différents traitements photocatalytiques sur la viabilité cellulaire d'*E.coli* (a), (b) et de *P.aeruginosa* (c), (d) déterminée par cytométrie capillaire (a), (c) et par dénombrements sur milieux gélosés nutritifs (b), (d).  $C_0$  : nombre de bactéries vivantes pour la condition sans UV-A ; sans  $TiO_2$ , en UFC/mL.  $C$  : nombre de bactéries vivantes pour la condition testée en UFC/mL.

Analyse statistique one way Anova avec \* $P < 0,05$  ; \*\* $P < 0,01$  et \*\*\* $P < 0,001$ .

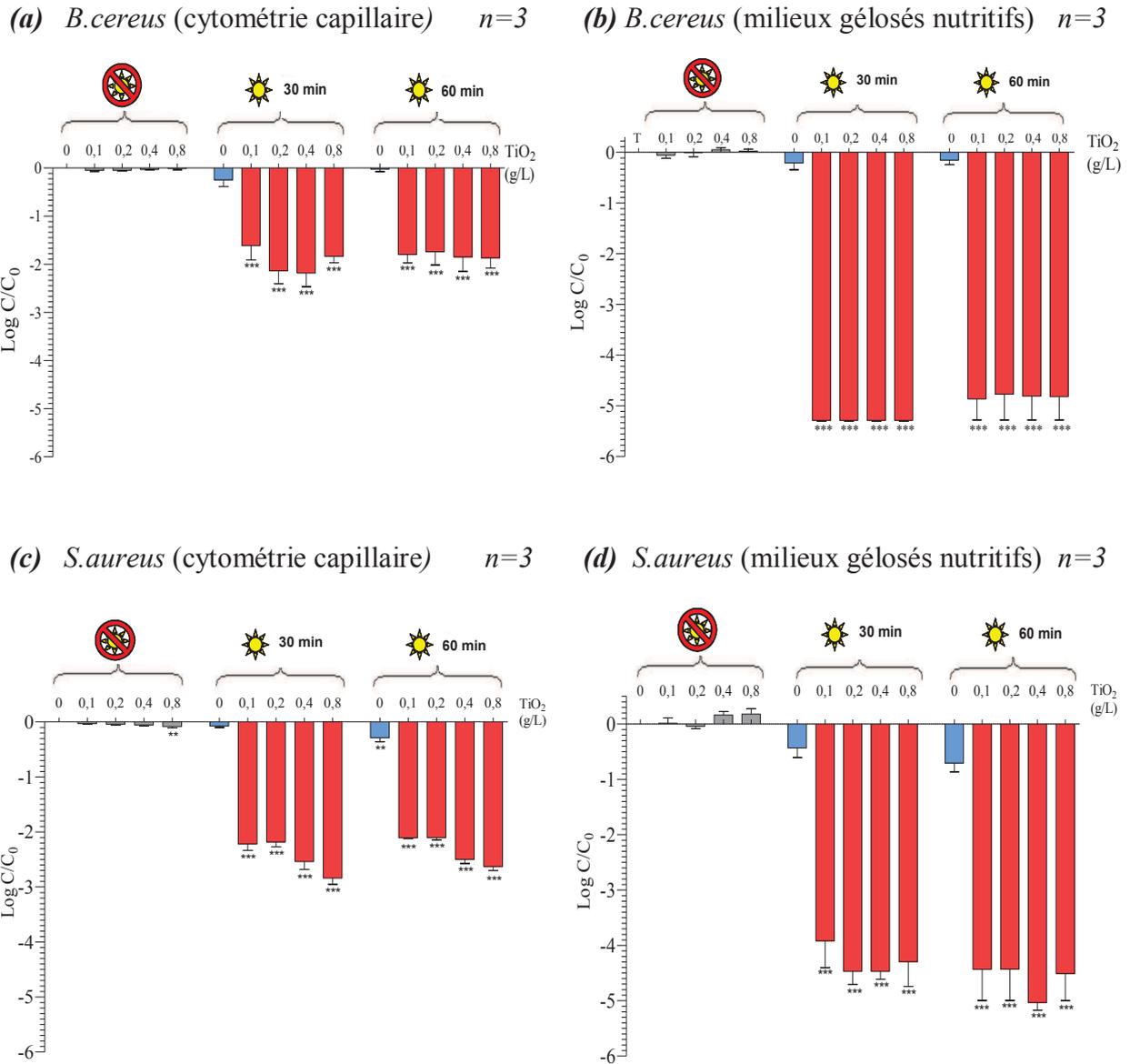


Figure 72 Influence de différents traitements photocatalytiques sur la viabilité cellulaire de *B.cereus* (a), (b) et de *S.aureus* (c), (d) déterminée par cytométrie capillaire (a), (c) et par dénombrements sur milieux gélosés nutritifs (b), (d).

$C_0$  : nombre de bactéries vivantes pour la condition sans UV-A ; sans  $\text{TiO}_2$ , en UFC/mL;  $C$  : nombre de bactéries vivantes pour la condition testée en UFC/mL.

Analyse statistique one way Anova avec \*\*P < 0,01 et \*\*\*P < 0,001.

Tableau 24 Tableau récapitulatif de la réduction logarithmique de la viabilité cellulaire, obtenu par cytométrie capillaire et par dénombrements sur milieux gélosés, lors de différents traitements photocatalytiques

[TiO <sub>2</sub> ] (g/L)						30 min 					60 min 				
	0	0,1	0,2	0,4	0,8	0	0,1	0,2	0,4	0,8	0	0,1	0,2	0,4	0,8
<b><i>E.coli</i></b>															
Cytométrie	0,2					1,7					1,5 2,5 2,6				
Gélose						0,9 2,2 2,0					1,5 2,8 3,0 3,2				
<b><i>P.aeruginosa</i></b>															
Cytométrie						0,8 0,8 1,3					0,9 1,5 1,8 2,0				
Gélose	-0,6					1,9 2,0 1,7 3,3					4,3 4,4 5,0 4,9				
<b><i>B.cereus</i></b>															
Cytométrie						1,6 2,1 2,2 1,8					1,8 1,7 1,8 1,9				
Gélose						5,3 5,3 5,3 5,3					4,9 4,8 4,8 4,8				
<b><i>S.aureus</i></b>															
Cytométrie	0,1					2,2 2,2 2,5 2,8					0,3 2,1 2,1 2,5 2,6				
Gélose						3,9 4,5 4,5 4,3					4,4 4,4 5,0 4,5				

 pas de différence significative avec le puits sans TiO<sub>2</sub>

#### 4.1. Différences de réduction de la viabilité cellulaire et paramètres interférents

Par les deux méthodes de détermination de la viabilité cellulaire, nous pouvons remarquer globalement que seuls les traitements photocatalytiques permettent d'induire des diminutions de la viabilité cellulaire.

Il est important de noter que les **mêmes tendances** sont observées avec les deux techniques :

- pour les quatre espèces bactériennes, l'effet cytotoxique du TiO<sub>2</sub> et le rayonnement n'induisent globalement pas de réduction de la viabilité cellulaire
- dans le cas des bactéries à Gram négatif (*E.coli* et *P.aeruginosa*), pour une durée de rayonnement donnée (30 min ou 60 min), une augmentation de la concentration en TiO<sub>2</sub> permet d'améliorer l'efficacité de réduction
- dans le cas des bactéries à Gram positif (*B.cereus* et *S.aureus*), un important effet antibactérien est obtenu dès 0,1 g/L de TiO<sub>2</sub> et 30 min de rayonnement (soit le traitement photocatalytique le moins drastique appliqué). Une augmentation de la durée de rayonnement et/ou de la concentration en TiO<sub>2</sub> n'améliore guère l'efficacité de réduction.
- pour la majorité des traitements photocatalytiques appliqués (quelles que soient les concentrations en TiO<sub>2</sub> utilisées avec une durée de rayonnement de 30 min et pour les concentrations en TiO<sub>2</sub> de 0,1 et de 0,2 g/L utilisées avec une durée de rayonnement de 60 min), des réductions logarithmiques plus importantes ont été obtenues pour les bactéries à Gram positif en comparaison aux réductions obtenues pour les bactéries à Gram négatif.

Cependant, nous observons également que les réductions obtenues par les deux méthodes sont très différentes, puisque par cytométrie capillaire le maximum de réduction obtenu est de 3 log alors que par la technique de dénombrements sur milieux gélosés, des réductions au-delà de 5 log ont pu être obtenues (tableau 24). Afin d'expliquer ces différences de réduction de la viabilité cellulaire, nous pouvons émettre cinq hypothèses :

- premièrement, cette différence de réduction pourrait être due à la formation des **agrégats bactéries-TiO<sub>2</sub>**. En effet, alors que chaque évènement fluorescent est comptabilisé par cytométrie capillaire en tant qu'une unique cellule, la technique de dénombrement sur milieux gélosés nutritifs ne peut pas faire la distinction entre les agrégats de bactéries-TiO<sub>2</sub> comportant une seule bactérie et ceux pouvant en comporter plusieurs, étant donné qu'il n'y aura production que d'une seule colonie. Ainsi, même si plusieurs bactéries incluses dans les agrégats sont capables de se diviser, elles ne seront alors comptabilisées que comme une seule colonie.<sup>311</sup>
- deuxièmement, pendant l'incubation sur milieux gélosés (soit 24 h environ), les particules de TiO<sub>2</sub> restent en contact des bactéries (étant donné que nous ne réalisons pas d'étape de séparation). Ainsi, du fait du **contact prolongé du TiO<sub>2</sub> avec les bactéries**, il n'est pas exclu que les particules de TiO<sub>2</sub> sous forme agrégées induisent une toxicité de contact et ce même à l'obscurité. En revanche, lors du dénombrement par cytométrie capillaire, ce potentiel effet cytotoxique est probablement minimisé étant donné que l'analyse à l'aide des sondes fluorescentes est réalisée directement après l'action photocatalytique (soit au maximum 60 min après le traitement photocatalytique).
- troisièmement, la présence de bactéries viables non cultivables (**BVNC**) pourrait interférer dans le comptage. En effet, suite à l'application du traitement photocatalytique (induisant un stress oxydatif), il ne serait pas surprenant de retrouver une partie de la population de bactéries vivantes sous un état physiologique intermédiaire entre les bactéries vivantes et les bactéries mortes : les BVNC. Du fait de l'application d'un stress comme le stress oxydatif, ces bactéries ne peuvent se développer sur milieu gélosé nutritif, elles ne sont donc pas comptabilisées par la technique traditionnelle. En revanche, par cytométrie capillaire, elles sont comptabilisées comme vivantes étant donné que leur intégrité membranaire est conservée. L'incapacité de dénombrer ces BVNC par la technique traditionnelle est souvent décrite comme un facteur limitant de la méthode.<sup>312,313</sup>
- quatrièmement, il se peut que les **seuils de détection** de l'intensité de fluorescence fixés ne permettent pas la mise en évidence dans notre cas de **faibles ou très faibles variations de l'intégrité membranaire** et de ce fait minimise les résultats obtenus par cytométrie.

<sup>311</sup> Zhukova LV, Kiwi J, Nikandrov VV: **TiO<sub>2</sub> nanoparticles suppress *Escherichia coli* cell division in the absence of UV irradiation in acidic conditions.** *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* 2012.

<sup>312</sup> Josset S, Keller N, Lett MC, Ledoux MJ, Keller V: **Numeration methods for targeting photoactive materials in the UV-A photocatalytic removal of microorganisms.** *Chemical Society reviews* 2008, **37**(4):744-755.

<sup>313</sup> Venieri D, Chatzisyneon E, Gonzalo MS, Rosal R, Mantzavinos D: **Inactivation of *Enterococcus faecalis* by TiO<sub>2</sub>-mediated UV and solar irradiation in water and wastewater: culture techniques never say the whole truth.** *Photochem Photobiol Sci* 2011, **10**(11):1744-1750.

- cinquièmement, les **temps d'analyse** après traitements photocatalytiques sont différents. En effet, lors de l'analyse de l'intégrité membranaire par cytométrie, les résultats sont obtenus directement après les traitements photocatalytiques, alors que par la technique de dénombrement sur milieux gélosés, l'effet antibactérien est observé après 24 h de mise en culture.

Ces cinq hypothèses sont toutes favorables à l'obtention de meilleures réductions sur milieu gélosé nutritif par rapport à l'estimation de la viabilité cellulaire par cytométrie capillaire (ce qui est en accord avec nos résultats).

## **4.2. Avantages et inconvénients des deux techniques utilisées**

### **La technique de dénombrements sur milieux gélosés**

Bien que la technique de dénombrement sur milieux gélosés soit peu onéreuse et qu'il s'agisse de la technique de référence pour le dénombrement, cette méthode présente un certain nombre d'inconvénients :

- elle est assez longue et fastidieuse
- elle ne fournit les résultats qu'après 24 h d'incubation
- les écarts types des histogrammes sont beaucoup plus importants par rapport aux écarts types obtenus par la technique de cytométrie capillaire. Ces écarts types reflètent la variabilité des résultats obtenus d'une expérience à l'autre (effet manipulateur : prélèvement, réalisation de dilutions successives, étalements...)
- la présence d'agrégats bactéries-TiO<sub>2</sub> interfère dans le comptage : une colonie dénombrée ne correspond pas forcément à une bactérie isolée mais parfois à un groupe de bactéries contenu dans les agrégats mixtes bactéries-TiO<sub>2</sub>.
- elle ne nous permet pas de visualiser les BVNC.

### **La technique de cytométrie capillaire**

Bien que cette technologie soit rapide, précise et fidèle (justesse des résultats et écarts types faibles), automatisée et générant de nombreuses informations, nous pouvons tout de même relever quelques points négatifs :

- il s'agit d'une technique relativement chère (coût de la manipulation, coût de l'appareil, maintenance...)
- pour notre étude de la « viabilité bactérienne », nous ne disposions pas d'étalons internes de fluorescence. La mise au point et la définition des différentes régions (bactéries vivantes, mortes, débris cellulaires...) furent quelques fois laborieuses.
- pour les bactéries présentant la même fluorescence, rien ne nous assure qu'elles présentent toutes le même statut physico-physiologique. Il est par ailleurs bien connu que la définition de la viabilité bactérienne est complexe et qu'au sein d'une population, les bactéries peuvent être très hétérogènes en termes de viabilité, physiologie...
- certaines zones de fluorescences se chevauchent, comme celles de la zone des débris cellulaires avec les bactéries mortes, ou bien celle des bactéries vivantes avec celle des bactéries mortes. Le chevauchement de ces différentes zones de fluorescence ne peut que biaiser nos résultats. Toutefois, nous avons minimisé l'effet photocatalytique, en

considérant uniquement la zone correspondant aux bactéries vivantes en sachant qu'au sein de cette zone de fluorescence, il doit vraisemblablement y avoir des bactéries incapables de se développer sur milieu gélosé, les BVNC.

De plus, la cytométrie capillaire en analysant l'intégrité membranaire *via* l'utilisation de sondes fluorescentes a aussi l'avantage de nous renseigner sur les phénomènes d'agrégation bactéries-TiO<sub>2</sub>.

### **Conclusion sur les deux méthodes de détermination de la viabilité cellulaire**

La cytométrie capillaire appliquée à la détermination de la viabilité cellulaire après traitements photocatalytiques se révèle être un outil à fort potentiel (automatisation, rapidité d'analyse, fiabilité...). Non seulement, elle nous a permis le dénombrement des bactéries viables mais elle nous a également permis de visualiser les bactéries mortes et les débris cellulaires. De plus elle nous donne accès à des informations d'ordre physique comme la taille et la granulosité, ce qui nous a permis de mettre en évidence les phénomènes d'agrégation bactéries-TiO<sub>2</sub>.

Bien que les deux techniques aient fourni la même tendance de réponse aux différents traitements appliqués, il n'en reste pas moins que de réelles différences de réduction ont été constatées. Dès lors il paraît légitime de se poser la question suivante : quelle est la technique la plus adaptée pour déterminer la viabilité cellulaire en milieu liquide ?

Pour la détermination de l'efficacité antimicrobienne du TiO<sub>2</sub>, nous pensons que la technique de cytométrie capillaire est la plus adaptée : automatisée et reproductible, elle nous permet d'évaluer rapidement l'efficacité des traitements. De plus cette technique nous permet de visualiser les BVNC ce que ne nous permet pas le dénombrement sur milieu gélosé. En conditions réelles, ces BVNC peuvent malgré tout sécréter des toxines, des enzymes ou des substrats utilisables par d'autres communautés bactériennes. Ainsi il est important de prendre en considération cette population bactérienne dans la détermination de l'efficacité d'un traitement. De plus, la technique de dénombrement sur milieu gélosé a tendance comme nous l'avons vu à surestimer l'efficacité des traitements (interférence dans le comptage des agrégats bactéries-TiO<sub>2</sub>). A ce jour, il faut cependant reconnaître que pour obtenir une échelle de réduction plus large (par exemple avec un seuil de détection au minimum de 5 log), quelques travaux d'optimisation et de réglage seraient nécessaires.

**Chapitre 4 : Etude des mécanismes d'oxydation  
ainsi que leur effet sur les différents composants  
cellulaires après traitements photocatalytiques**

Le quatrième chapitre de cette thèse s'attache à la compréhension des mécanismes d'oxydation ainsi que leur effet sur différents composants cellulaires (lipides et protéines).

Il est divisé en quatre sous chapitres. Le **premier** aura pour but **d'évaluer le rôle des radicaux anions superoxydes  $O_2^{\circ-}$  dans l'effet antibactérien de  $TiO_2$** . A ce jour, les radicaux le plus souvent cités comme responsable de l'effet antimicrobien du  $TiO_2$  sont les radicaux hydroxyles, cependant peu d'articles se sont intéressés au rôle des radicaux anions superoxydes  $O_2^{\circ-}$  dans cet effet. Ainsi dans ce sous-chapitre, après avoir sélectionné, la molécule scavenger la plus efficace pour piéger  $O_2^{\circ-}$  grâce à l'utilisation de la technique de chimiluminescence et à l'addition de molécules scavengers spécifiques d' $O_2^{\circ-}$ , nous évaluerons à l'aide de dénombrement sur milieu gélosé, la part de ces radicaux dans l'effet antibactérien du  $TiO_2$ .

Après avoir montré le rôle majoritaire d' $O_2^{\circ-}$  dans l'effet antibactérien de  $TiO_2$ , nous nous attacherons à **évaluer le rôle de ces derniers dans la peroxydation lipidique** chez *E.coli* et ceci fera l'objet de ce **deuxième** sous-chapitre. Du fait de leur localisation au niveau des membranes cellulaires, les lipides sont parmi les premières molécules sujettes à l'oxydation. Tandis que la peroxydation lipidique est un mécanisme d'oxydation assez bien décrit dans la littérature, le rôle des radicaux anions superoxydes  $O_2^{\circ-}$  photogénérés dans ce processus reste moins bien documenté. Ainsi grâce à la technique de quantification du malondialdéhyde et à l'ajout de molécule scavenger spécifique d' $O_2^{\circ-}$  (préalablement sélectionnée dans l'étude de chimiluminescence), nous évaluerons le rôle de ces derniers dans ce phénomène d'oxydation.

Le **troisième** sous-chapitre s'attache à **l'étude des modifications protéomiques** de la souche *E.coli* ATCC 8739 à différents traitements. Réalisée à l'aide de la technique d'électrophorèse bi-dimensionnelle couplée à de la spectrométrie de masse, cette analyse protéomique a pour but de sélectionner différentes cibles d'action potentielles du  $TiO_2$  (irradié ou non) sur les protéines.

Enfin le **quatrième** sous-chapitre reprend les **différents résultats de cette étude de la compréhension des mécanismes d'oxydation et de leur effet sur les lipides et les protéines** et les confrontent aux résultats précédemment obtenus lors de la détermination de **l'effet antibactérien du  $TiO_2$  en milieu liquide**.

## **I. Mise en évidence des radicaux anions superoxydes $O_2^{\circ-}$ par Chimiluminescence (CL). Implication dans l'effet antibactérien du $TiO_2$**

Dans cette partie, après avoir réalisé un suivi de CL des radicaux anions superoxydes  $O_2^{\circ-}$  grâce à l'ajout dans le milieu réactionnel de molécule scavenger spécifique d' $O_2^{\circ-}$ , nous nous sommes intéressés au rôle potentiel de ces derniers dans l'effet antibactérien du  $TiO_2$ .

Pour mettre en évidence les espèces très réactives tel qu' $O_2^{\circ-}$ , la Résonance Paramagnétique Electronique (RPE) couplée à des techniques de piégeage (spin trapping) est couramment utilisée.<sup>314,315,316,317,318</sup> Cette technique très pointue présente néanmoins quelques désavantages dont le fait notamment qu'elle ne peut être employée en présence de microorganismes. Afin d'apprécier au mieux les ROS émis, d'autres méthodes cette fois-ci chimiques peuvent être utilisées comme la fluorescence,<sup>319</sup> la phosphorescence,<sup>320</sup> ou la chimiluminescence (CL).<sup>321,322</sup>

Dans le cadre de cette étude, nous avons sélectionné une technique relativement facile à mettre en œuvre, assez sensible et pouvant être utilisée en présence de matériel biologique : la chimiluminescence. Le luminol est connu pour être sensible aux réactions d'oxydation et émettre dans ce cas des photons pouvant être détectés.<sup>322</sup> Il est important de préciser d'ores et déjà que seuls les radicaux anions superoxydes  $O_2^{\circ-}$  pourront être détectés du fait de la trop courte durée de vie des autres espèces réactives de l'oxygène photogénérées mais ce point sera détaillé dans le Chapitre 4 I.3. intitulé « Influence de la durée de vie des ROS photogénérées et prise en considération des limites du système ».

<sup>314</sup> Yu J, Chen J, Li C, Wang X, Zhang B, Ding H: **ESR Signal of Superoxide Radical Anion Adsorbed on  $TiO_2$  Generated at Room Temperature.** *The journal of Physical Chemistry B* 2004, **108**(9):2781-2783.

<sup>315</sup> Lee MC, Yoshino F, Shoji H, Takahashi S, Todoki K, Shimada S, Kuse-Barouch K: **Characterization by electron spin resonance spectroscopy of reactive oxygen species generated by titanium dioxide and hydrogen peroxide.** *Journal of dental research* 2005, **84**(2):178-182.

<sup>316</sup> Lipovsky A, Levitski L, Tzitrinovich Z, Gedanken A, Lubart R: **The different behavior of rutile and anatase nanoparticles in forming oxy radicals upon illumination with visible light: an EPR study.** *Photochemistry and photobiology* 2012, **88**(1):14-20.

<sup>317</sup> Lu C, Song G, Lin J-M: **Reactive oxygen species and their chemiluminescence-detection methods.** *TrAC Trends in Analytical Chemistry* 2006, **25**(10):985-995.

<sup>318</sup> Sawada T, Yoshino F, Kimoto K, Takahashi Y, Shibata T, Hamada N, Sawada T, Toyoda M, Lee MC: **ESR detection of ROS generated by  $TiO_2$  coated with fluoridated apatite.** *Journal of dental research* 2010, **89**(8):848-853.

<sup>319</sup> Ishibashi K-I, Fujishima A, Watanabe T, Hashimoto K: **Detection of active oxidative species in  $TiO_2$  photocatalysis using the fluorescence technique.** *Electrochemistry communications* 2000, **2**(3):207-210.

<sup>320</sup> Daimon T, Hirakawa T, Kitazawa M, Suetake J, Nosaka Y: **Formation of singlet molecular oxygen associated with the formation of superoxide radicals in aqueous suspensions of  $TiO_2$  photocatalysts.** *Applied Catalysis A: General* 2008, **340**(2):169-175.

<sup>321</sup> Hirakawa T, Kominami H, Ohtani B, Nosaka Y: **Mechanism of photocatalytic production of active oxygens on highly crystalline  $TiO_2$  particles by means of chemiluminescent probing and ESR spectroscopy.** *The journal of Physical Chemistry B* 2001, **105**(29):6993-6999.

<sup>322</sup> Nosaka Y, Yamashita Y, Fukuyama H: **Application of chemiluminescent probe to monitoring superoxide radicals and hydrogen peroxide in  $TiO_2$  photocatalysis.** *The journal of Physical Chemistry B* 1997, **101**(30):5822-5827.

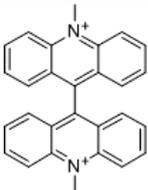
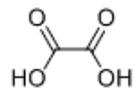
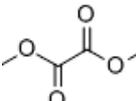
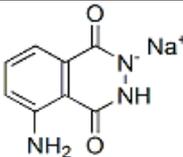
## 1. Principe de la chimiluminescence

La luminescence est l'émission d'un photon lorsqu'une molécule excitée retourne vers un état énergétique moins élevé. On parle de chimiluminescence lorsque cette excitation résulte d'une réaction chimique, comme l'oxydation.

Afin de mesurer la production de ROS pendant la photocatalyse, nous utilisons une **sonde luminogénique** qui va réagir avec ces ROS, et permettre de mesurer un signal lumineux corrélé à leur production. Il en existe de différents types dont quelques exemples sont présentés dans le tableau 25.<sup>323</sup>

Le luminol est la sonde la plus couramment utilisée pour mettre en évidence la chimiluminescence dans les systèmes biologiques et plus spécifiquement pour l'identification de  $O_2^{\cdot -}$ .<sup>324,325</sup>

Tableau 25 Caractéristiques des principales sondes luminogéniques

Nature	Exemple	
Sels d'acridium	lucigénine	
	sels d'oxalate	
Peroxyoxalates	esters d'oxalate	
	1,2 dioxyéthane et dérivés	1,2 dioxyéthane
Acyles hydrazides	luminol	

Le phénomène de CL peut être décomposé en différentes étapes (figure 73) :

- le radical luminol ( $L^{\cdot}$ ) peut être formé par l'oxydation de l'ion luminol ( $LH^-$ ) en solution alcaline. *Nous pouvons cependant noter que suivant les articles consultés différentes étapes/intermédiaires sont possibles pour conduire à la formation du radical luminol*<sup>326,327</sup> (le schéma réactionnel présenté ici est extrait d'un article relatif à l'utilisation de la chimiluminescence)<sup>317</sup>

<sup>323</sup> Dodeigne C, Thunus L, Lejeune R: **Chemiluminescence as diagnostic tool. A review.** *Talanta* 2000, **51**:415-439.

<sup>324</sup> Hodgson EK, Fridovich I: **The role of  $O_2^{\cdot -}$  in the chemiluminescence of luminol.** *Photochemistry and photobiology* 1973, **18**(6):451-455.

<sup>325</sup> Wu XZ, Lingyue M, Akiyama K: **Chemiluminescence study of active oxygen species produced by  $TiO_2$  photocatalytic reaction.** *Luminescence* 2005, **20**(1):36-40.

<sup>326</sup> Kohtani S, Yoshida K, Maekawa T, Iwase A, Kudo A, Miyabe H, Nakagaki R: **Loading effects of silver oxides upon generation of reactive oxygen species in semiconductor photocatalysis.** *Physical chemistry chemical physics : PCCP* 2008, **10**:2986-2992.

- une réaction avec les radicaux anions superoxydes  $O_2^{\circ-}$  conduit à la formation d'un peroxyde intermédiaire de courte durée de vie ( $LO_2H^-$ ).
- ce peroxyde intermédiaire ( $LO_2H^-$ ) peut rapidement être décomposé avec une perte d'azote qui conduit à la formation d'acide 3-aminophtalique possédant des électrons dans un état excité ( $AP^*$ ).
- la désexcitation de la molécule provoque l'émission d'un photon.

La quantité de photon émise est quantifiée avec un photomultiplicateur et est proportionnelle à la quantité de luminol oxydée.<sup>328</sup>

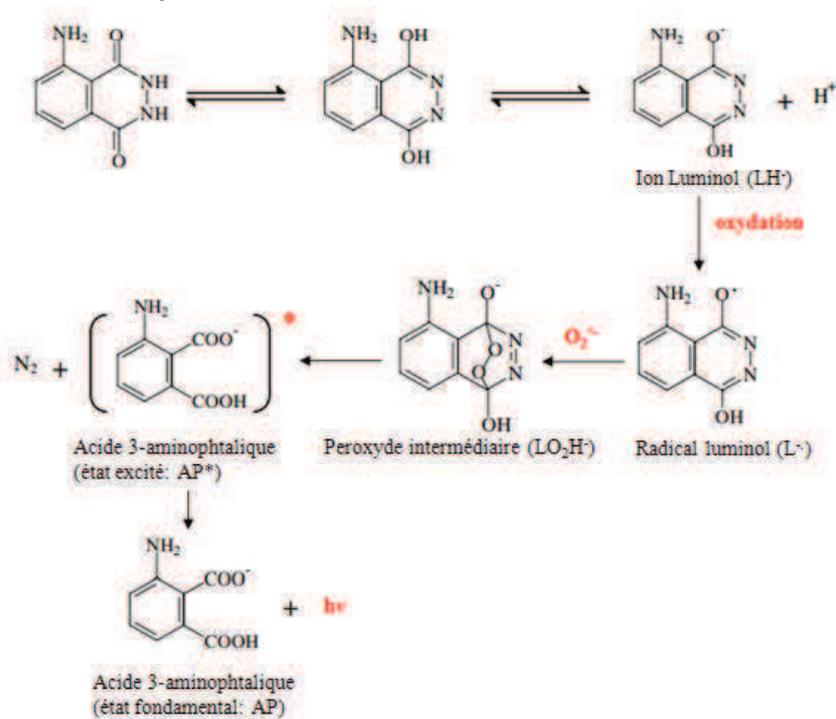


Figure 73 Mécanisme de la réaction de CL du luminol en solution alcaline en présence d' $O_2^{\circ-}$  d'après<sup>317</sup>

Bien qu'ici nous n'ayons présenté que le mécanisme de la réaction de CL du luminol en présence des radicaux anions superoxydes  $O_2^{\circ-}$ , on peut trouver des articles qui relatent que ce mécanisme n'est pas sélectif envers  $O_2^{\circ-}$  puisqu'il peut être appliqué pour la recherche d' $H_2O_2$ , d' $OH^-$ ,<sup>329</sup> du radical hydroxyle  $OH^\circ$ , de l'oxygène singulet  $^1O_2$ <sup>330</sup> ...

<sup>327</sup> Yamaguchi M, Yoshisa H, Nohta H: **Luminol-type chemiluminescence derivatization reagents for liquid chromatography and capillary electrophoresis.** *Journal of chromatography A* 2002, **950**(1-2):1-19.

<sup>328</sup> Min L, Wu XZ: **Chemiluminescence from luminol solution after illumination of a 355 nm pulse laser.** *Luminescence* 2009, **24**(6):400-408.

<sup>329</sup> Kobayashi H, Gil-Guzman E, Mahran AM, Rakesh, Nelson DR, Thomas AJ, Jr., Agarwa A: **Quality control of reactive oxygen species measurement by luminol-dependent chemiluminescence assay.** *Journal of andrology* 2001, **22**(4):568-574.

<sup>330</sup> Yamaguchi S, Kishikawa N, Ohyama K, Ohba Y, Kohno M, Masuda T, Takadate A, Nakashima K, Kuroda N: **Evaluation of chemiluminescence reagents for selective detection of reactive oxygen species.** *Analytica chimica acta* 2010, **665**(1):74-78.

### Système de lecture : le luminomètre Lumac Biocounter M2500C®

Le suivi de chimiluminescence a été réalisé à l'aide du luminomètre de marque Lumac Biocounter M2500 C ®. Ce luminomètre est composé d'un photomultiplicateur (amplificateur de signal), d'une chambre de mesure, d'un dispositif d'injection de réactif et d'un écran digital. Il peut détecter des photons appartenant à une gamme de longueurs d'onde allant de 350 nm à 600 nm.

Dans notre cas, avec le luminol, le phénomène de luminescence se déroule en milieu alcalin d'où l'ajout de carbonate de sodium à 1,0 M dans le mélange réactionnel.<sup>331</sup> La quantité de **Relative Light Units (RLU)** lue sur le luminomètre est directement proportionnelle à la quantité de ROS émise dans le milieu, étant donné que le luminol est en excès. Les photons émis dans la chambre de mesure étanche à la lumière extérieure, entrent dans le tube du photomultiplicateur par son verre cathodique et frappent une photocathode ce qui lui arrache des électrons. Ces électrons sont multipliés par une chaîne de dynodes puis transférés à l'anode, qui va mesurer le signal amplifié. Les impulsions sont ensuite comptabilisées sur un certain temps de mesure et exprimées en RLU. Par abus de langage, on parle alors de « signal RLU ». La limite de détection supérieure en RLU se situe aux alentours de 500 000 RLU.

## 2. Principe de l'ajout de molécules scavengers

Les molécules scavengers vont piéger spécifiquement un ou plusieurs ROS. Divers scavengers de natures multiples sont répertoriés (tableau 26), comme le mannitol qui piège spécifiquement le radical hydroxyle, la superoxyde dismutase qui piège l'anion superoxyde (Eq.25)...

Dans le cas où le(s) ROS sont piégée(s), on observe une diminution voire une disparition de la CL, ce qui se traduit par une diminution ou une absence du signal de RLU, permettant alors l'identification du (des) ROS générées.



Équation 25

---

<sup>331</sup> Andre P, Metzger C, Petey S, Muller D, Vidon DJ: **Chemiluminescence of enterococci isolates from freshwater**. *FEMS microbiology letters* 2005, **245**(1):123-129.

Tableau 26 ROS spécifiquement piégée par quelques exemples de molécules scavengers

Nom	ROS piégée
Histidine (monohydrate de chlorhydrate) <sup>332</sup>	$^1\text{O}_2$
(D)-Mannitol <sup>332,333</sup>	$\text{OH}^\circ$
Tiron (Disodium pyrocatechol-3,5-disulfonate) <sup>333,334</sup>	$\text{O}_2^{\circ-}$
Urée <sup>335</sup>	$\text{OH}^\circ$
Superoxyde Dismutase bovine <sup>335</sup>	$\text{O}_2^{\circ-}$

### 3. Influence de la durée de vie des ROS photogénérées et prise en considération des limites du système

Lors de l'activation de  $\text{TiO}_2$ , différentes espèces oxydantes sont générées à la surface du  $\text{TiO}_2$  comme le radical hydroxyle  $\text{OH}^\circ$ ,<sup>336</sup> le radical anion superoxyde  $\text{O}_2^{\circ-}$  et dans une plus faible proportion le peroxyde d'hydrogène  $\text{H}_2\text{O}_2$  et l'oxygène singulet  $^1\text{O}_2$ .<sup>337</sup> Il aurait été intéressant dans le but de comprendre le rôle de ces différentes espèces dans l'effet antibactérien du  $\text{TiO}_2$  de suivre indirectement la production de ces différents ROS par CL –*via* l'ajout de molécules scavengers spécifiques de ROS –. Cependant la technique de CL utilisée pour le suivi de production de ROS ne permet pas de mettre en évidence le radical hydroxyle  $\text{OH}^\circ$ , ni l'oxygène singulet  $^1\text{O}_2$ . En effet, les radicaux hydroxyles  $\text{OH}^\circ$  et l'oxygène singulet  $^1\text{O}_2$  ont des durées de vie courtes, respectivement de l'ordre de la nanoseconde et d'environ 2  $\mu\text{s}$ ,<sup>338</sup> de sorte que leur détection et leur quantification par CL s'avèrent impossible.<sup>339</sup> En effet,  $\text{TiO}_2$  doit nécessairement être irradié pour générer des ROS, ce qui n'est pas le cas lors du transfert dans la chambre de lecture du luminomètre, ce qui implique nécessairement que les ROS à très courtes durées de vie ne sont plus présents (le transfert du volume à analyser ne peut se faire en moins de 2 s).

En revanche, le radical anion superoxyde  $\text{O}_2^{\circ-}$  a un temps de demi-vie assez élevé (environ 50 s à l'interface air- $\text{TiO}_2$  et environ 70 s à l'interface eau- $\text{TiO}_2$ ),<sup>340</sup> ainsi il est plus facile de les

<sup>332</sup> Min DB, Boff JM: **Chemistry and reaction of singlet oxygen in foods**. *Comprehensive reviews in food science and food safety* 2002, 1(2):58-72.

<sup>333</sup> Andre P, Bilger S, Remy P, Bettinger S, Vidon DJ: **Effects of iron and oxygen species scavengers on *Listeria* spp. Chemiluminescence**. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 2003, 304:807–811.

<sup>334</sup> Ghosh M, Wang HD, McNeill JR: **Tiron exerts effects unrelated to its role as a scavenger of superoxide anion: effects on calcium binding and vascular responses**. *Can J Physiol Pharmacol* 2002, 80:755-760.

<sup>335</sup> Repine JE, Johansen KS, Berger EM: **Hydroxyl radical scavengers produce similar decreases in the chemiluminescence responses and bactericidal activities of neutrophils**. *Infection and immunity* 1984, 43(1):435-437.

<sup>336</sup> Hoffmann D, Martin ST, Choi W, Bahnemann DW: **Environmental applications of semiconductor photocatalysis**. *Chemical reviews* 1995, 95(1):69-96.

<sup>337</sup> Fujishima A, Zhang X, Tryk DA:  **$\text{TiO}_2$  photocatalysis and related surface phenomena**. *Surface science reports* 2008, 63(12):515-582.

<sup>338</sup> Nosaka Y, Daimon T, Nosaka AY, Murakami Y: **Singlet oxygen formation in photocatalytic  $\text{TiO}_2$  aqueous suspension**. *Physical chemistry chemical physics : PCCP* 2004, 6:2917-2918.

<sup>339</sup> Tachikawa T, Majima T: **Single-molecule detection of reactive oxygen species: application to photocatalytic reactions**. *Journal of fluorescence* 2007, 17(6):727-738.

<sup>340</sup> Ishibashi K-I, Fujishima A, Watanabe T, Hashimoto K: **Generation and deactivation processes of superoxide fomed on  $\text{TiO}_2$  film illuminated by very weak UV light in air or water**. *The journal of Physical Chemistry B* 2000, 104(20):4934-4938.

mettre en évidence par CL. Nous partons ainsi du postulat selon lequel globalement seuls les radicaux anions superoxydes pourront être détectés par cette technique (cette hypothèse s'avère être vérifiée lors de l'ajout de molécule scavenger d' $O_2^{\bullet -}$  puisque le signal de CL recueilli sera très faible).

#### 4. Préparation du milieu réactionnel et modes opératoires pour le suivi de CL lors des tests

##### 4.1. En absence de microorganismes et de molécules scavengers

Avant l'ajout de microorganismes dans le milieu réactionnel, il a été nécessaire de réaliser des mesures de CL en présence de  $TiO_2$ .

Pour ce faire et pour suivre la CL lors des tests, le milieu réactionnel est constitué de 4 mL d'une suspension de  $TiO_2$  dans l'eau  $\phi$  à 0,1 ; 0,4 g ou 0,8 g/L. Il est obtenu en prélevant 400  $\mu L$  d'une suspension de  $TiO_2$  de concentration respectivement de 1 ; 4 ou 8 g/L additionné de 3,6 mL d'eau  $\phi$  (figure 74). Ces suspensions à 1 ; 4 et 8 g/L de  $TiO_2$  ont été réalisées à partir d'une unique suspension mère de  $TiO_2$  à 10 g/L (0,2 g de  $TiO_2$  dispersé dans 20 mL d'eau  $\phi$ ).

100  $\mu L$  de cette suspension sont ensuite prélevés toutes les 5 min et additionnés à 100  $\mu L$  de luminol  $10^{-2}$  M (Sigma Aldrich) et à 100  $\mu L$  de carbonate de sodium anhydre 1,0 M (Merck). Le suivi de l'analyse se déroule sur 40 min avec :

- durant les 10<sup>ères</sup> minutes, une non exposition du milieu réactionnel au rayonnement UV-A
- durant les 30 minutes suivantes, une exposition du milieu réactionnel au rayonnement UV-A (irradiance UV-A de 30 W/m<sup>2</sup>).

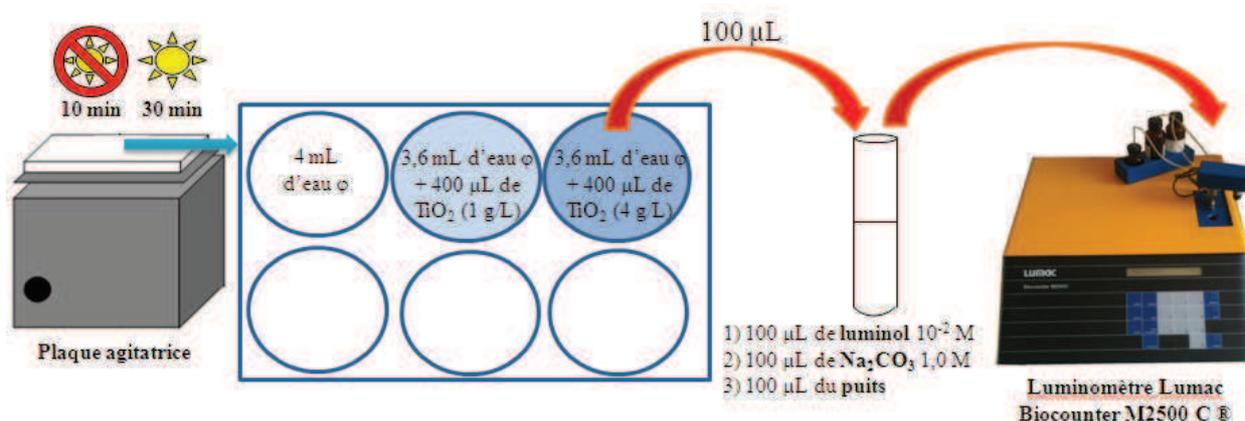


Figure 74 Préparation du mélange réactionnel et mesure de RLU au luminomètre. La plaque est placée les 10 ères minutes à l'obscurité, puis les 30 min suivantes sous rayonnement UV-A de 30 W/m<sup>2</sup>.

## 4.2. Avec ajout de molécules scavengers en absence et en présence de microorganismes

En présence de molécules scavengers, le milieu réactionnel dans chaque puits (4 mL) est composé comme suit :

- 400  $\mu\text{L}$  d'une suspension de  $\text{TiO}_2$ /eau  $\phi$  à 1 g/L soit une concentration finale dans le puits à 0,1 g/L (préparation similaire au Chapitre 4 I 4.1)
- 3,2 mL d'eau  $\phi$  ou 3,2 mL d'une suspension bactérienne à  $10^7$  UFC/mL dans le cas de l'étude de la mise en évidence des ROS en présence de microorganismes.  
Trois espèces bactériennes ont été testées : *P.aeruginosa*, *E.coli* et *S.aureus*. Leur préparation est similaire au protocole décrit dans le chapitre 2 IV. Après obtention de la suspension bactérienne à  $10^8$  UFC/mL, une dilution au  $1/10^{\text{ème}}$  en eau  $\phi$  est réalisée afin d'obtenir une suspension bactérienne à  $10^7$  UFC/mL.
- 400  $\mu\text{L}$  de molécules scavengers d' $\text{O}_2^{\circ-}$  dont les concentrations dans le puits sont présentées dans le tableau 27. Ces molécules scavengers ont été utilisées dans le cadre de l'étude de la mise en évidence des ROS lors des tests en **absence de microorganismes** ; elles ont été ajoutées au début de l'expérience à  $t_0$ . En revanche, lors des tests en **présence de microorganismes**, au vu des résultats obtenus en absence de microorganismes qui seront présentés en Chapitre 4 I.5., seule une molécule scavenger a été retenue, il s'agit de la **SOD**. Dans ce cas, seul l'effet de l'ajout de la SOD à différentes concentrations a été étudié, avec l'ajout d'une unique concentration en SOD (500 U ou 1000 U) ajoutée à  $t_0$  et l'ajout consécutif de deux doses de SOD (500 U) à  $t_0$  et  $t_{30}$ .

**En absence de microorganisme**, nous avons réalisé des suivis de CL sur 40 min avec :

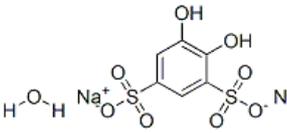
- durant les 10<sup>ères</sup> minutes, une non exposition du milieu réactionnel au rayonnement UV-A
- durant les 30 minutes suivantes, une exposition du milieu réactionnel au rayonnement UV-A (irradiance UV-A de  $30 \text{ W/m}^2$ ).

**Pour les puits contenant les microorganismes**, deux plaques ont été réalisées et nous avons effectué un suivi de CL pour chacune d'elles sur 60 min avec des prélèvements toutes les 15 min :

- une plaque n'est pas exposée au rayonnement UV-A
- la deuxième plaque est exposée au rayonnement UV-A (irradiance UV-A de  $30 \text{ W/m}^2$ ).

Comme précédemment en absence de molécules scavengers (Chapitre 4 I 3.1), 100  $\mu\text{L}$  des suspensions sont additionnés à 100  $\mu\text{L}$  de luminol  $10^{-2}$  M (Sigma Aldrich) et à 100  $\mu\text{L}$  de carbonate de sodium anhydre 1,0 M (Merck) afin de réaliser la mesure de CL.

**Tableau 27** Caractéristiques des deux molécules scavengers d'O<sub>2</sub><sup>•-</sup> utilisées dans le cadre de cette étude avec leur concentration finale dans le puits

Nom	Formule chimique Masse molaire	Référence	Formule et n° CAS	Concentrations testées
<b>Tiron</b> (Disodium pyrocatechol-3,5-disulfonate) 333,334	C <sub>6</sub> H <sub>6</sub> Na <sub>2</sub> O <sub>9</sub> S <sub>2</sub> 322,22 g/mol	ALDRICH EEC N°205715	 149-45-1	<b>20 mM</b>
<b>Superoxyde Dismutase bovine</b> <sup>335</sup>	Masse moléculaire : 32,5 kDa	S7571 SIGMA- ALDRICH	x 9054-89-1	<b>10 U</b> <b>100 U</b> <b>500 U</b> <b>1000 U</b>

### 4.3. Dénombrements sur milieux gélosés après ajout de molécules « scavengers » dans le milieu réactionnel

Après les mesures de RLU par CL, l'effet antibactérien obtenu dans les différentes conditions opératoires est évalué à l'aide de la technique de dénombrement sur milieux gélosés. Ainsi 100 µL des différentes suspensions bactériennes (sans TiO<sub>2</sub>, avec TiO<sub>2</sub>, avec TiO<sub>2</sub> + SOD) ayant été – ou non – soumis à irradiation sont étalés en surface sur gélose TS agar. Pour cette étude, seule la concentration en TiO<sub>2</sub> de 0,1 g/L a été utilisée car pour les autres concentrations nous arrivons à la limite supérieure de la détection des RLU produits.

## 5. Suivi de CL en absence de microorganisme

### 5.1. En absence de molécules scavengers

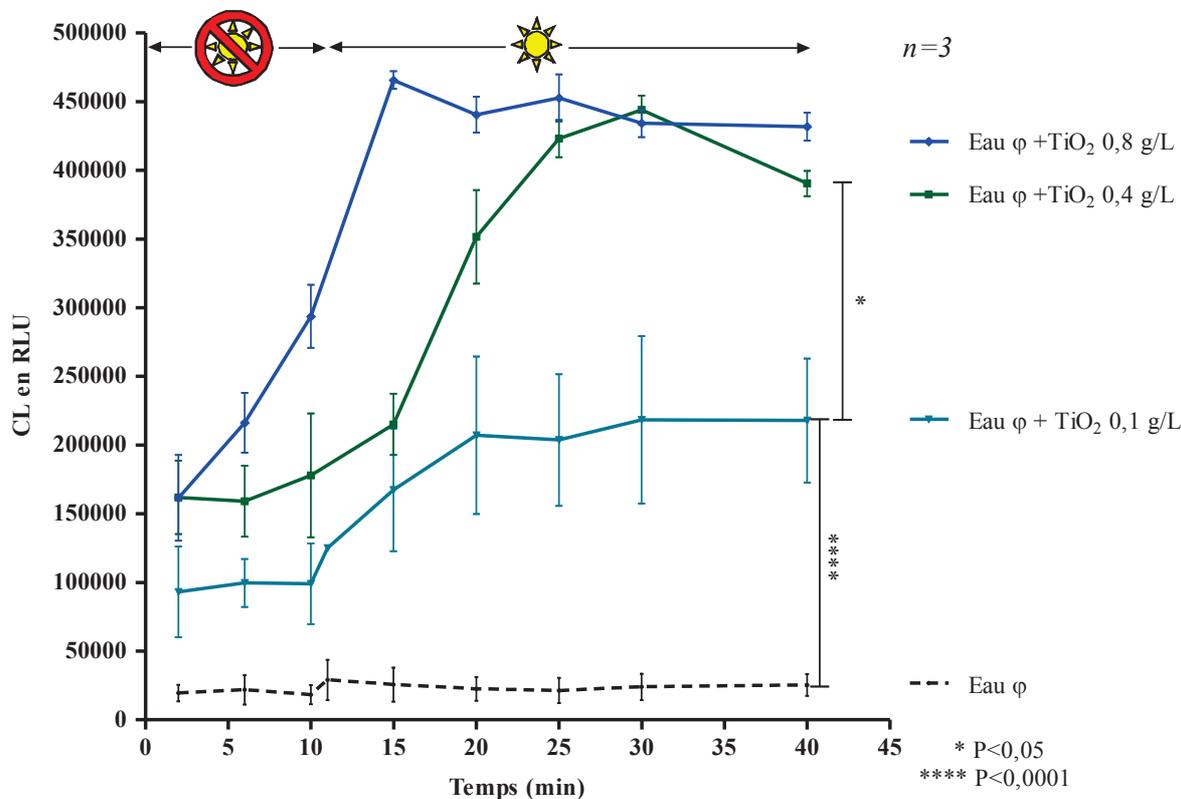


Figure 75 Influence de la concentration en  $\text{TiO}_2$  (0 ; 0,1 ; 0,4 et 0,8 g/L) dans de l'eau  $\phi$  en absence de rayonnement et sous rayonnement UV-A de  $30 \text{ W/m}^2$  sur l'émission de CL au cours du temps. Analyse statistique test  $t$  de Student avec \* $P < 0,05$  et \*\*\*\* $P < 0,0001$ .

La figure 75 présente l'influence de la concentration en  $\text{TiO}_2$  (0 ; 0,1 ; 0,4 et 0,8 g/L) sur l'évolution de la CL en RLU en fonction du temps, en absence de rayonnement UV-A et sous rayonnement UV-A avec une irradiance de  $30 \text{ W/m}^2$ . Nous remarquons qu' :

- en **absence** de rayonnement (soit de  $t_0$  à  $t_{10}$  inclu) :
  - la CL enregistrée (eau  $\phi$ ) est très faible en absence de  $\text{TiO}_2$ , le signal de base est aux alentours de 20 000 RLU
  - en présence de  $\text{TiO}_2$  à 0,1 g/L, 0,4 g/L et 0,8 g/L la CL à  $t_0$  est respectivement de l'ordre de 90 000 ; 160 000 et 160 000 RLU et augmente respectivement à  $t_{10}$  à 100 000 ; 180 000 et 290 000 RLU
- en **présence** de rayonnement (à partir de  $t_{10}$  jusqu'à  $t_{40}$ ) :
  - le signal de base de la CL (eau  $\phi$ ) est identique, aux alentours de 20 000 RLU, en absence de  $\text{TiO}_2$
  - en présence de  $\text{TiO}_2$ , on observe une augmentation de la quantité de radicaux anions superoxydes  $\text{O}_2^{\circ-}$  émis dépendante de la concentration en  $\text{TiO}_2$ . On obtient des valeurs moyennes de CL de l'ordre de 200 000 ; 360 000 ; 450 000 RLU respectivement pour des concentrations en  $\text{TiO}_2$  de 0,1, 0,4 et 0,8 g/L.

Nous pouvons par ailleurs constater que cette augmentation de CL est plus importante après les 10 - 15 premières minutes d'exposition au rayonnement UV-A puis le signal de CL se stabilise. Si l'on se base sur les deux derniers temps de prises d'essai (soit une moyenne sur  $t_{30}$  et  $t_{40}$ ), le signal de CL est relativement stable et il est de l'ordre de 220 000 ; 420 000 ; 430 000 RLU respectivement en présence de  $\text{TiO}_2$  à 0,1 ; 0,4 et 0,8 g/L.

*Pour les graphiques suivants de suivi de CL, les résultats des différentes conditions seront comparés pour ce temps ( $t_{40}$ ), étant donné que ce temps correspond en réalité à une exposition au rayonnement de 30 min et qu'une durée de 30 min a aussi été choisie pour l'analyse protéomique.*

***Notons également que ce sont bien les radicaux anions superoxydes  $\text{O}_2^{\circ-}$  qui sont détectés lors de ce suivi de CL en présence de  $\text{TiO}_2$  puisque lors de l'ajout de molécule scavenger spécifique d' $\text{O}_2^{\circ-}$  (Chapitre 4 I.5.1), le signal de CL est similaire au signal de base (signal recueilli avec l'eau  $\phi$ ).***

Nous remarquons que même en absence de rayonnement UV-A, des radicaux anions superoxydes  $\text{O}_2^{\circ-}$  sont générés en présence de  $\text{TiO}_2$  et ce de manière non négligeable puisque nous avons obtenu un signal moyen de CL avec le  $\text{TiO}_2$  à 0,8 g/L d'environ 220 000 RLU.

En revanche, dès l'exposition au rayonnement UV-A et ce quelles que soient les concentrations en  $\text{TiO}_2$ , **nous avons au moins un doublement de la quantité de CL mesurée par rapport aux valeurs obtenues sans rayonnement UV-A artificiel.** Il est tout à fait logique d'observer cette augmentation de CL sous rayonnement étant donné que des radicaux anions superoxydes  $\text{O}_2^{\circ-}$  sont générés à la surface de  $\text{TiO}_2$  irradié et vont oxyder le lumino1, traduisant ainsi une augmentation significative de CL.

Nous pouvons constater également qu'il y a une augmentation de la quantité de ROS émis dans le milieu rapidement après exposition au rayonnement. Cette augmentation est très brusque surtout dans le cas de la concentration en  $\text{TiO}_2$  la plus élevée, soit 0,8 g/L, puisque nous passons d'une valeur de CL à  $t_{10}$  de 290 000 RLU à 470 000 RLU pour  $t_{15}$  (limite de détection supérieure des RLU).

La stabilité des valeurs de CL pour les dernières mesures de CL met en évidence la stabilité de la production des radicaux anions superoxydes  $\text{O}_2^{\circ-}$ . Ainsi après un certains temps de mise sous rayonnement, la même quantité de ROS est émise, ce qui met en évidence les propriétés « catalytiques » du  $\text{TiO}_2$ .

Les écarts types observés lors du suivi de RLU sont parfois assez importants. Différents paramètres peuvent expliquer cette variabilité :

- bien que le volume réactionnel soit homogénéisé avec un agitateur orbitalaire, l'agitation ne peut pas être optimale entraînant par conséquence une répartition non totalement homogène des particules agrégées de  $\text{TiO}_2$  dans le réacteur
- des valeurs au-delà de 100 000 RLU sont moins précises sur cet appareil. C'est pourquoi nous avons donc sélectionné pour la suite des travaux de CL, la concentration en  $\text{TiO}_2$  de 0,1 g/L (concentration en  $\text{TiO}_2$  la plus faible utilisée).

Pour des concentrations en  $\text{TiO}_2$  de 0,4 et 0,8 g/L, les mêmes valeurs de RLU ont été obtenues, cela ne signifie cependant pas nécessairement que la même quantité de radicaux anions superoxydes  $\text{O}_2^{\circ-}$  a été générée. En effet, il faut tenir compte du fait que l'appareil sature à environ 500 000 RLU correspondant à une valeur déjà enregistrée pour une concentration en  $\text{TiO}_2$  de 0,4 g/L, l'appareil étant déjà en saturation ou tout du moins donnant un signal proche de la saturation.

Nous ne pouvons pas exclure le fait qu'il puisse y avoir une oxydation photocatalytique du luminol, qui diminuerait la quantité de luminol disponible pour la CL. Si tel est le cas, le luminol étant apporté en excès, cette réaction d'oxydation photocatalytique aurait un effet minime sur le signal de CL qui est proche de la saturation pour une concentration en  $\text{TiO}_2$  de 0,4 g/L.

## **5.2. Efficacité de différentes molécules scavengers pour le piégeage des radicaux anions superoxydes $\text{O}_2^{\circ-}$**

Dans le but *in fine* d'évaluer le rôle d' $\text{O}_2^{\circ-}$  dans l'effet antibactérien, nous avons testé différentes molécules scavengers spécifiques d' $\text{O}_2^{\circ-}$  à savoir le tiron et la SOD.

D'une manière générale, l'efficacité de piégeage des radicaux anions superoxydes  $\text{O}_2^{\circ-}$  se traduira ici par une diminution significative de la CL obtenue en présence de  $\text{TiO}_2$  et de molécules scavengers comparée à la CL enregistrée en présence de  $\text{TiO}_2$  mais en absence de molécule scavenger.

1) Le tiron (200 mM)

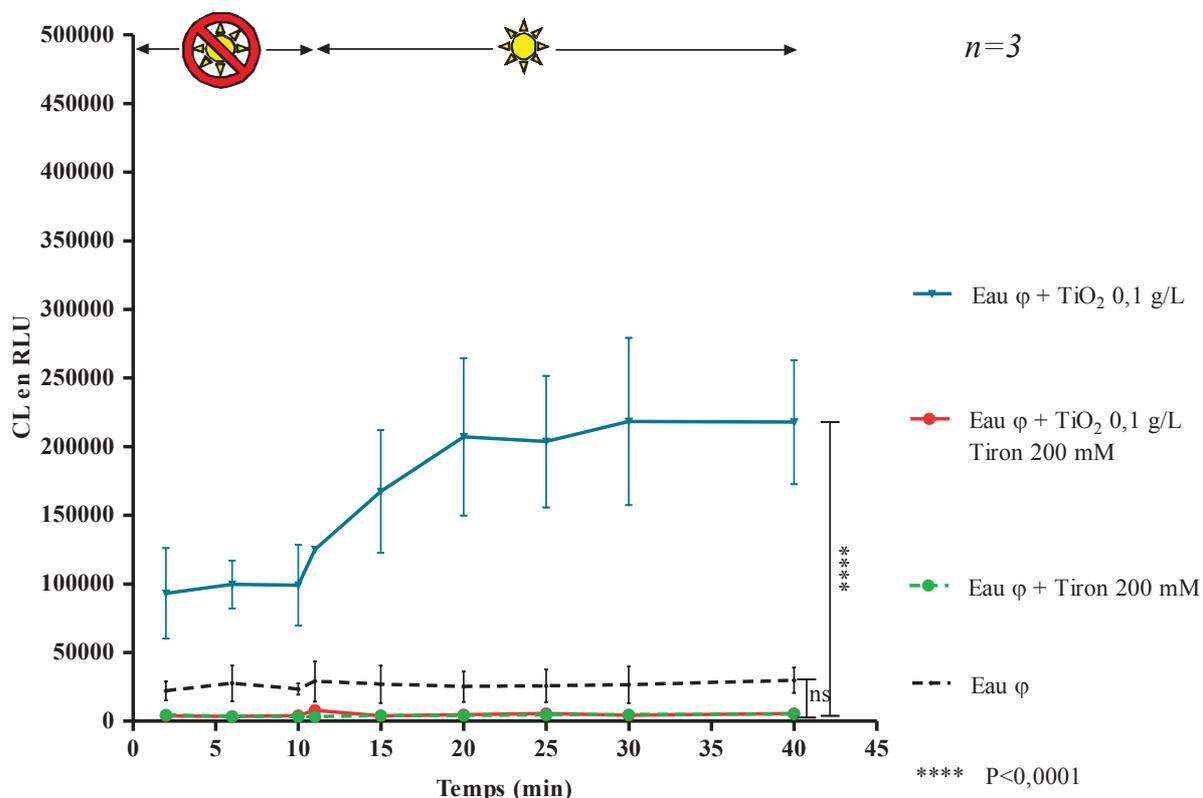


Figure 76 Effet du tiron (200 mM) sur l'émission de CL au cours du temps en présence de TiO<sub>2</sub> à 0,1 g/L sans rayonnement  et sous rayonnement UV-A de 30 W/m<sup>2</sup>  Analyse statistique test *t* de Student avec \*\*\*\*P<0,0001.

Le tiron est une molécule scavenger de l'anion superoxyde O<sub>2</sub><sup>•-</sup>. Une addition de tiron (200 mM) en présence de TiO<sub>2</sub> à 0,1 g/L que ce soit en **absence** ou en **présence** de rayonnement, induit une inhibition complète du signal de CL. En effet, la CL mesurée en présence de TiO<sub>2</sub> à 0,1 g/L et de tiron est très faible, son maximum est de 8 000 RLU, soit une CL encore plus faible que celle observée en présence d'eau φ. Cependant, le tiron est également utilisé pour doser le Titane (IV) dans une gamme de pH entre 1 et 6: ils forment ensemble un complexe jaune (figure 81) dont on peut mesurer l'absorbance.<sup>341,342,343</sup> Ainsi, la formation en surface du complexe Ti<sup>4+</sup>-tiron pourrait inactiver TiO<sub>2</sub>. Il paraît alors difficile avec cette molécule scavenger de conclure quant à l'implication de l'anion superoxyde O<sub>2</sub><sup>•-</sup> dans la CL.

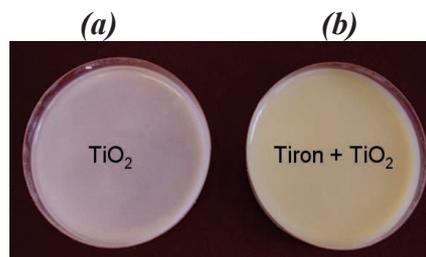


Figure 77 Photographie du puits avec TiO<sub>2</sub> 0,1 g/L (a) et avec TiO<sub>2</sub> 0,1 g/L avec du tiron : formation d'un complexe jaune Ti<sup>4+</sup>-tiron (b)

<sup>341</sup> Aubrey E, Harvey J, Delmar LM: **Spectrophotometric Studies of Empirical Formulas of Complex Ions.** *Journal of the American Chemical Society* 1952, **74**(19):4744-4746.

<sup>342</sup> Dolcater DL, Syers JK, Jackson ML: **Titanium as free oxide and substituted forms in kaolinites and other soil minerals.** *Clays and Clay minerals* 1970, **78**:71-79.

<sup>343</sup> Oates PM, Harvey CF: **A colorimetric reaction to quantify fluid mixing** *Experiments in fluids* 2006, **41**:673-683.

2) La superoxyde dismutase (SOD) (10 U, 100 U et 500 U)

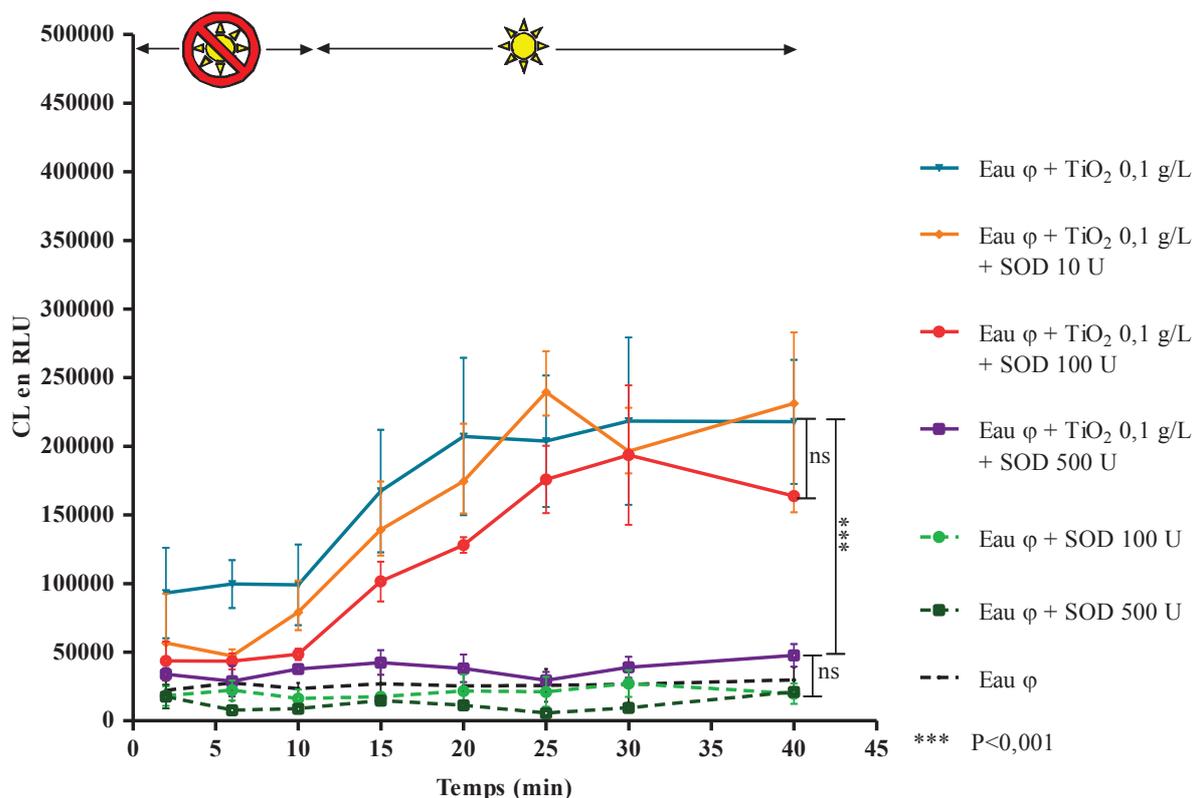


Figure 78 Effet de la SOD (10 U, 100 U et 500 U) sur l'émission de CL au cours du temps en présence de TiO<sub>2</sub> à 0,1 g/L sans rayonnement  et sous rayonnement UV-A de 30 W/m<sup>2</sup>  Analyse statistique test *t* de Student avec \*\*\*P<0,001.

Dans ce cas, l'étude a été réalisée en présence de TiO<sub>2</sub> à 0,1 g/L avec différentes doses de SOD (10 U, 100 U et 500 U) (figure 78). Nous remarquons qu' :

- en **absence** de rayonnement :
  - le signal de CL témoin obtenu pour les puits contenant la SOD seule (100 U et 500 U) est très faible. Le maximum obtenu est de 20 000 RLU et il correspond approximativement au signal de CL obtenu pour l'eau φ
  - en présence de TiO<sub>2</sub> et de SOD, le fait d'ajouter de la SOD entraîne une diminution du signal de RLU. Nous pouvons également observer que plus la dose de SOD est élevée plus le signal de CL est faible.
- en **présence** de rayonnement :
  - seule la dose de SOD à 500 U en présence de TiO<sub>2</sub> s'est révélée être efficace pour inhiber complètement le signal de CL. En effet, à t<sub>40</sub>, la CL du TiO<sub>2</sub> est de 220 000 RLU et un ajout de SOD à 500 U permet une réduction de la CL à environ 50 000 RLU (50 000 RLU équivalent au signal de base de l'eau φ). En effet, pour des doses plus faibles en SOD comme 10 U nous n'observons pas de diminution significative de CL en comparaison avec le puits avec TiO<sub>2</sub> à 0,1 g/L. Pour une dose en SOD de 100 U et plus particulièrement pour les mesures réalisées à partir de t<sub>10</sub> et jusqu'à t<sub>20</sub>, la diminution de CL est très faible en comparaison avec le puits avec TiO<sub>2</sub> à 0,1 g/L, mais au delà de ces temps de

mesures, la différence n'est plus significative traduisant ainsi que le piégeage des radicaux anions superoxydes  $O_2^{\circ-}$  avec cette dose de SOD n'est que partiel. En somme, de faibles doses de SOD, ne sont pas suffisantes pour piéger tous les radicaux anions superoxydes  $O_2^{\circ-}$  émis dans le milieu lors de l'irradiation du  $TiO_2$  et seule la dose de SOD à 500 U utilisée permet de les piéger efficacement en totalité. Il est également possible qu'à très faible dose (10 U), une possible oxydation photocatalytique de la SOD adsorbé sur  $TiO_2$  ne soit plus négligeable car la SOD n'est alors pas présente en large excès.

### 3) Conclusion sur l'efficacité de différentes molécules scavengers pour le piégeage des radicaux anions superoxydes $O_2^{\circ-}$

Les deux molécules scavengers utilisées pour le piégeage des radicaux anions superoxydes  $O_2^{\circ-}$  ont été efficaces, puisque dans les deux cas l'addition de ces molécules a permis de réduire considérablement le signal de CL mesuré en présence de  $TiO_2$  à 0,1 g/L par rapport à celui recueilli sans molécule scavenger. Cependant, il est important de considérer que dans le cas du tiron, la formation en surface du  $TiO_2$  du complexe  $Ti^{4+}$ -tiron de couleur jaune interfère dans les analyses sur le rôle d' $O_2^{\circ-}$ . Nous avons donc sélectionné par la suite la seconde molécule scavenger : la SOD. Cette première étude réalisée en absence de microorganisme a permis de montrer que la SOD est efficace pour piéger  $O_2^{\circ-}$  en totalité mais seulement dans le cas de l'ajout d'une dose élevée en SOD (ici 500 U). De ce fait, dans la suite des travaux, réalisée en présence de bactéries, nous sélectionnerons au minimum une dose de 500 U.

Bien que cette enzyme soit efficace pour piéger les radicaux anions superoxydes  $O_2^{\circ-}$ , il n'est pas exclu que cette dernière soit légèrement dégradée lors de l'action photocatalytique par d'autres espèces oxydantes comme le radical hydroxyle  $OH^{\circ}$ , le peroxyde d'hydrogène ou l'oxygène singulet.<sup>344</sup> Cependant si celle-ci n'était plus totalement fonctionnelle ou plus présente en quantité suffisante, elle ne pourrait plus diminuer le signal de CL émis en présence de  $TiO_2$  (le signal de CL en présence de SOD à 500 U étant équivalent au signal recueilli pour l'eau  $\phi$ ). De ce fait, même s'il y a une dégradation de l'enzyme par les ROS (autres qu' $O_2^{\circ-}$ ) est sans conséquence apparente dans le cas de l'utilisation de doses élevées en SOD.

De manière analogue, des suivis de CL en présence de  $TiO_2$  (irradié ou non) ont été réalisés avec deux molécules scavengers du radical hydroxyle  $OH^{\circ}$  (mannitol à 10 mM et l'urée à 10 mM et 100 mM) et avec une molécule scavenger de l'oxygène singulet  $^1O_2$  (l'histidine 5 mM). Cependant les résultats n'étaient pas concluants du fait de la courte durée de vie de ces radicaux. Par cette technique de CL couplée à l'utilisation de molécule scavenger, seule le suivi de production des radicaux anions superoxydes  $O_2^{\circ-}$  a été réalisable.

---

<sup>344</sup> Escobar JA, Rubio MA, Lissi EA: **Sod and catalase inactivation by singlet oxygen and peroxy radicals.** *Free radical biology & medicine* 1996, **20**(3):285-290.

## **6. Suivi de CL en présence de microorganismes et de SOD et d'O<sub>2</sub><sup>°-</sup> dans l'effet antibactérien de la photocatalyse sur TiO<sub>2</sub>**

### **6.1. Suivi de CL en présence de différentes doses de SOD lors de la photocatalyse appliquée à la dégradation de différentes espèces bactériennes**

Lors de cette étude, nous avons suivi l'émission d'O<sub>2</sub><sup>°-</sup> par CL lors de la photocatalyse appliquée à la dégradation de trois espèces bactériennes (*P.aeruginosa*, *E.coli* et *S.aureus*). Pour cela, un suivi de CL sur 60 min d'exposition au rayonnement UV-A (irradiance de 30 W/m<sup>2</sup>) avec des prises d'essai toutes les 15 min, a été réalisé en absence de TiO<sub>2</sub> et avec une concentration en TiO<sub>2</sub> de 0,1 g/L en présence ou non de différentes concentrations de SOD avec un inoculum initial de 10<sup>7</sup> UFC/mL (*P.aeruginosa* (figure 79 (a)), *E.coli* (figure 79 (b)) et *S.aureus* (figure 79 (c))).

Le signal de CL émis en absence de TiO<sub>2</sub> (□) varie entre 15 000 RLU et 35 000 RLU. Il est très faible, ce qui signifie ainsi que peu de ROS sont émis dans le milieu.

En revanche, l'ajout de TiO<sub>2</sub> à 0,1 g/L (sous rayonnement UV-A) induit une augmentation très significative du signal de CL en présence des bactéries. En effet pour *P.aeruginosa*, l'ajout de TiO<sub>2</sub> induit une augmentation quasi linéaire du signal de CL en fonction du temps jusqu'à atteindre un signal de CL de l'ordre de 100 000 RLU à t<sub>60</sub>; pour *E.coli*, le maximum de CL qui est de l'ordre de 170 000 RLU est obtenu dès t<sub>15</sub>, puis ce signal se stabilise jusqu'à t<sub>60</sub>; enfin pour *S.aureus*, nous pouvons observer une augmentation du CL quasi linéaire en fonction du temps jusqu'à atteindre un maximum de 140 000 RLU à t<sub>60</sub>. Ces augmentations importantes de CL en présence de TiO<sub>2</sub> sous rayonnement UV-A sont tout à fait logiques étant donné que plus la concentration en TiO<sub>2</sub> augmente, plus il y a d'O<sub>2</sub><sup>°-</sup> générés dans nos conditions (c'est le cas aussi d'autres ROS comme les radicaux hydroxyles mais cette technique ne nous permet pas de les identifier).<sup>345</sup>

Pour mettre en évidence l'implication d'O<sub>2</sub><sup>°-</sup>, différentes doses de SOD ont été ajoutées : 500 U à t<sub>0</sub>; 500 U à t<sub>0</sub> + 500 U à t<sub>30</sub>; 1000 U à t<sub>0</sub>. Le suivi de CL a été évalué comme précédemment.

<sup>345</sup> Mills A, Le Hunte S, An overview of semiconductor photocatalysis, *Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry* 1997, **108**:1-35

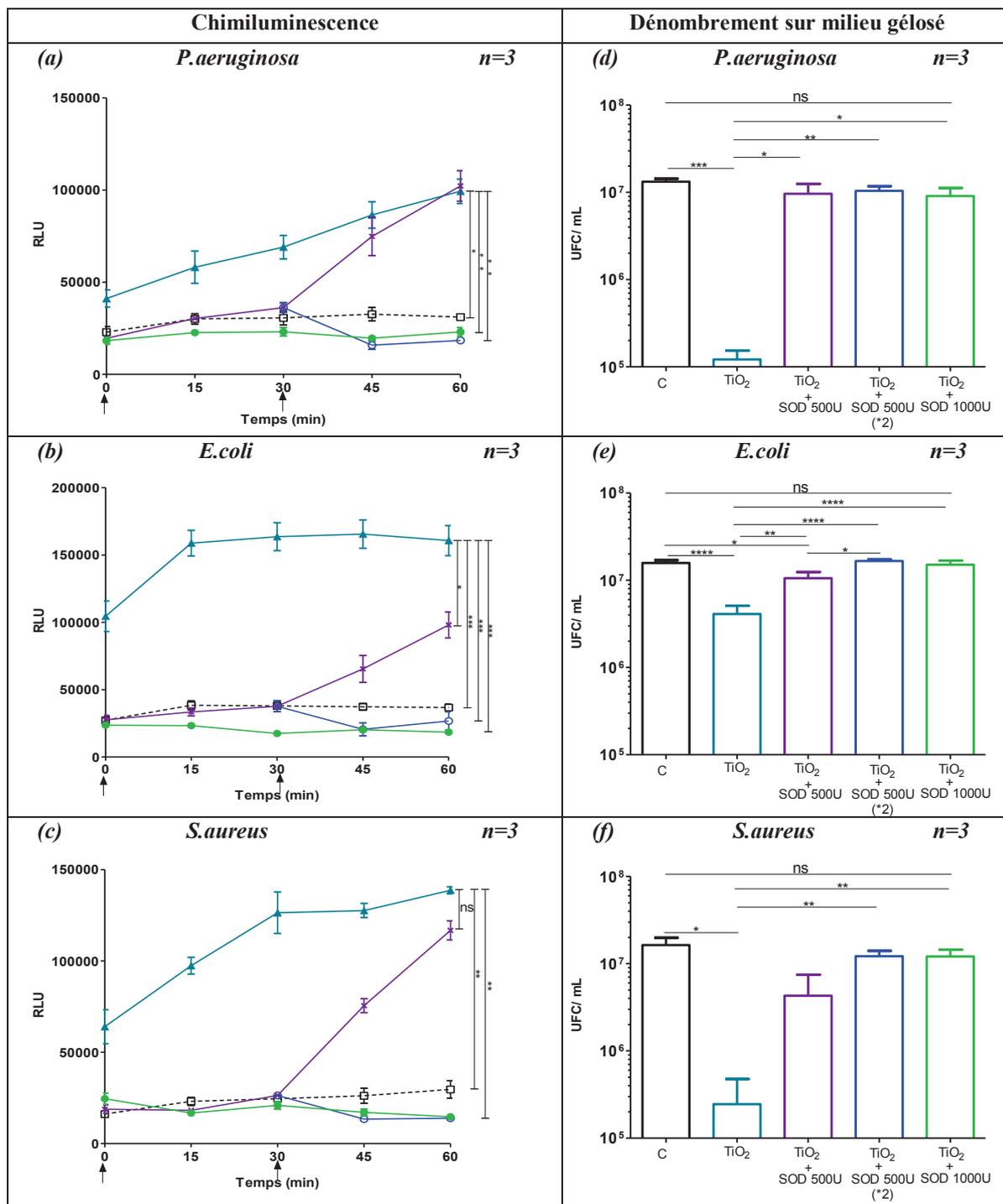


Figure 79 (gauche) Signal de CL en RLU mesuré sur 60 min d'exposition au rayonnement UV-A à 30 W/m<sup>2</sup> en présence de *P.aeruginosa* (a), *E.coli* (b) et *S.aureus* (c) (inoculum initial de 10<sup>7</sup> UFC/mL), avec 0,1 g/L de TiO<sub>2</sub> (▲) ou sans TiO<sub>2</sub> (□). Effet de l'addition de différentes unités de SOD (↑): SOD à 500 U à t<sub>0</sub> (x), SOD à 500 U à t<sub>0</sub> + SOD à 500 U à t<sub>30</sub> (○) ; SOD à 1000 U à t<sub>0</sub> (●).

(droite) Effet de l'addition de SOD à différentes concentrations sur la survie bactérienne de *P.aeruginosa* (d), *E.coli* (e) et *S.aureus* (f) après traitement photocatalytique de 60 min en présence de TiO<sub>2</sub> à 0,1 g/L.

Analyse statistique test *t* de Student avec ns : non significatif ; \*P<0,05 ; \*\*P<0,01 ; \*\*\*P<0,001 et \*\*\*\*P<0,0001

### **Effet d'une dose unique de SOD 500 U ajoutée à t<sub>0</sub>**

Nous remarquons que jusqu'à t<sub>30</sub>, la SOD est efficace pour induire une inhibition totale du signal de RLU (signal équivalent au signal de base avec un maximum de RLU de l'ordre de 40 000) ; en revanche au-delà de t<sub>30</sub>, nous pouvons observer que dans le cas de *P.aeruginosa* et *S.aureus*, le signal de RLU augmente brutalement jusqu'à atteindre pour t<sub>60</sub> un signal de CL similaire à celui obtenu en absence de SOD (soit le signal de CL du TiO<sub>2</sub> + bactérie). En effet pour *P.aeruginosa* et *S.aureus* à t<sub>60</sub>, le signal de CL en présence de SOD 500 U est respectivement de 100 000 RLU et de 120 000 RLU tandis qu'il était respectivement pour ces bactéries de 100 000 RLU et 140000 RLU en absence de SOD à t<sub>60</sub>. Dans le cas d'*E.coli*, entre t<sub>30</sub> et t<sub>60</sub> en présence de SOD 500 U, le signal augmente aussi rapidement puisqu'il passe de 40 000 RLU à t<sub>30</sub>, à 100 000 RLU à t<sub>60</sub>. Il reste cependant encore inférieur à celui obtenu sans SOD, mais nous pouvons supposer que si l'on prolongeait la durée d'exposition au rayonnement, le signal de CL mesuré en présence de SOD atteindrait celui obtenu sans SOD.

*Nous devons garder à l'esprit lors de l'étude de la peroxydation lipidique chez E.coli que la SOD à 500 U est toujours efficace au bout de 60 min d'irradiation pour piéger en partie les radicaux anions superoxydes O<sub>2</sub><sup>•-</sup>.*

Ainsi au-delà de 30 min de rayonnement, il s'avère que la SOD chez *P.aeruginosa* et *S.aureus* n'est plus efficace pour piéger les radicaux anions superoxydes O<sub>2</sub><sup>•-</sup> générés au cours de la réaction photocatalytique. Cette diminution de l'efficacité de piégeage de la SOD envers les radicaux anions superoxydes O<sub>2</sub><sup>•-</sup> soutient l'hypothèse selon laquelle, la SOD n'est plus en excès face aux ROS générées. L'exposition au rayonnement UV-A et la forte production continue (200 000 RLU) des radicaux anions superoxydes O<sub>2</sub><sup>•-</sup> conduiraient à une diminution de l'activité de la SOD au cours du temps.

### **Effet de l'ajout d'une seconde dose de SOD 500 U ajoutée à t<sub>30</sub>**

C'est pourquoi afin de continuer à piéger O<sub>2</sub><sup>•-</sup>, une seconde dose de SOD à 500 U a été ajoutée à t<sub>30</sub> (○). Pour les trois bactéries, l'ajout d'une seconde dose de SOD a permis une inhibition totale du signal de CL sur toute la durée du test (signal de CL similaire au signal de base obtenu pour les bactéries seules).

### **Effet de l'ajout d'une dose unique de SOD 1000 U ajoutée à t<sub>0</sub>**

La troisième dose de SOD testée est celle de 1000 U qui a été ajoutée à t<sub>0</sub> (●). Nous pouvons constater qu'avec cette dose plus forte, le signal de CL est similaire au signal de base mesuré en présence de bactéries seules sur toute la durée du test, indiquant qu'une augmentation de la SOD à 1000 U permet cette fois un piégeage efficace d'O<sub>2</sub><sup>•-</sup> durant les 60 min de test.

### **Effet de l'ajout d'une suspension bactérienne sur le signal de CL recueilli en présence de TiO<sub>2</sub>**

Les signaux de CL mesurés en présence de TiO<sub>2</sub> à 0,1 g/L sont toujours plus faibles en présence de bactéries (figure 79 (a), (b), (c)) comparées à ceux obtenus en absence de microorganismes (figure 75). En effet, en présence de bactéries, le signal de CL est au

maximum de l'ordre de 150 000 RLU (figure 79 (a), (b), (c)) alors qu'en absence de bactéries, le signal de CL est en moyenne de 200 000 RLU (figure 75). Les bactéries étant dotées de mécanisme de défense oxydatif comme la SOD ou la catalase (qui piège spécifiquement  $H_2O_2$ ), dès lors il n'est pas surprenant de constater un signal de CL légèrement plus faible dans les systèmes où les bactéries sont présentes.

## 6.2. Implication du radical anion superoxyde $O_2^{\circ-}$ dans l'effet bactéricide de la photocatalyse sur $TiO_2$

Suite à la mise en évidence de la production d' $O_2^{\circ-}$ , nous avons voulu voir si celui-ci était responsable de l'effet antimicrobien.

Cette implication des radicaux  $O_2^{\circ-}$  dans l'effet bactéricide a été évaluée à l'aide de l'ajout de SOD lors de la réaction photocatalytique, envers les trois microorganismes, *P.aeruginosa*, d'*E.coli* ou de *S.aureus*, par la **technique de dénombrement sur milieux gélosés**. Ainsi après suivis de CL pendant 60 min sous irradiance UV-A de  $30 W/m^2$ , un aliquot de chaque puits (100  $\mu L$ ) a été étalé sur milieux gélosés TS. Les résultats du dénombrement pour *P.aeruginosa*, *E.coli* et *S.aureus* sont présentés respectivement en figures 79 (d), (e) et (f).

Si l'on s'intéresse aux résultats du dénombrement obtenus pour les bactéries seules, après exposition de 60 min sous rayonnement UV-A, nous constatons que pour les trois bactéries, l'inoculum initial est retrouvé, soit de l'ordre de  $10^7$  UFC/mL. Dans ces conditions, une dose de rayonnement UV-A de 60 min n'influe pas sur la viabilité cellulaire de ces microorganismes.

En revanche, l'ajout de  $TiO_2$  à 0,1 g/L en présence de rayonnement UV-A, a induit une diminution de la viabilité cellulaire. En effet, nous passons respectivement pour *P.aeruginosa*, *E.coli* et *S.aureus*, de  $1,33 \cdot 10^7$  UFC/mL sans  $TiO_2$  à  $1,21 \cdot 10^5$  UFC/mL avec  $TiO_2$ , de  $1,58 \cdot 10^7$  UFC/mL à  $4,11 \cdot 10^6$  UFC/mL et de  $1,63 \cdot 10^7$  UFC/mL à  $2,45 \cdot 10^5$  UFC/mL.

Toutefois, l'ajout de différentes doses de SOD au cours du traitement photocatalytique a permis une restauration progressive et complète de la viabilité cellulaire. **En effet, plus la dose de SOD ajoutée est importante, meilleure est la restauration de la viabilité cellulaire.** Ainsi, respectivement pour *P.aeruginosa*, *E.coli* et *S.aureus*, l'ajout d'une unique dose de SOD à 500 U à  $t_0$  a permis une augmentation significative de la viabilité cellulaire de  $1,21 \cdot 10^5$  UFC/mL (avec  $TiO_2$  sans SOD) à  $9,63 \cdot 10^6$  UFC/mL (avec  $TiO_2$  avec SOD), de  $4,11 \cdot 10^6$  UFC/mL à  $1,06 \cdot 10^7$  UFC/mL et de  $2,45 \cdot 10^5$  UFC/mL à  $4,29 \cdot 10^6$  UFC/mL. Notons que pour *P.aeruginosa* dès l'ajout d'une unique dose de SOD à 500 U, la viabilité cellulaire est totalement restaurée étant donné qu'il n'y a pas de différence significative avec les dénombrements pour les bactéries seules. L'ajout d'une seconde dose de SOD à 500 U à  $t_{30}$  a permis une restauration totale de la viabilité cellulaire pour *E.coli* et *S.aureus*. Il en est de même avec l'ajout d'une unique dose de SOD à 1000 U à  $t_0$ : la viabilité cellulaire est totalement restaurée pour les trois espèces bactériennes.

Cette restauration complète de la viabilité cellulaire en présence des plus fortes doses de SOD testées peut s'expliquer par le piégeage des radicaux anions superoxydes  $O_2^{\circ-}$  par la SOD.

Ainsi, nous proposons que dans notre cas le principal ROS **impliqué dans l'effet bactéricide est le radical anion superoxyde  $O_2^{\circ-}$** .

En effet, en inhibant complètement la formation de radicaux anions superoxydes  $O_2^{\circ-}$ , nous avons une restauration complète de la viabilité cellulaire. Ceci nous montre que si le radical anion superoxyde  $O_2^{\circ-}$  n'est bien évidemment pas le seul ROS produit à la surface de  $TiO_2$ , dans nos conditions réactionnelles, c'est bien par contre le **principal ROS impliqué dans l'effet bactéricide** que nous observons chez *E.coli*, *S.aureus* et *P.aeruginosa*.

## **II. Détermination de l'action des ROS sur les lipides**

Après avoir identifié le radical anion superoxyde  $O_2^{\circ-}$  comme le principal ROS impliqué dans l'effet bactéricide photocatalytique, à l'aide de la technique de chimiluminescence couplée au dénombrement sur milieux gélosés, nous nous sommes tournés vers la compréhension des mécanismes régissant cet effet bactéricide. Dans le cadre de cette étude, nous nous sommes intéressés au phénomène de peroxydation lipidique chez *E.coli* au cours de différents traitements.

### **1. La peroxydation lipidique : généralités**

Les membranes phospholipidiques sont principalement composées de répétition de lipides comme les glycérophospholipides avec la phosphatidyléthanolamine, le phosphatidylglycérol...<sup>346</sup> Sous irradiation UV-A, les radicaux formés à la surface de  $TiO_2$  induisent des réactions radicalaires en chaîne : la peroxydation lipidique.<sup>347,348,349</sup> Cette peroxydation lipidique peut modifier la fluidité membranaire et perturber de ce fait différentes fonctions comme le transfert des nutriments, le transfert de signaux<sup>350</sup> ou bien encore l'activité respiratoire.<sup>347</sup> Parmi les produits de peroxydation lipidique, nous pouvons suivre la cinétique de formation des acides carboxyliques avec en particulier l'acide acétique<sup>351</sup> ou l'acide formique ; des cétones ou des aldéhydes comme le malondialdéhyde (MDA).<sup>347,352,353</sup>

Cette peroxydation lipidique est souvent quantifiée en suivant la production de MDA réagissant avec l'acide thiobarbiturique, la condensation de ces deux molécules formant un produit facilement dosable par spectrophotométrie (à 532 nm). L'absorbance mesurée à 532 nm traduit alors la quantité de lipides peroxydés.

Ainsi dans cette partie, ce biomarqueur a été utilisé afin d'évaluer la quantité globale de lipides peroxydés en fonction des conditions. De plus, pour tester l'hypothèse selon laquelle **les radicaux anions superoxydes  $O_2^{\circ-}$**  sont bien impliqués dans les **phénomènes de peroxydation lipidique**, différentes doses de SOD ont été ajoutées lors du traitement photocatalytique.

<sup>346</sup> Gidden J, Denson J, Liyanage R, Ivey DM, Lay JO: **Lipid composition in *Escherichia coli* and *Bacillus subtilis* during growth as determined by MALDI-TOF and TOF/TOF mass spectrometry.** *International Journal of Mass Spectrometry* 2009, **283**:178-184.

<sup>347</sup> Maness P-C, Smolinski S, Blake D, Huang Z, Wolfrum E, Jacoby W: **Bactericidal activity of photocatalytic  $TiO_2$  reaction: toward an understanding of its killing mechanism.** *Applied and environmental microbiology* 1999, **65**(9):4094-4098.

<sup>348</sup> Suwalsky M, Schneider C, Mansilla HD, Kiwi J: **Evidence for the hydration effect at the semiconductor phospholipid-bilayer interface by  $TiO_2$  photocatalysis.** *Journal of Photochemistry and Photobiology B*, 2005, **78**:253-258.

<sup>349</sup> Dalrymple OK, Stefanakos E, Trotz MA, Gowami DY: **A review of the mechanisms and modeling of photocatalytic disinfection.** *Applied Catalysis B: Environmental* 2010, **98**:27-38.

<sup>350</sup> Liu P, Duan W, Wang Q, Li X: **The damage of outer membrane of *Escherichia coli* in the presence of  $TiO_2$  combined with UV light.** *Colloids and surfaces B, Biointerfaces* 2010, **78**(2):171-176.

<sup>351</sup> Pigeot-Remy S, Simonet F, Atlan D, Lazzaroni JC, Guillard C: **Bactericidal efficiency and mode of action: a comparative study of photochemistry and photocatalysis.** *Water research* 2012, **46**(10):3208-3218.

<sup>352</sup> Kiwi J, Nadochenko V: **Evidence for the mechanism of photocatalytic degradation of the bacterial wall membrane at the  $TiO_2$  interface by ATR-FTIR and laser kinetic spectroscopy.** *Langmuir : the ACS journal of surfaces and colloids* 2005, **21**(10):4631-4641.

<sup>353</sup> Sökmen M, Candan F, Sümer Z: **Disinfection of *E.coli* by the Ag- $TiO_2$ /UV system: lipidperoxidation.** *Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry* 2001, **143**:241-244.

## **2. Préparation des tests et modes opératoires**

L'analyse de la peroxydation lipidique a été réalisée à l'aide du kit Oxiselect TBARS Assay kit (Malondialdéhyde Quantitation) (Cell Biolabs, France). Ce kit contient de l'acide thiobarbiturique qui en milieu acide et à chaud se condense avec le MDA pour donner un produit facilement dosable en spectrophotométrie.

Dans le protocole, il est préconisé de travailler avec une population cellulaire de  $1.10^7$  cellules/mL à  $2.10^7$  cellules/mL.<sup>354</sup> Cette population est en fait donnée pour les cellules eucaryotes, or ici il s'agit de procaryotes ; ainsi au cours d'études préliminaires, nous avons constaté que pour avoir un signal de peroxydation significatif il fallait se placer avec une population bactérienne de l'ordre de  $10^{10}$  UFC.

L'analyse de la peroxydation lipidique est en revanche une analyse globale, et nous ne pouvons pas déterminer quel type de lipides est préférentiellement peroxydé lors d'un traitement photocatalytique ou non.

Dans le cadre de cette étude, l'analyse de la peroxydation lipidique, après exposition durant 60 min à  $TiO_2$  (concentrations de 0 ; 0,1 ; 0,4 et 0,8 g/L) sans et avec rayonnement UV-A de  $30 W/m^2$ , a été réalisée pour *E.coli* en suivant le protocole présenté en figure 80.

1500 mL d'*E.coli* en phase exponentielle de croissance de l'ordre de  $10^8$  UFC/mL sont obtenus puis centrifugés. Le culot bactérien est repris dans 150 mL d'eau  $\phi$  afin d'obtenir une population de l'ordre de  $10^9$  UFC/mL.

Pour chaque condition opératoire, afin d'augmenter la population bactérienne, 5 boîtes de Pétri contenant chacune un volume final de 10 mL (soit 50 mL) ont été analysés, ce qui correspond à une population bactérienne analysée de l'ordre de  $5.10^{10}$  UFC. Les compositions ci-après sont données pour une boîte:

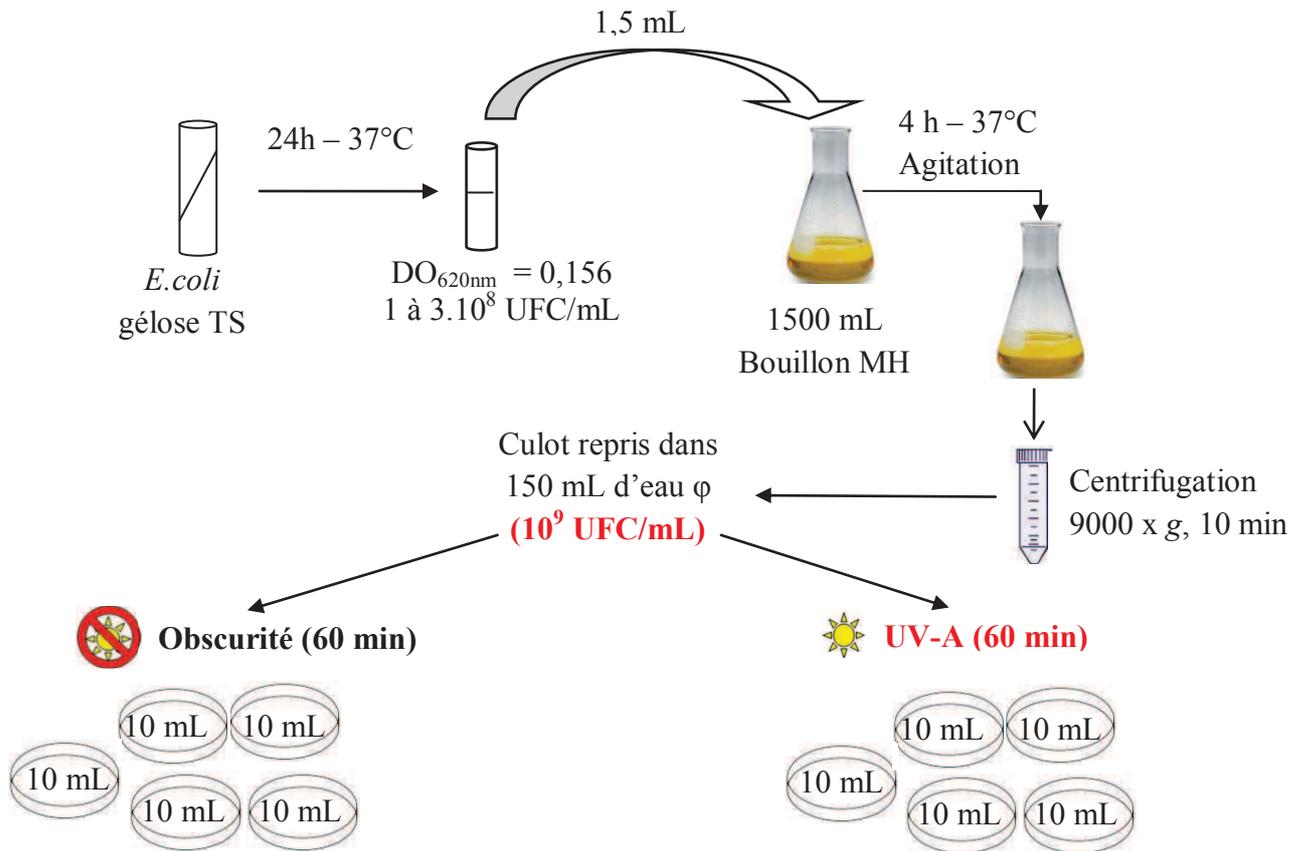
- témoin ou effet du rayonnement:
  - 8,9 mL de la suspension bactérienne à  $10^9$  UFC/mL
  - 1,1 mL d'eau  $\phi$
- effet cytotoxique ou effet photocatalytique du  $TiO_2$ :
  - 8,9 mL de la suspension bactérienne à  $10^9$  UFC/mL
  - 0,1 mL d'eau  $\phi$
  - 1 mL de  $TiO_2$  à 1 ; 4 ou 8 g/L
- effet de l'ajout de SOD à différentes unités lors de la réaction photocatalytique :
  - 8,9 mL de la suspension bactérienne à  $10^9$  UFC/mL
  - 1 mL de  $TiO_2$  à 1 ; 4 ou 8 g/L
  - 0,1 mL de SOD à 10 U/ $\mu$ L dans le cas du test à 1000 U ou 0,05 mL si test avec 500 U

<sup>354</sup> <http://www.cellbiolabs.com/sites/default/files/STA-330-tbars-assay-kit.pdf> consulté le 16 mai 2012.

Les mélanges réactionnels exposés pendant 60 min au rayonnement UV-A (effet du rayonnement, effet photocatalytique du TiO<sub>2</sub> ou effet de l'ajout de SOD à différentes unités) ou conservés à l'obscurité (témoin et effet cytotoxique du TiO<sub>2</sub>) sont repris et centrifugés. Le culot (500 µL) est mis en présence d'1% d'hydroxytoluène butylé (BHT). Le BHT joue un rôle antioxydant prévenant ainsi la formation d'oxydation supplémentaire au cours de l'analyse. Sur ces 500 µl, 2 x 100 µL sont repris et additionnées chacun de 100 µL de Sodium Dodecyl Sulfate (SDS). Le SDS est un détergent anionique qui dénature les protéines. La réaction chimique entre le réactif TBA et le malondialdéhyde se déroule à 95 °C et produit une coloration rose. Après une ultime centrifugation, 100 µL du surnageant sont recueillies et la densité optique est lue à 532 nm à l'aide d'un lecteur de plaque 96 puits.

La quantité de lipides peroxydés pour chaque condition testée a été calculée par rapport à une gamme étalon détaillée dans la fiche technique du fabricant Cell biolabs, France. Cette gamme étalon détermine la quantité de malondialdéhyde produit en µM en fonction de l'absorbance lue à 532 nm.

Chapitre 4 : Compréhension des mécanismes d'oxydation



Composition des 5 boîtes suivant la condition testée (voir page précédente)

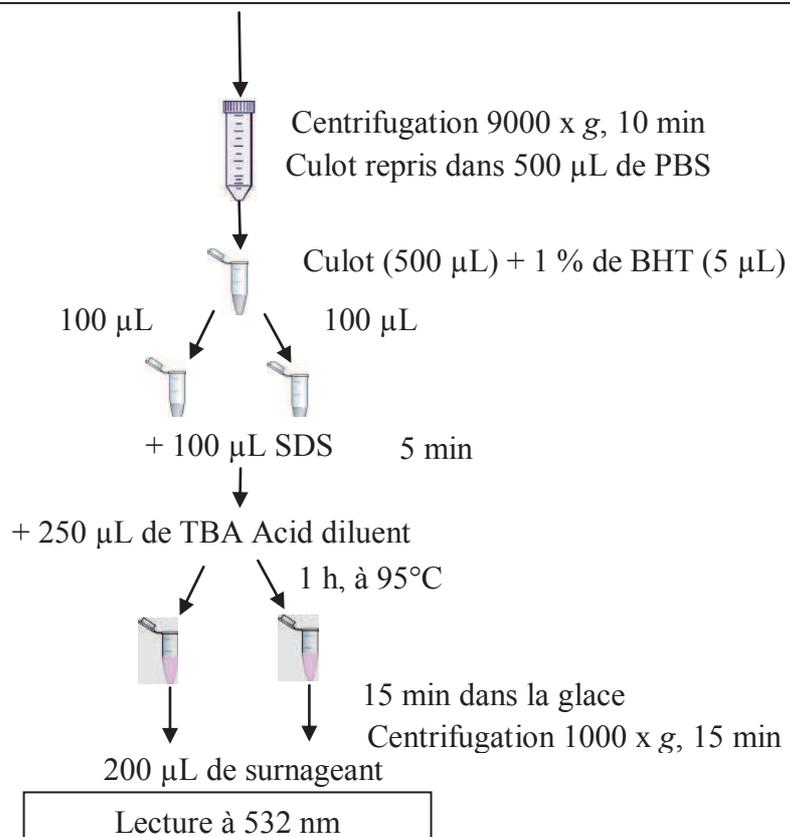
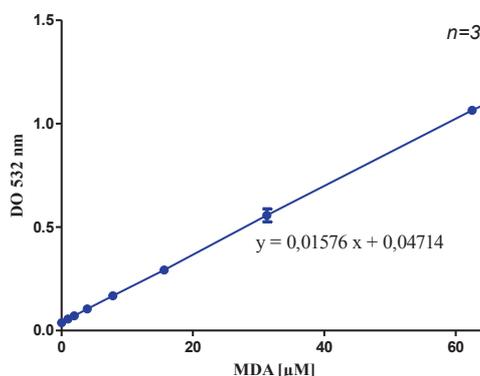


Figure 80 Schéma du protocole de l'évaluation de la peroxydation lipidique

### **3. Implication du radical anion superoxyde $O_2^{\circ-}$ (via l'ajout de SOD) dans les phénomènes de peroxydation lipidique**

En préambule, précisons que la quantité de lipides peroxydés pour chaque condition testée est déterminée à partir d'une droite d'étalonnage déterminant l'absorbance à 532 nm en fonction de la quantité de lipides peroxydés (droite établie à partir des informations du fournisseur du kit « Oxiselect TBARS » par Cell Biolabs) (figure 81).



**Figure 81** Droite d'étalonnage déterminant la Densité Optique mesurée à 532 nm en fonction de la quantité de malondialdéhyde mesurée (en  $\mu\text{M}$ ), établie à partir des données du fabricant Cell biolabs, France

L'histogramme présenté en figure 82 montre **la quantité de lipides peroxydés pour chaque condition testée par rapport à la quantité de lipides peroxydés contrôle**. Cette quantité de lipides peroxydés contrôle correspond à la quantité de lipides mesurée en présence d'une population bactérienne en *E.coli* de l'ordre de  $5 \cdot 10^{10}$  UFC pour la condition témoin, soit sans rayonnement et sans  $\text{TiO}_2$ .

Ainsi, pour la condition contrôle, le ratio quantité de lipides peroxydés/quantité de lipides peroxydés contrôle, sera équivalent à 1.

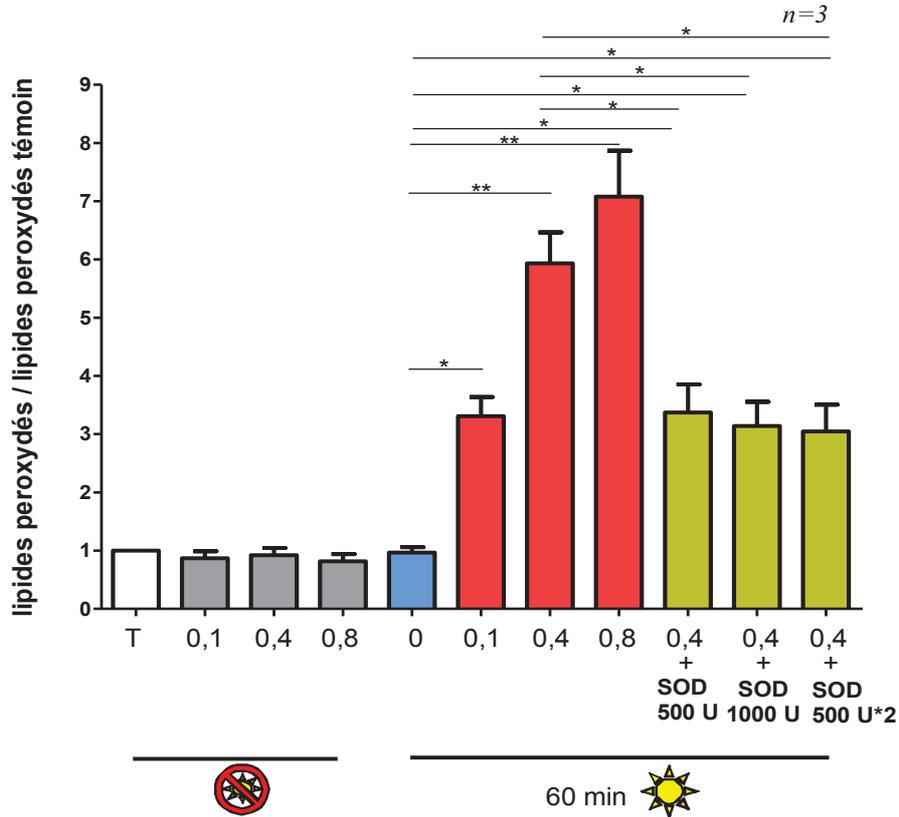


Figure 82 Effet du TiO<sub>2</sub> à différentes concentrations (TiO<sub>2</sub> à 0,1 g/L, 0,4 g/L et 0,8 g/L) en absence de rayonnement et sous rayonnement (60 min), sur la peroxydation lipidique d'une population d'*E.coli* de l'ordre de 5.10<sup>10</sup> UFC.

Influence de la SOD à différentes unités sur la peroxydation lipidique (ajout à t<sub>0</sub> de 500 U, 1000 U et à t<sub>30</sub> de 2x500 U de SOD) pour une concentration en TiO<sub>2</sub> de 0,4 g/L).

Analyse statistique test *t* de Student avec \*P<0,05 et \*\*P<0,01

Après analyse statistique du test *t* de student, à l'aide du logiciel GraphPad Prism, nous avons obtenu les résultats suivants :

#### Effet du rayonnement

Un rayonnement UV-A de 60 min à 30 W/m<sup>2</sup> n'induit pas d'augmentation significative de la quantité de lipides peroxydés par rapport au contrôle.

#### Effet cytotoxique du TiO<sub>2</sub>

Quelle que soit la concentration en TiO<sub>2</sub> (0,1 g/L ; 0,4 g/L et 0,8 g/L), nous n'avons pas observé de modification de la quantité de lipides peroxydés par rapport au contrôle.

#### Effet photocatalytique du TiO<sub>2</sub>

Nous pouvons constater que la quantité de lipides peroxydés augmente de manière proportionnelle avec la quantité de TiO<sub>2</sub> testée. En effet, pour une concentration en TiO<sub>2</sub> de 0,1 g/L ; 0,4 g/L et 0,8 g/L, le ratio de lipides peroxydés augmente respectivement de 1 à 3,3 ;

5,9 et 7,1. **Ainsi, plus la concentration en TiO<sub>2</sub> est importante plus il y a de lipides peroxydés.**

Ainsi au vu de ces résultats, il s'avère que le rayonnement seul ou que le TiO<sub>2</sub> en absence de rayonnement ne suffit pas à induire des modifications lipidiques mais que c'est bien l'action couplée rayonnement/TiO<sub>2</sub> qui est à l'origine de la peroxydation. Toutefois cette première partie de l'étude de la peroxydation lipidique en absence de molécules scavengers ne constituent pas des travaux nouveaux puisque dès 1999, Maness *et al.* ont obtenu des résultats similaires avec TiO<sub>2</sub> P25 Degussa en présence d'une contamination bactérienne initiale en *E.coli* de l'ordre de 10<sup>8</sup> UFC/mL (TiO<sub>2</sub> à 0,1 g/L sous irradiance UV-A de l'ordre de 8 W/m<sup>2</sup> pendant 30 min).<sup>347</sup> En effet, dans ces conditions, ils ont extrait environ 2,4 nmol de MDA/mg de masse cellulaire alors qu'en absence de rayonnement mais en présence de TiO<sub>2</sub> à 0,1 g/L, la quantité de MDA ayant été extraite par mg de masse cellulaire n'était que de 0,28 nmol. De même, sous rayonnement UV-A mais en absence de TiO<sub>2</sub>, la quantité de MDA extraite était de l'ordre de 0,35 nmol de MDA/ mg de masse cellulaire.

***Rappelons néanmoins que lors de ces travaux, le but n'était pas de quantifier le MDA lors des différents traitements, mais bien de voir, grâce à l'ajout de molécules scavengers comme la SOD, l'implication d'O<sub>2</sub><sup>•-</sup> dans les phénomènes de peroxydation lipidique.***

Suite à la mise en évidence de l'action bactéricide d'O<sub>2</sub><sup>•-</sup> lors de la photocatalyse, nous avons donc décidé d'étudier l'impact de ce ROS sur la peroxydation lipidique *via* l'ajout de SOD à différentes unités (500 U, 1000 U et 500 U \*2). Les conditions opératoires retenues sont une concentration en TiO<sub>2</sub> de 0,4 g/L et 60 min de rayonnement UV-A à 30 W/m<sup>2</sup>.

**Effet de l'ajout de SOD à différentes unités** lors de la réaction photocatalytique

Nous pouvons constater que :

- l'ajout d'une dose unique de SOD à 500 U au début du traitement photocatalytique (t<sub>0</sub>) est suffisante pour induire une réduction significative de la peroxydation lipidique par rapport au ratio de lipides peroxydés en absence de SOD. En effet, sans SOD, le ratio de lipides peroxydés est de l'ordre de 5,9 tandis que dans le cas de l'ajout de SOD, ce ratio est de l'ordre de 3,4.
- l'ajout d'une seconde dose de SOD à t<sub>30</sub> n'induit pas de réduction supplémentaire de peroxydation lipidique, le ratio de lipides peroxydés étant toujours aux alentours de 3,1
- le doublement de la dose de SOD (avec une dose unique de SOD à 1000 U ajoutée à t<sub>0</sub>), ne permet pas de diminuer significativement le ratio de lipides peroxydés, qui se maintient toujours à environ 3,0).

Cette diminution significative de la quantité de lipides peroxydés en présence d'une unique dose de SOD 500 U suggère que le radical anion superoxyde O<sub>2</sub><sup>•-</sup> est largement impliqué dans ce mécanisme de peroxydation lipidique. O<sub>2</sub><sup>•-</sup> est entre autre connu pour réagir avec les radicaux hydroperoxydes intermédiaires générés lors de la peroxydation lipidique ; cette réaction conduisant à la formation de nouvelles réactions radicalaires en chaîne. Ainsi, le fait

de piéger  $O_2^{\circ-}$  par la SOD, empêcherait cette réaction et diminuerait le phénomène de peroxydation lipidique.<sup>355</sup>

Cependant, nous pouvons constater que le doublement de cette dose de SOD soit avec l'ajout d'une seconde dose de SOD à  $t_{30}$ , soit directement avec une dose unique de 1000 U ajoutée à  $t_0$ , ne permet pas d'induire une réduction supplémentaire de la quantité de lipides peroxydés par rapport à celle mesurée avec une unique dose de SOD 500 U. Cela laisse donc suggérer que le piégeage des radicaux anions superoxydes  $O_2^{\circ-}$  par l'ajout de SOD est efficace, mais que d'autres ROS, tels que le radical hydroxyle  $OH^{\circ}$ , sont impliqués dans la peroxydation lipidique de façon non négligeable. Leur implication dans la peroxydation lipidique a en effet déjà été rapportée.<sup>356,357</sup>

#### **4. Peroxydation lipidique et viabilité cellulaire déterminée par cytométrie capillaire et dénombrement sur milieux gélosés**

Les résultats de quantification de la peroxydation lipidique lors de l'action photocatalytique peuvent être reliés aux résultats obtenus lors de l'analyse de **l'intégrité membranaire par cytométrie capillaire**, étant donné qu'il s'agit dans les deux cas d'une focalisation sur la structure membranaire et d'analyses réalisées **directement** après la réaction photocatalytique. Ainsi, pour un traitement photocatalytique de 60 min de rayonnement UV-A, avec une concentration en  $TiO_2$  de :

- 0,1 g/L, nous avons constaté une augmentation significative du ratio de peroxydation lipidique (ratio de 3,3), mais nous n'avons pas observé de modification notable de l'intégrité membranaire évaluée par cytométrie capillaire
- 0,4 g/L et de 0,8 g/L, nous avons observé une augmentation significative du ratio de peroxydation lipidique respectivement de 5,9 et 7,1 et conjointement, nous avons pu constater des modifications de l'intégrité membranaire avec des réductions de la viabilité cellulaire estimée par cytométrie capillaire respectivement à 2,5 log et 2,6 log.

De même, nous avons pu corréliser les résultats de peroxydation lipidique avec l'efficacité bactéricide déterminée par **dénombrement sur milieux gélosés** (analyse réalisée après 24 h de mise en culture des bactéries avec le  $TiO_2$ ). En effet pour un traitement photocatalytique de 60 min de rayonnement UV-A, avec une concentration en  $TiO_2$  de :

- 0,1 g/L, 0,4 g/L et 0,8 g/L, nous avons constaté **une augmentation significative du ratio de peroxydation lipidique** respectivement de 3,3 ; 5,9 et 7,1 et conjointement **une réduction de la viabilité cellulaire** respectivement de 1,5 ; 3,0 et 3,2 log.

Au vu de ces résultats, nous suggérons que lors de la photocatalyse, un taux de **peroxydation lipidique élevé** (d'environ 6) entraîne une **modification de l'intégrité membranaire** et réduit la population bactérienne d'au minimum 3 log.

<sup>355</sup> Sutherland MW, Gebicki JM : **A reaction between the superoxide free radical and lipid hydroperoxide in sodium linoleate micelles.** *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 1982, **214**(1):1-11.

<sup>356</sup> Rahman MM, Ninomiya K, Ogino C, Shimizu N : **Ultrasound-induced membrane lipid peroxidation and cell damage of *Escherichia coli* in the presence of non-woven  $TiO_2$  fabrics.** *Ultrasonics Sonochemistry*, 2010, **17**:738-743.

<sup>357</sup> Reeves JF, Davies, SJ, Dodd NJF, Jha AW : **Hydroxyl radicals ( $^{\circ}OH$ ) are associated with titanium dioxide ( $TiO_2$ ) nanoparticle-induced cytotoxicity and oxidative DNA damage in fish cells.** *Mutation research*, 2008, **640**:113-122.

Nous avons également montré qu'avec une concentration en  $\text{TiO}_2$  de 0,4 g/L cette peroxydation lipidique était en grande partie gouvernée par le radical anion superoxyde  $\text{O}_2^{\circ-}$  étant donné qu'en présence de SOD, **le taux de lipides peroxydés est réduit de plus de moitié par rapport au taux de lipides peroxydés mesurés en absence de SOD.**

Bien qu'il aurait été judicieux de réaliser la même étude avec une concentration en  $\text{TiO}_2$  de 0,1 g/L (donnant un taux de lipides peroxydés de l'ordre de 3), nous pouvons suggérer par extrapolation avec les résultats précédents que le taux de peroxydation lipidique quantifié en présence de SOD par exemple à 1000 U serait de l'ordre 1,5. Toutefois pour ce traitement (0,1 g/L et 60 min de rayonnement) en présence de SOD par exemple à 1000 U, nous avons observé une restauration complète de la viabilité cellulaire suggérant dès lors que les radicaux anions superoxydes  $\text{O}_2^{\circ-}$  sont majoritairement impliqués dans l'effet antibactérien du  $\text{TiO}_2$ . Ainsi, nous suggérons que d'autres ROS qu' $\text{O}_2^{\circ-}$  participent aux phénomènes de peroxydation lipidique sans toutefois contribuer de manière significative à l'effet antibactérien du  $\text{TiO}_2$ .

### **Conclusion sur le rôle de la peroxydation lipidique dans l'effet antibactérien du $\text{TiO}_2$**

Cette étude de l'analyse de la **peroxydation lipidique** chez *E.coli*, par quantification du malondialdéhyde permet de relier **les phénomènes d'oxydation lipidique à l'effet antibactérien photocatalytique.**

Elle met en évidence le rôle majeur d' $\text{O}_2^{\circ-}$  dans les phénomènes d'oxydation lipidique mais elle montre aussi que d'autres ROS générées ( $\text{OH}^\circ, \dots$ ) sont aussi impliquées dans ces mécanismes d'oxydation. En revanche, les études de restauration de la viabilité ont montré **dans nos conditions** que seul  $\text{O}_2^{\circ-}$  était responsable de l'effet antibactérien. Ces deux conclusions sont surprenantes et laissent supposer que les ROS autres qu' $\text{O}_2^{\circ-}$  ne soient pas impliqués dans l'effet antibactérien, ce qui se révèle être contraire à la littérature.<sup>358</sup> Par mesure de prudence, il serait nécessaire de réaliser des études de restauration de la viabilité cellulaire toujours en présence de SOD mais avec des concentrations en  $\text{TiO}_2$  plus élevées, car nous ne pouvons pas exclure qu'à des concentrations en  $\text{TiO}_2$  supérieures à 0,1 g/L, d'autres ROS générées qu' $\text{O}_2^{\circ-}$  soient cette fois-ci à l'origine d'un effet antibactérien significatif.

---

<sup>358</sup> Cho M, Chung H, Choi W, Yoon J: **Linear correlation between inactivation of *E. coli* and  $\text{OH}^\circ$  radical concentration in  $\text{TiO}_2$  photocatalytic disinfection.** *Water research* 2004, **38**:1069-1077.

### **III. Etude des modifications protéiques par analyse d'électrophorèse bi-dimensionnelle couplée à de la spectrométrie de masse**

Dans le domaine de la photocatalyse, les études protéiques sont souvent menées en ciblant quelques gènes à la fois.<sup>359</sup> Afin de mieux comprendre les mécanismes impliqués dans l'effet antibactérien de la photocatalyse du TiO<sub>2</sub>, nous nous sommes attachés à l'étude des modifications protéomiques lors de différents traitements. Pour des raisons scientifiques, ces travaux ont été menés sur *E.coli*, cette bactérie ayant entre autre l'avantage d'être un microorganisme dont le génome est entièrement séquencé.

Ainsi lors de cette étude, nous nous sommes intéressés à l'influence de TiO<sub>2</sub> irradié sur le protéome (*i.e.* toutes les protéines codées par le génome) d'*E.coli* ATCC 8739, au moyen de l'analyse de gels électrophorèse bi-dimensionnelle (2D) couplée à de la spectrométrie de masse (LC-MS).

Ces travaux ont pour but de **sélectionner** et de **présenter des cibles potentielles d'action du TiO<sub>2</sub> sur différentes catégories fonctionnelles de protéines**. Nous insistons néanmoins sur le choix du mot « potentielles » car il faut d'ores et déjà préciser que **la spectrométrie de masse ne renseigne pas dans notre étude sur l'aspect fonctionnel** et notamment sur les interactions protéine-protéine. En effet, nombreuses sont les protéines qui disposent de plusieurs isoformes, ainsi la modification d'une ou de plusieurs de ces dernières ne signifient pas nécessairement que la protéine n'est plus fonctionnelle. N'oublions pas également qu'une protéine agit rarement seule (interaction par exemple protéine-protéine) et qu'elle est sous la dépendance d'un contexte cellulaire complexe appelé interactome<sup>360</sup>, de ce fait il **serait faussé de dire d'après ces travaux préliminaires que si un spot est modifié alors nécessairement la protéine associée à ce spot n'est plus fonctionnelle**.

A notre connaissance cependant, aucune étude utilisant l'électrophorèse bi-dimensionnelle (2D) couplée à de la spectrométrie de masse (LC-MS) n'a été réalisée afin de proposer une liste de cibles d'action protéiques préférentielles du TiO<sub>2</sub> pouvant par la suite participer à une meilleure compréhension de l'effet antibactérien du TiO<sub>2</sub> ou bien à l'inverse participer à une meilleure appréhension des phénomènes de résistance à ce type de traitement.

Deux traitements photocatalytiques différant par leur concentration en TiO<sub>2</sub> ont été appliqués sur une population d'*E.coli* de l'ordre de 10<sup>8</sup> UFC/mL: un traitement avec 0,1 g/L et un avec 0,4 g/L de TiO<sub>2</sub> pour une durée de rayonnement de 30 min sous irradiance UV-A de 30 W/m<sup>2</sup>.

Nous avons vu précédemment par la technique de dénombrement sur milieu gélosé qu'il y a pour ces conditions respectivement une réduction de 0,3 et 2,2 log (voir figure 70 (a)). Ces

<sup>359</sup> Gogniat G, and Dukan S: **TiO<sub>2</sub> photocatalysis causes DNA damage via fenton reaction-generated hydroxyl radicals during the recovery period.** *Appl Environ Microbiol*, 2007, **73**:7740-3.

<sup>360</sup> Terradot L, and Noirot-Gros MF: **Bacterial protein interaction networks: puzzle stones from solved complex structures add to a clearer picture.** *Integr Biol (Camb)*, 2011, **3**:645-52.

conditions induisent donc des **stress sublétaux** se traduisant par la formation d'une population bactérienne dans un **état physiologique variable** (bactéries vivantes, bactéries mortes, BVNC...). Nous sommes partis de l'hypothèse selon laquelle ces modifications protéiques engendreraient des stress sublétaux.

Ainsi, 6 conditions opératoires ont été retenues avec :

- un gel « contrôle » (*E.coli* sans TiO<sub>2</sub> et sans rayonnement)
- un gel « effet du rayonnement » (*E.coli* sans TiO<sub>2</sub> exposés 30 min au rayonnement UV-A)
- un gel « effet cytotoxique du TiO<sub>2</sub> à 0,1 et 0,4 g/L » (*E.coli* avec TiO<sub>2</sub> sans rayonnement)
- un gel « effet photocatalytique du TiO<sub>2</sub> à 0,1 et 0,4 g/L » (*E.coli* avec TiO<sub>2</sub> exposés 30 min au rayonnement UV-A).

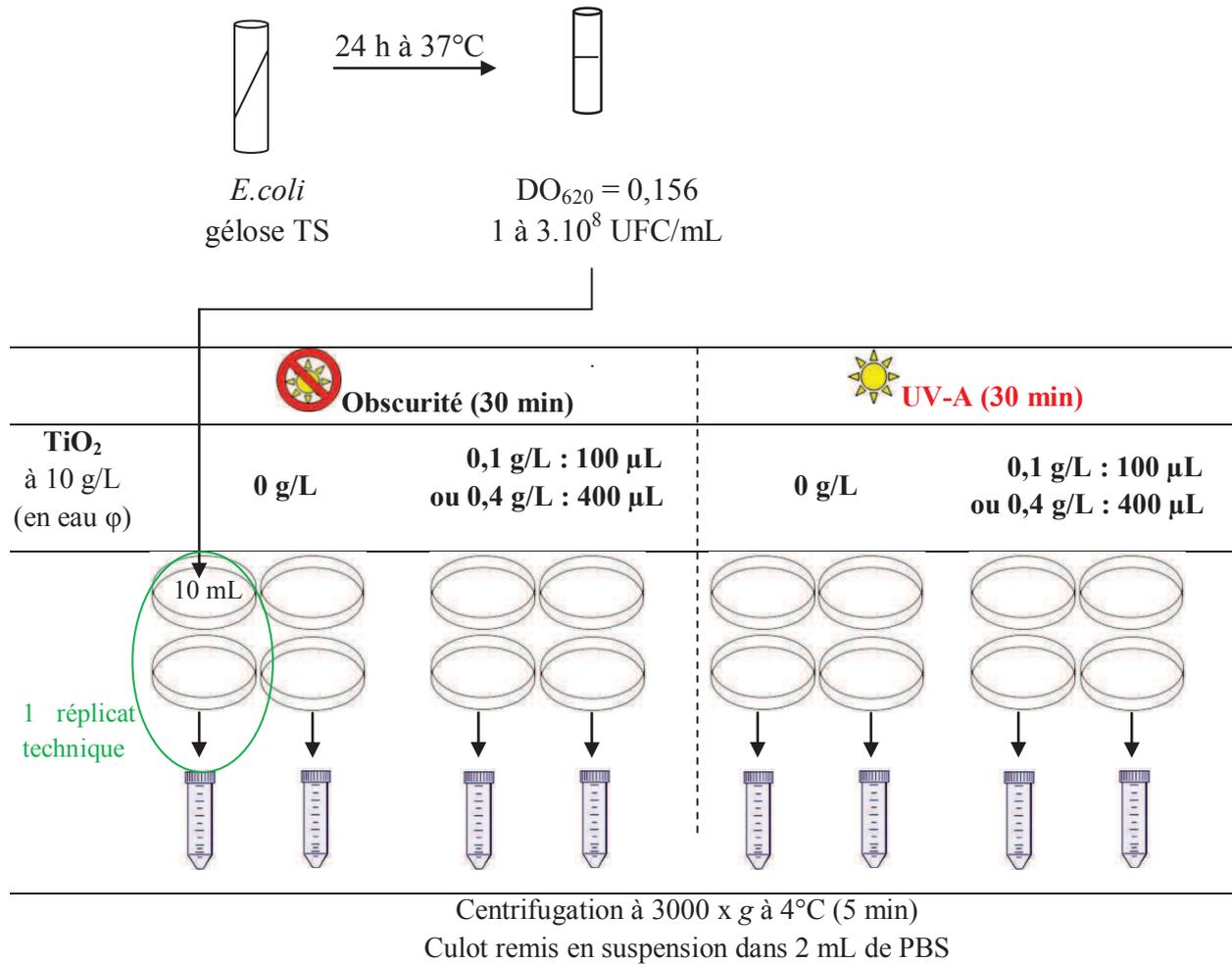
## **1. Préparation des tests et modes opératoires**

Une population *E.coli* de l'ordre de 10<sup>8</sup> UFC/mL (préparation similaire au chapitre 2 IV) est préparée en eau φ. Pour chaque condition opératoire, 4 boîtes de Pétri de volume final 10 mL (diamètre de 90 mm) ont été préparées comme suit (figure 83):

- « contrôle » et « effet du rayonnement » :
  - 9,6 mL de la suspension *E.coli* à 10<sup>8</sup> UFC/mL
  - 400 μL d'eau φ
- « effet cytotoxique du TiO<sub>2</sub> à 0,1 g/L » et « effet photocatalytique du TiO<sub>2</sub> à 0,1 g/L » :
  - 9,6 mL de la suspension *E.coli* à 10<sup>8</sup> UFC/mL
  - 300 μL d'eau φ
  - 100 μL de TiO<sub>2</sub>/eau φ d'une suspension de TiO<sub>2</sub> à 10 g/L (préparée en dispersant 0,1 g de TiO<sub>2</sub> dans 10 mL d'eau φ)
- « effet cytotoxique du TiO<sub>2</sub> à 0,4 g/L » et « effet photocatalytique du TiO<sub>2</sub> à 0,4 g/L » :
  - 9,6 mL de la suspension *E.coli* à 10<sup>8</sup> UFC/ml
  - 400 μL de TiO<sub>2</sub>/eau φ d'une suspension de TiO<sub>2</sub> à 10 g/L (préparée en dispersant 0,1 g de TiO<sub>2</sub> dans 10 mL d'eau φ).

Pour les traitements « **effet du rayonnement** » et « **effet photocatalytique** », les boîtes sont exposées pendant 30 min au rayonnement UV-A de 30 W/m<sup>2</sup> sous agitation orbitale.

Pour les 6 conditions de test retenues et pour chacune d'entre elles, 2 réplicats techniques (extraits d'un même échantillon réalisés le même jour = variabilité expérimentale) ont été réalisés. Ces expériences ont été réalisées au minimum 3 fois (n=3).



**Figure 83 Schéma des premières étapes de l'évaluation des modifications protéiques**

Cette analyse protéomique se déroule en 6 grandes étapes distinctes:

- l'extraction et le dosage des protéines totales de chaque échantillon
- la séparation des protéines par électrophorèse bidimensionnelle
- l'analyse des gels
- une digestion trypsique des protéines d'intérêt
- l'analyse des échantillons par LC-MS/MS
- l'identification des protéines.

## 1. Extraction et dosage des protéines totales de chaque échantillon

Les protocoles décrits reprennent en partie les travaux de Hamon *et al.*<sup>361</sup> Une fois le culot de chaque condition remis en suspension dans du PBS (figure 83), nous réalisons des cryobilles grâce au dépôt goutte à goutte des différentes suspensions dans de l'azote liquide. Ces cryobilles sont des petites billes de glace qui emprisonnent les bactéries. Elles sont ensuite transférées dans un cylindre puis introduites dans un broyeur cryogénique Freezer/Mill 6870 (Spex CertiPrep, Stanmore, Royaume-Uni). Le programme prédéfini du broyeur utilisé (2 min

<sup>361</sup> Hamon E, Horvatovich P, Izquierdo E, Bringel F, Marchioni E, Aoude-Werner D, Ennahar S: **Comparative proteomic analysis of *Lactobacillus plantarum* for the identification of key proteins in bile tolerance.** *BMC microbiology* 2011, **11**:63.

d'immersion dans l'azote liquide suivi de 3 cycles de broyage entrecoupés par une phase de refroidissement d'1 min) permet ainsi une lyse physique des composants cellulaires et une libération des protéines.

Les débris cellulaires sont éliminés par filtration sur membrane poreuse (diamètre 0,45 µm, Macherey-Nagel). Les protéines solubles sont ensuite précipitées à l'aide d'acétone (5 volumes d'acétone à -20°C par extrait protéique). S'ensuit une étape de purification à l'aide du tri reagent Trizol (Euromedex, France) et de chloroforme (Merck Millipore, France). Au cours de cette étape, les protéines et l'ADN se dénaturent tandis que les petites molécules et l'ARN sont solubilisés puis éliminés par centrifugation. Les protéines sont de nouveau précipitées à l'aide de l'acétone (5 volumes d'acétone à -20°C par extrait protéique). Les culots protéiques sont enfin dissous dans une solution tampon d'isoélectrofocalisation (IEF) contenant 7 M d'urée, 2 M de thiourée, 4 % (m/v) de 3-[(3-cholamidopropyl)diméthylammonio]-1-propane-sulfonate (CHAPS) et 20 mM de Tris-HCl ajusté à pH 8,8.

### **Dosage des protéines selon la méthode de Bradford**

Après l'étape de purification, la quantité de protéines contenue dans chaque extrait est dosée selon la méthode de Bradford (mesure colorimétrique à 595 nm).<sup>362</sup>

Brièvement, le réactif de Bradford (Bio-Rad Protein Assay ; Bio-Rad Hercules, CA, USA) contient du bleu de Coomassie qui se lie avec les résidus d'acides aminés hydrophobes et basiques. Les forces de Van der Waals contribuent également à la formation de ce complexe pigment-protéine. Cette interaction est à l'origine d'une modification de la longueur d'onde d'absorption de 465 nm (couleur marron) à 595 nm (couleur bleue). Deux µL de chaque échantillon sont additionnés à 2 µL d'HCl 0,1 M et à 8 µL de tampon IEF. Enfin 1 mL du réactif de Bradford est ajouté juste avant la lecture de l'absorbance à 595 nm (spectrophotomètre UV-2401 PC, Shimadzu, Champs sur Marnes, France). En comparaison avec une gamme d'étalonnage d'albumine de sérum bovin (BSA) (Acros, Geel, Belgique), la concentration en protéine de chaque échantillon est déterminée.

## **2. Séparation des protéines par électrophorèse bidimensionnelle**

Deux séparations sont nécessaires à l'établissement de gels 2D : en fonction de l'isoélectrofocalisation (IEF) qui sépare les extraits protéiques suivant un gradient de pH, et en fonction de la masse moléculaire (SDS-Page).

### **La focalisation électrique : migration selon le point isoélectrique (IEF)**

Dans l'IEF, la migration des protéines est effectuée selon un gradient de pH immobilisé. Dans notre cas, l'IEF a été réalisée sur bandelettes de pH 4 à 7 (Ready Strip IPG, 17 cm, Bio-Rad) avec un dépôt protéique de 150 µg apporté sous 300 µL et à l'aide de l'appareil de type Protean IEF Cell (Bio-Rad). Les gels sont alors rehydratés de manière active durant 15 h, sous un champ électrique de 50 V, dans une solution contenant : du dithiothréitol 1 M (DTT), des

---

<sup>362</sup> Bradford MM: A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical biochemistry* 1976, 72:248-254.

ampholytes porteurs et du bleu de bromothymol. Ce champ électrique permet aux protéines de migrer jusqu'à leur pI (point isoélectrique).

### **L'électrophorèse SDS Page : migration suivant la masse moléculaire**

La seconde séparation des extraits protéiques est assurée à l'aide de la technique d'électrophorèse SDS Page (électrophorèse en gel de polyacrylamide contenant du dodécylsulfate de sodium). Cette dernière repose sur la migration des protéines en fonction de leur masse moléculaire. Au préalable, les bandelettes sont trempées dans une solution de réduction puis dans une solution d'alkylation. Ces solutions diffèrent soit par l'ajout de DTT dans le cas de la solution de réduction soit par l'ajout d'iodoacétamide dans le cas de la solution d'alkylation. Elles contiennent toutes les deux : du SDS à 2 %, du Tris-HCl 1,5 M ajusté à pH 8,8, du glycérol et du DTT 130 mM.

Le SDS ajouté induit une dénaturation des protéines : il permet une réduction des ponts disulfures et il confère également aux protéines une charge apparente négative. Lors de cette focalisation, la visualisation de la migration des protéines est assurée par une coloration au bleu de bromothymol.

Chaque bandelette est ensuite déposée sur un gel de polyacrylamide (12 % d'acrylamide). Ce gel de polyacrylamide est créé par la polymérisation d'acrylamide et de bis-acrylamide (solution de 30 % d'acrylamide/bis, Bio-Rad), en présence d'agents de polymérisation comme le TEMED (Bio-Rad) et le persulfate d'ammonium (Bio-Rad).

Ces gels sont finalement placés dans une cuve d'électrophorèse (Protean II xi Cell, Bio-Rad). Cette cuve contient un tampon d'électrophorèse conducteur contenant du Tris base 25 mM, de la glycine 192 mM et du SDS à 0,1 %. Les protéines, du fait de l'action du SDS, migreront vers l'anode. Ainsi la charge réelle des protéines n'est plus mise en jeu et seule la masse moléculaire influera sur leur migration (migration de 4 h 45 avec 30 min sous ampérage de 16 mA suivi de 4 h 15 sous ampérage de 24 mA). La vitesse de migration des différents polypeptides dépend de leur masse moléculaire : les protéines ayant une masse moléculaire plus petites migreront plus vite et inversement.

### **3. Analyse des gels**

La coloration au bleu de Coomassie permet de révéler les spots protéiques sur les gels. Cette coloration est réalisée après une étape de fixation assurée par un trempage dans une solution de méthanol à 45 % et d'acide acétique à 1 %. 5 lavages à l'eau distillée à 55°C permettent de décolorer les gels, puis ils sont scannés à l'aide du densitomètre GS-800 (Bio-Rad).

Le logiciel PD Quest version 8.0.1 (Bio-Rad) nous a permis une analyse qualitative (présence/absence) des différents spots protéiques, après qu'un seuil de détection ait été déterminé. Rappelons que pour chaque condition opératoire 3 réplicats biologiques et 2 réplicats techniques ont été réalisés, ce qui permet de minimiser les erreurs analytiques, étant **donné que seuls les spots validés dans ces 6 gels (pour une même condition) ont été retenus.**

#### 4. Digestion trypsique des protéines d'intérêt

Afin de réaliser une analyse par spectrométrie de masse LC-MS/MS, chaque spot d'intérêt a été découpé, décoloré et a subi une digestion trypsique pendant 18 h à 37 °C (25 µL de trypsine, Promega, Madison, WI, USA). La trypsine permet de couper après une lysine ou une arginine si l'acide aminé suivant n'est pas une proline.

#### 5. Analyse des échantillons par LC-MS/MS et identification des protéines

Les fragments peptidiques ont été analysés par spectrométrie de masse LC-MS/MS (système Chip-LC Q-TOF) au Département de Biochimie Analytique du Centre de Pharmacie de Groningen.<sup>361</sup> Cette analyse a permis d'obtenir des valeurs de masses qui ont été comparés aux banques de données protéiques et génomiques NCBI (r.20110608) avec les critères suivants : taxonomie : *E.coli* ; mode d'enregistrement ESI-Q-TOF ; charge de l'ion parent : +2, +3 (confiance = moyenne) ; oxydation de méthionines, carboxyamidométhylation (cystéines traitées avec l'iodoacétamide) et phosphorylation en tant que modifications partielles ; trypsine en tant qu'enzyme de digestion ; possibilité de deux clivages manqués ; mode de clivage normal ; tolérance de l'ion parent de 0,6 Da ; seuils peptidiques : longueur  $\geq 6$  acides-aminés, score  $\geq 5$ , identification significative  $p \leq 10^{-4}$ , recouvrement  $\geq 0,2$  ; série d'ions identifiés b,b doublement chargé, y et y doublement chargé ; taux faux positifs accepté : 5%.

Deux algorithmes de recherche, OMSSA (Open Mass Spectrometry Search Algorithm<sup>363</sup>) et Phenyx (Geneva Bioinformatics, Geneva, Suisse) ont été utilisés avec les mêmes critères de recherche tels que décrits ci-dessus afin de confirmer l'identité des protéines et de limiter le risque de faux positifs (à un taux de faux positifs limités à 5%).<sup>364</sup>

Les différentes protéines ont été séparées selon leur point isoélectrique et leur masse moléculaire. Ainsi théoriquement avec ces conditions d'électrophorèse bi-dimensionnelle, nous visualiserons les protéines solubles du protéome d'*E.coli* ATCC 8739 ayant un **pI compris entre 4 et 7** et une **masse moléculaire** comprise entre **10 kDa** et **250 kDa**, ce qui correspond approximativement à 62 % du protéome d'*E.coli* (pourcentage déduit à l'aide de filtres, à partir d'une analyse *in silico* des séquences protéiques d'*E.coli* de la base de données NCBI).

## 2. Résultats

Les gels 2-DE obtenus pour les 6 conditions testées sont présentés en figure 84 et dans le tableau 28. Rappelons que pour chaque condition testée, au minimum 6 gels similaires ont été réalisés. **Seuls les spots présents ou absents sur chacun des 6 gels** (3 réplicats biologiques

<sup>363</sup> Geer LY, Markey SP, Kowalak JA, Wagner L, Xu M, Maynard DM, Yang X, Shi W, Bryant SH: **Open mass spectrometry search algorithm**. *Journal of proteome research* 2004, 3(5):958-964.

<sup>364</sup> Kapp EA, Schutz F, Connolly LM, Chakel JA, Meza JE, Miller CA, Fenyo D, Eng JK, Adkins JN, Omenn GS *et al*: **An evaluation, comparison, and accurate benchmarking of several publicly available MS/MS search algorithms: sensitivity and specificity analysis**. *Proteomics* 2005, 5(13):3475-3490.

et 2 réplicats techniques) **ont été considérés et comparés** suivant une analyse qualitative à l'aide du logiciel PD Quest. Nous avons effectué une **analyse qualitative** plutôt qu'une analyse quantitative afin de visualiser seulement les modifications majeures : **spots présents** représentés en noir *versus* **spots absents**, de couleur blanche.

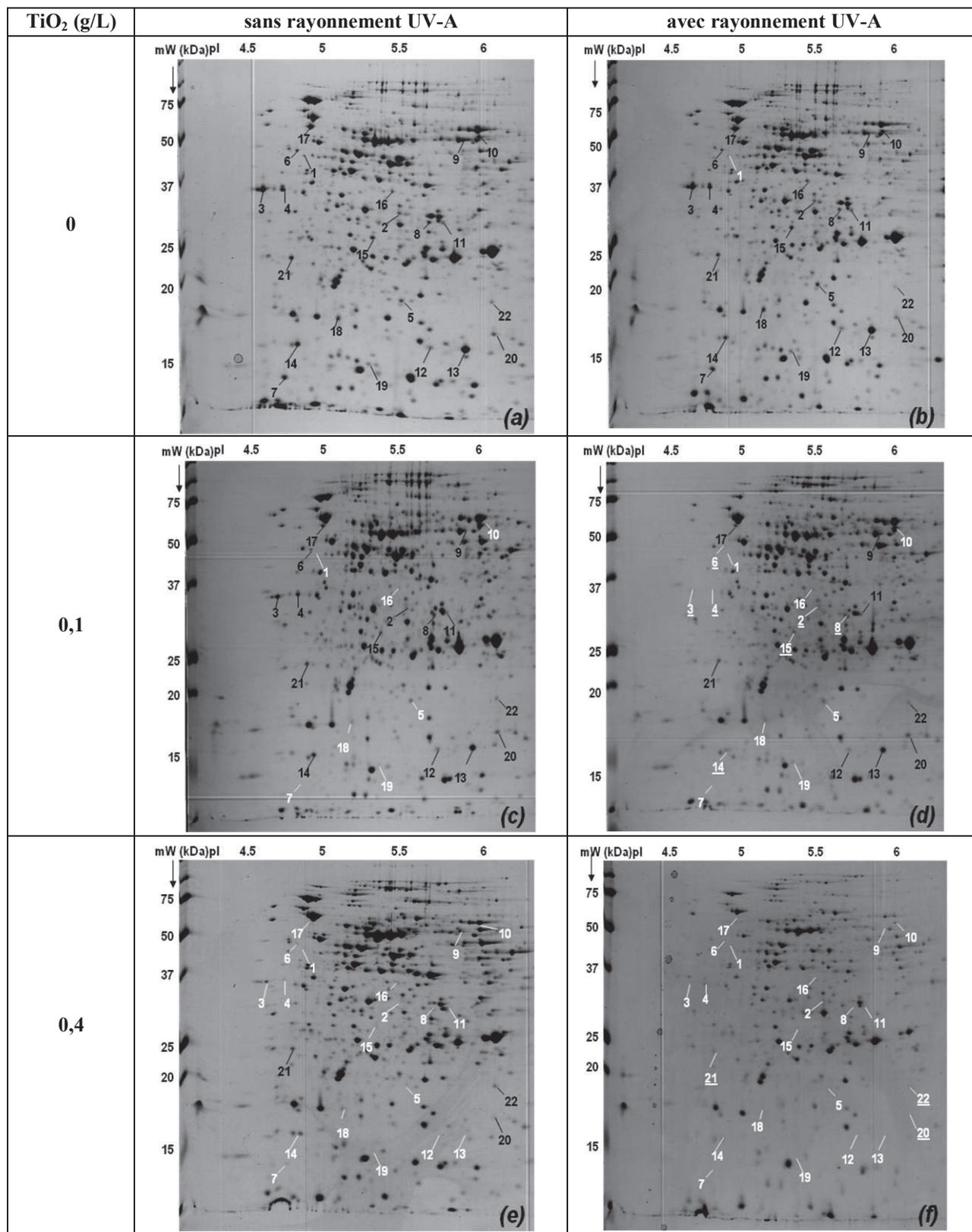


Figure 84 Impact de la photocatalyse du TiO<sub>2</sub> sur le protéome d'*E.coli* ATCC 8739 déterminé par électrophorèse bi-dimensionnelle par analyse qualitative. Gel contrôle (sans rayonnement, sans TiO<sub>2</sub>) (a) ; effet du rayonnement (30 min à 30 W/m<sup>2</sup>) (b), effet cytotoxique du TiO<sub>2</sub> à 0,1 g/L (c) et à 0,4 g/L (e), effet photocatalytique du TiO<sub>2</sub> à 0,1 g/L (d) et à 0,4 g/L (f) pour 30 min de rayonnement UV-A à 30 W/m<sup>2</sup>. En noir, les spots présents dans le gel contrôle et qui sont toujours présents dans les gels obtenus après traitement. En blanc, les spots absents dans les gels obtenus après traitement et présents dans le gel contrôle. Tous ces spots numérotés ont été identifiés par analyse LC-MS/MS.

### Gel contrôle (figure 84 (a))

L'analyse du gel avec le logiciel PD-Quest (Bio-Rad) retient environ 200 spots et les comparent à ceux obtenus pour les autres conditions d'étude.

Une vingtaine de spots protéiques sont numérotés en noir sur ce gel, il s'agit de spots qui ne sont plus détectés après traitement (**rayonnement UV-A**, **TiO<sub>2</sub> seul** et **TiO<sub>2</sub>/UV-A**).

*Cette vingtaine de spots ne représentent environ que 10 % de l'ensemble des spots répertoriés sur le gel contrôle. Ce pourcentage est assez faible mais il représente déjà un échantillonnage de protéines assez divers comme nous allons le voir par la suite. Certes, avec d'autres critères de sélection définis, en termes de réponse (qualitative ou quantitative) et/ou en termes de nombres de réplicats, l'échantillonnage aurait pu être différent, mais des choix ont dû être faits et cette vingtaine de spots protéiques constitue déjà, à notre sens, un panel de protéines intéressant.*

### Effet du rayonnement sur le protéome d'*E.coli* (figure 84 (b))

En comparaison avec le gel contrôle, le logiciel PD Quest a retenu la **disparition d'un seul spot protéique** (numéro 1, marqué en blanc étant donné qu'il y a eu une disparition). Ce spot a été identifié comme une protéine impliquée dans le transport et le métabolisme des lipides : unnamed outer membrane protein (FadL), spot 1.

### Effet cytotoxique du TiO<sub>2</sub> sur le protéome d'*E.coli* (figure 84 (c), (e))

En comparaison avec le gel contrôle, nous avons observé que l'effet cytotoxique du TiO<sub>2</sub> à :

- **0,1 g/L** a induit la disparition de **7 spots protéiques** :
  - FadL, spot 1
  - outer membrane protein OmpW (OmpW), spot 5
  - hypothetical protein YgiW (YgiW), spot 7
  - H<sup>+</sup> ATPase F1 alpha subunit (AtpA), spot 10
  - indigoidine synthase A like protein (Ind-A), spot 16
  - dnaK suppressor (DnaK), spot 18
  - small ribosomal protein S6 (Ribosomal\_S6), spot 19
  
- **0,4 g/L** a induit la disparition de **19 spots protéiques** dont les **7 spots protéiques** présentés précédemment avec **0,1 g/L** de TiO<sub>2</sub>, et **12 nouveaux spots** (dont 2 spots correspondant à la même protéine) :
  - outer membrane protein A (OmpA), spot 2
  - outer membrane protein C (OmpC), spot 3
  - outer membrane protein F (OmpF), spot 4
  - maltoporin (LamB), spot 6
  - an hypothetical protein, (YggE), spot 8
  - a dipeptide binding protein (DppA), spot 9
  - an enoyl ACP reductase, (FabI), spot 11
  - DNA starvation/stationary phase protection protein (Dps), spots 12 et 13

- bacterioferritin (Bfr), spot 14
- two component response regulator (ArcA), spot 15
- a trigger factor (tig), spot 17.

**Effet photocatalytique du TiO<sub>2</sub>** sur le protéome d'*E.coli* (figure 84 (d), (f))

L'effet photocatalytique du TiO<sub>2</sub> à :

- **0,1 g/L** a induit la disparition de **14 spots au total** dont **7 nouveaux spots** par rapport à la même condition sans UV-A :
  - OmpA, spot 2
  - OmpC, spot 3
  - OmpF, spot 4
  - LamB, spot 6
  - YggE, spot 8
  - Bfr, spot 14
  - ArcA, spot 15
- **0,4 g/L** a induit la disparition de 22 spots protéiques dont **3 nouveaux spots** par rapport à la même condition sans UV-A:
  - putative nucleotide-binding protein (YajQ), spot 20
  - heat shock protein (GrpE), spot 21
  - Hslv-Hslu protein (protease-HslV), spot 22.

A l'obscurité ou sous irradiation, on observe une augmentation du nombre de spots modifiées, qui provient de la densification des interactions bactéries-TiO<sub>2</sub> avec des agrégats plus denses et de l'augmentation de la production des ROS.

Notons aussi, que même si les tests sont réalisés à pH proche de PZC du TiO<sub>2</sub> P25 (7 vs 6,5), le potentiel zéta est légèrement négatif, ce qui pourrait favoriser le contact bactéries-TiO<sub>2</sub> avec les quelques acides aminés chargés. En effet, récemment il a été montré que plusieurs acides aminés chargés positivement étaient présents au niveau de la partie externe des OMP<sup>365</sup>. Dès lors, ces acides aminés pourraient interagir avec TiO<sub>2</sub>. Nous suggérons ainsi que cette interaction TiO<sub>2</sub>/protéine pourrait par exemple induire des changements quant à la localisation du spot sur l'échelle de pI (du fait de l'ajout de TiO<sub>2</sub> présentant une surface de charge négative). Il est cependant important de considérer cette dernière proposition comme une hypothèse car rien ne nous assure qu'il y ait ce type d'interaction entre les particules chargées de TiO<sub>2</sub> et certains résidus d'acides aminés.

Ces numéros de spots avec les protéines identifiées et les caractéristiques associées sont repris dans le tableau 28 où il est par ailleurs mentionné :

- le **numéro du spot** identifié figurant sur le gel 2-DE ainsi que le **traitement** induisant une modification du spot protéique.

*Après digestion trypsique et analyse LC-MS/MS, nous pouvons également déterminer :*

<sup>365</sup> Slusly JSG, Dunbrack RL: **Charge asymmetry in the proteins of the outer membrane.** *Bioinformatics*, 2013. doi:10.1093/bioinformatics/btt355

- le **coverage**, il s'agit du pourcentage de la séquence totale de la protéine qui a été reconnu et qui a servi pour l'identification de la protéine. Cette séquence analysée comporte des domaines dits uniques, c'est-à-dire qui ne se retrouvent que dans la protéine considérée. A noter que l'identification a été confirmée en utilisant deux algorithmes (Phenyx, OMSSA), ce qui limite l'identification de faux positifs (protéines pour laquelle l'identification est fautive malgré de bons attributs statistiques - ou scores).
- le **nombre de peptides reconnus**, c'est le nombre maximal de peptides issus de l'empreinte peptidique reconnus avec les protéines candidates proposées dans les bases de données. C'est à partir de ces données que les protéines sont identifiées.
- le **nom** de la protéine, son **gène**, son **point isoélectrique théorique**, **sa masse moléculaire théorique** ainsi que **sa catégorie fonctionnelle** [ces différentes catégories fonctionnelles étant définies suivant la base de données des groupes de gènes orthologues (Clusters of Orthologous Groups, COG)].<sup>366</sup>

---

<sup>366</sup> Tatusov RL, Natale DA, Garkavtsev IV, Tatusova TA, Shankavaram UT, Rao BS, Kiryutin B, Galperin MY, Fedorova ND, Koonin EV : **The COG database : new developments in phylogenetic classification of proteins from complete genomes.** *Nucleic Acides Research*, 2001, **29**(1):22-28.

Tableau 28 Identification des protéines absentes du protéome d'*E.coli* ATCC 8739 après différents traitements : rayonnement UV-A de 30 min (30 W/m<sup>2</sup>), effet cytotoxique du TiO<sub>2</sub> à 0,1 g/L ou 0,4 g/L et effet photocatalytique du TiO<sub>2</sub> à 0,1 g/L ou 0,4 g/L pour un rayonnement UV-A de 30 min à 30 W/m<sup>2</sup>

Functional category	Protein identity	Gene	Location	Spot number	Peptides matched <sup>a</sup>	Coverage (%)	pI <sup>b</sup> mW <sup>c</sup>	Treatment <sup>d</sup>
Lipids transport and metabolism	unnamed protein product	<i>fadL</i>	Outer membrane	1	3/5	6	5,26 42306,65	UV <sup>e</sup> ; C <sub>0,1</sub> <sup>f</sup> ; C <sub>0,4</sub> <sup>g</sup>
	A Chain A, X-Ray Structure Of <i>Escherichia coli</i> Enoyl Reductase With Bound Nad And Benzo-Diazaborine	<i>fabI</i>	Cytoplasm	11	15/18	43	5,58 27732,75	C <sub>0,4</sub>
Porin	outer membrane protein A	<i>ompA</i>	Outer membrane	2	11/12	24	5,99 37200,16	P <sub>0,1</sub> <sup>h</sup> ; C <sub>0,4</sub>
	outer membrane porin protein C	<i>ompC</i>	Outer membrane	3	18/19	28	4,65 41447,29	P <sub>0,1</sub> ; C <sub>0,4</sub>
	outer membrane porin protein F	<i>ompF</i>	Outer membrane	4	18/18	29	4,82 39372,37	P <sub>0,1</sub> ; C <sub>0,4</sub>
	A Chain A, Outer Membrane Protein Ompw	<i>ompW</i>	Outer membrane	5	6/6	10	6,15 21675,14	C <sub>0,1</sub> ; C <sub>0,4</sub>
Carbohydrates transport and metabolism	maltoporin	<i>lamB</i>	Outer membrane	6	7/9	10	4,86 49968,34	P <sub>0,1</sub> ; C <sub>0,4</sub>
Amino-acid transport and metabolism	A Chain A, Dipeptide Binding Protein Complex With Glycyl-L-Leucine	<i>dppA</i>	Inner Membrane	9	23/29	24	5,74 57407,06	C <sub>0,4</sub>
Inorganic ion transport and metabolism	DNA starvation/stationary phase protection protein Dps	<i>dps</i>	Cytoplasm	12	52/54	61	5,7 18695,31	C <sub>0,4</sub>
	DNA starvation/stationary phase protection protein Dps	<i>dps</i>	Cytoplasm	13	52/54	61	5,7 18695,31	C <sub>0,4</sub>
	bacterioferritin, iron storage and detoxification protein	<i>bfr</i>	Cytoplasm	14	24/24	69	4,69 18495,03	P <sub>0,1</sub> ; C <sub>0,4</sub>
Energy production and conversion	H <sup>+</sup> ATPase F1 alpha subunit	<i>atpA</i>	Inner Membrane	10	22/26	32	5,93 55339,36	C <sub>0,1</sub> ; C <sub>0,4</sub>
Oxidative stress defense protein	A Chain A, Structure Of The Hypothetical Protein Ygiw	<i>ygiw</i>	Periplasm	7	14/15	45	4,73 11905,05	C <sub>0,1</sub> ; C <sub>0,4</sub>
	hypothetical protein ECP_2911	<i>yggE</i>	Periplasm	8	11/11	28	5,74 24981,16	P <sub>0,1</sub> ; C <sub>0,4</sub>
	two-component response regulator	<i>arcA</i>	Cytoplasm	15	12/14	35	5,2 27292,02	P <sub>0,1</sub> ; C <sub>0,4</sub>
	indigoidine synthase A like protein	<i>ind-A</i>	Cytoplasm	16	16/16	26	5,29 32920,87	C <sub>0,1</sub> ; C <sub>0,4</sub>
	putative nucleotide-binding protein	<i>yajQ</i>	Cytoplasm	20	14/15	49	5,94 18311,8	P <sub>0,4</sub> <sup>i</sup>
Posttranslational modification, protein turnover, chaperones	trigger factor	<i>tig</i>	Cytoplasm	17	65/70	56	4,73 48023,39	C <sub>0,4</sub>
	dnaK suppressor	<i>dksA</i>	Cytoplasm	18	3/4	34	4,97 17499,65	C <sub>0,1</sub> ; C <sub>0,4</sub>
	heat shock protein GrpE	<i>grpE</i>	Cytoplasm	21	16/18	42	4,68 21740,78	P <sub>0,4</sub>
	A Chain A, Hslv-Hslu	<i>protease-HslV</i>	Cytoplasm	22	5/5	19	5,95 18961,66	P <sub>0,4</sub>
Translation, ribosomal structure and biogenesis	F Chain F	<i>ribosomal_S6</i>	Cytoplasm	19	9/10	42	6,58 11163,85	C <sub>0,1</sub> ; C <sub>0,4</sub>

<sup>a</sup> Peptides reconnus: nombre de peptides identifiés correspondant au pourcentage de la couverture de séquence

<sup>b</sup> pI: point isoélectrique théorique

<sup>c</sup> mW: masse moléculaire théorique en Da

<sup>d</sup> Traitement: nature du traitement conduisant à la disparition des spots protéiques en comparaison avec le gel témoin

<sup>e</sup> traitement UV: 30 min de rayonnement UV-A à 30 W/m<sup>2</sup>

<sup>f, g</sup> C<sub>0,1</sub>; C<sub>0,4</sub>: effet cytotoxique du TiO<sub>2</sub> respectivement à 0,1 g/L et 0,4 g/L

<sup>h, i</sup> P<sub>0,1</sub>; P<sub>0,4</sub>: effet photocatalytique du TiO<sub>2</sub> respectivement à 0,1 g/L et 0,4 g/L

Au vu de ces différentes modifications observées, il est intéressant de constater que :

- le **rayonnement UV-A** seul n'a induit l'altération que d'une **seule protéine**
- la **majorité des spots protéiques modifiés** ou altérés, l'est déjà suite à l'**effet cytotoxique** du TiO<sub>2</sub>, avec 7 spots modifiés pour une concentration en TiO<sub>2</sub> à 0,1 g/L et 19 spots au total modifiés pour une concentration en TiO<sub>2</sub> à 0,4 g/L
- les **traitements photocatalytiques** n'ont entraîné la modification que de **7 et 3 protéines supplémentaires** par rapport aux traitements correspondants sans UV-A, respectivement pour une concentration en TiO<sub>2</sub> à 0,1 g/L et à 0,4 g/L.

La disparition d'un spot lors des traitements par rapport au gel contrôle obtenu peut refléter une **dénaturation, un clivage, une oxydation ou un changement de localisation du spot sur le gel sans préjuger de la perte de fonctionnalité de la protéine**. Cependant, nous devons considérer que bien souvent, pour une protéine fonctionnelle, différentes isoformes peuvent être présentes. C'est par exemple, le cas des protéines de la membrane externe, dénommées Omp. Par exemple, dans le cas d'OmpA (spot 2), nous n'avons constaté la disparition que d'une seule isoforme de cette protéine, alors qu'il est décrit dans la littérature que de nombreuses isoformes de cette protéine existent (8 sont déjà reportées dans la publication de Molloy *et al.*<sup>367</sup>). **De ce fait, l'altération d'un spot ne signifie pas obligatoirement que la protéine n'est plus fonctionnelle.**

Dans le cas des enzymes, ces modifications/altérations, peuvent conduire à une inhibition ou une activation de la fonction enzymatique.

Ces cas de figure étant très différents, des études supplémentaires sur les protéines ciblées permettraient de mieux comprendre les mécanismes de résistance/sensibilité à la photocatalyse, par exemple *via* l'utilisation de mutants, comme cela a été réalisé dans les travaux de Gogniat pour l'identification de gènes impliqués dans la résistance aux ROS.<sup>368</sup>

La logique voudrait que selon nos critères sélectionnés, l'absence d'un spot par rapport au gel contrôle, entraîne l'apparition d'un autre spot correspondant à la protéine modifiée. Or lors de cette analyse de type **présence/absence**, nous n'avons pas observé d'apparition de spots dans les gels traités. De ce fait, nous pouvons supposer que les spots qui ont été altérés ont conduit à la formation de nouveaux spots indétectables. Ceci peut s'expliquer par :

- la formation de spots trop petits (taille inférieure à 10 kDa) lors du clivage de la protéine
- la présence de spots dont le pI n'est pas compris dans la gamme définie (échelle de pH de 4 à 7)
- la présence de spots qui peuvent se retrouver au même emplacement que d'autres spots initialement présents

---

<sup>367</sup> Molloy MP, Herbert BR, Slade MB, Rabilloud T, Nouwens AS, Williams KL, Gooley AA: **Proteomic analysis of the *Escherichia coli* outer membrane**. *European Journal of Biochemistry*, 2001, 267(10):2871-2881.

<sup>368</sup> Gogniat G, and Dukan S: **TiO<sub>2</sub> photocatalysis causes DNA damage via fenton reaction-generated hydroxyl radicals during the recovery period**. *Appl Environ Microbiol*, 2007, 73:7740-3.

- la formation d'isoforme dont le pI et la mW sont couverts par les conditions de notre gel mais qui se révèle être trop hydrophobe et donc mal solubilisée dans les tampons utilisés avant l'électrofocalisation.

### Diversité des protéines modifiées

Comme présenté dans le tableau 28, les protéines modifiées par la présence de TiO<sub>2</sub> irradié ou non sont de nature **très hétérogène** et présentent des **fonctions très diverses**. Cependant, au sein de ces 21 protéines différentes, on trouve 10 protéines membranaires (*m*) et 11 protéines cytoplasmiques (*c*).

Quelques groupes se démarquent, avec :

- 4 protéines (*m*) appartenant aux **porines** (protéines membranaires intrinsèques)
- 9 protéines impliquées dans la réponse au **stress** avec :
  - 5 protéines (2 *m* et 3 *c*) impliquées dans la réponse au **stress oxydatif**
  - 4 protéines (*c*) appartenant à des **protéines chaperonnes**. Ces chaperons moléculaires aident notamment au repliement des protéines dans les conditions physiologiques et les conditions de stress
- 6 protéines impliquées dans le transport et le métabolisme de diverses molécules comme les ions inorganiques (2 (*c*)), les lipides (1 *m* et 1 *c*), les sucres (1 (*m*)) ou bien encore les acides aminés (1 (*m*)).

Pour terminer, nous avons identifié un spot correspondant à une enzyme (*m*) jouant un rôle dans la production et la conversion d'énergie, et une protéine impliquée dans la traduction ou dans la structure ou la biogénèse des ribosomes (*c*).

Ces **altérations ne sont pas spécifiques** d'une catégorie fonctionnelle, certaines protéines telles que les protéines de la membrane externe (comme les porines) sont plus souvent citées, probablement en raison de leur plus grande exposition aux particules de TiO<sub>2</sub>. Il a notamment été reporté que les porines représentaient chez les bactéries à Gram négatif environ 70 % de la surface de la membrane. Leurs rôles est de permettre le passage des nutriments et en particulier des petites molécules hydrophiles.<sup>369</sup>

Remarquons également que lors de l'effet cytotoxique du TiO<sub>2</sub>, un nombre conséquent de spots correspondant à des protéines impliquées dans la réponse au **stress** ont été touchées (6 protéines sur 21 protéines identifiées au total). Il n'est pas surprenant de retrouver ce groupe de protéines modifiées. En effet, les études de cytométrie capillaire et les études de microscopie à fluorescence ont notamment mis en évidence l'agrégation des bactéries avec les particules agrégées de TiO<sub>2</sub>, de ce fait ces agrégats de TiO<sub>2</sub> pourraient empêcher les interactions entre bactérie/environnement conduisant à un stress et induisant des modifications protéiques. Par ailleurs, lors du suivi de CL, nous avons remarqué que même en absence de rayonnement UV-A, l'addition de TiO<sub>2</sub> seul suffisait déjà à induire un signal de CL élevé, mettant en évidence implicitement que les radicaux anions superoxydes en quantité

---

<sup>369</sup> Jaroslowski S, Duquesne K, Sturgis J, Scheuring S: **High-resolution architecture of the outer membrane of the Gram-negative bacteria *Roseobacter denitrificans***. *Molecular microbiology* 2009, **74**(5):1211-1222.

non négligeable sont présents dans le milieu réactionnel. De ce fait, il n'est pas exclu que ces derniers participent à des altérations protéiques et qu'une de leur cible d'action soit des protéines impliquées dans la réponse au stress en général et plus précisément au stress oxydatif. A plus forte raison, lors de la photocatalyse, les ROS générées sont susceptibles de directement agir sur les protéines impliquées dans les réponses au stress.

### **Cas des isoformes protéiques de la protéine Dps modifiés après exposition pendant 30 min à une concentration en TiO<sub>2</sub> de 0,4 g/L.**

Dans le cas de la protéine Dps, nous avons pu observer que deux isoformes de la protéine Dps (spot 12 et spot 13) ont été modifiées lors du traitement en présence de TiO<sub>2</sub> à 0,4 g/L (dans le noir, *i.e.* effet cytotoxique).

Dans la littérature, il est rapporté que les isoformes protéiques peuvent venir d'un épissage alternatif de l'ARNm, de point de mutation unique, ou plus souvent de modification post-traductionnelle comme les clivages protéolytiques. Ces modifications entraînent alors souvent une variation de masse moléculaire et du point de charge de la protéine.<sup>370</sup> Dans notre cas, il semblerait que seul le point de charge nulle ait changée, la masse moléculaire des spots identifiés n'apparaissant que peu modifiée, il s'agirait alors plutôt de modifications post-traductionnelles.

### **Avantages et inconvénients de la technique d'électrophorèse 2D couplée à de la spectrométrie de masse pour la mise en évidence des modifications protéomiques lors du traitement photocatalytique**

De par ses pouvoirs résolutifs et séparatifs élevés, cette technique se révèle être sensible et reproductible pour l'appréciation des différents spots protéiques et leur identification. Elle permet également de visualiser des isoformes protéiques. Que ce soit à l'aide d'analyse qualitative (comme dans notre étude) ou à l'aide d'analyse quantitative, elle permet notamment de mettre en évidence les modifications majeures des protéines suivant les différentes conditions testées et ce pour un pourcentage assez important du protéome connu d'une souche. Dans notre cas, le protéome observé, suivant nos conditions, correspondrait à environ 62 % du protéome connu de la souche ATCC 8739 d'*E.coli*. Il n'en reste pas moins que cette technique présente quelques inconvénients. En effet :

- elle ne nous permet pas de visualiser dans notre cas, les protéines basiques (pH au-delà de 7), ni les protéines de haut mW
- elle ne peut fournir des informations quant à l'**origine** des **modifications observées**. Nous constatons qu'un spot est modifié mais nous ne pouvons savoir si l'origine de cette modification est liée à une dénaturation, un clivage ou une oxydation
- elle ne renseigne pas sur l'**aspect fonctionnel** de la protéine ciblée

---

<sup>370</sup> Claverol S, Bulet-Schiltz O, Gairin JE, Monsarrat B : **Characterization of protein variants and post-translational modifications : ESI-MSn analyses of intact proteins eluted from polyacrylamide gels.** *Molecular and Cellular Proteomics*, 2003, 2(8):483-493.

- elle ne nous permet pas d'observer des **mécanismes de régulation de l'expression des gènes** pouvant être induits après un stress. Ces mécanismes incluent un contrôle de la transcription et/ou un contrôle de la traduction et/ou un contrôle post-traductionnel et sont indispensables à la résistance et/ou à la survie bactérienne dans les conditions de stress. En effet, lors de notre étude, les différents traitements sublétaux ont été appliqués en eau  $\varphi$  suivis immédiatement de la formation de cryobilles. De ce fait, il s'agit d'une cartographie des modifications protéiques obtenues juste après traitement étant donné que les microorganismes n'ont pas été remis en culture et n'ont pas pu s'adapter aux différents stress. Si nous avions voulu voir les mécanismes de régulation, il aurait fallu remettre les bactéries en culture et pratiquer à différents temps une analyse du protéome.

#### **IV. Confrontation des différentes analyses réalisées (suivi de CL, peroxydation lipidique, modification protéomique, perte de l'intégrité membranaire et mise en évidence de l'effet bactéricide) chez *E.coli***

Les principaux résultats obtenus pour chacune des analyses menées dans le but de comprendre les mécanismes impliqués lors du traitement photocatalytique chez *E.coli* ATCC 8739 sont repris ici (suivi de CL, peroxydation lipidique, modification protéomique, perte de l'intégrité membranaire et mise en évidence de l'effet bactéricide) suivant les différents traitements.

##### **Effet du rayonnement** avec 30 min et 60 min de rayonnement UV-A à 30 W/m<sup>2</sup>

Il a été constaté que les rayonnements UV-A :

- n'induisent pas :
  - de production significative des radicaux anions superoxydes O<sub>2</sub><sup>•-</sup> (détection par CL)
  - d'effet antibactérien significatif (quantification par dénombrement sur milieu gélosé)
  - de modification de l'intégrité membranaire (appréciation de l'intégrité membranaire par la technique de cytométrie capillaire couplée à l'utilisation de sondes fluorescentes)
  - de variations du taux de lipides peroxydés (quantification par mesure du malondialdéhyde produit)
- induisent :
  - la disparition d'un seul spot protéique correspondant à une protéine impliquée dans la biosynthèse des acides gras.

Au vu de ces différents résultats et des paramètres sélectionnés, il s'avère que **les rayonnements UV-A seuls** ne sont pas suffisants pour induire des modifications importantes des composants cellulaires étudiés à savoir les lipides et les protéines. Les dommages étant insignifiants, il n'a donc pas été observé d'effet bactéricide.

##### **Effet cytotoxique du TiO<sub>2</sub> à 0,1 g/L et à 0,4 g/L**

- Il n'a pas été constaté :
  - d'effet antibactérien significatif
  - de modification de l'intégrité membranaire
  - de variations du taux de lipides peroxydés.
- Il a été constaté:
  - une production significative des radicaux anions superoxydes O<sub>2</sub><sup>•-</sup>, différente de celle mesurée en absence de TiO<sub>2</sub>. En effet la moyenne de CL est de l'ordre de 100 000 RLU en présence de TiO<sub>2</sub> à 0,1 g/L et de l'ordre de 170 000 RLU en présence de TiO<sub>2</sub> à 0,4 g/L alors qu'elle est de l'ordre de 20 000 RLU en absence de TiO<sub>2</sub>.

- la disparition respectivement de 7 et 19 spots protéiques, appartenant à des familles hétérogènes : porines, protéine impliquée dans la production et la conversion d'énergie, protéine chaperonne.

En présence de **TiO<sub>2</sub> non irradié**, des radicaux anions superoxydes O<sub>2</sub><sup>•-</sup> en quantité négligeable ont été détectés (environ 170 000 RLU, soit plus de 8 fois par rapport à la quantité détectée en absence de TiO<sub>2</sub>). Cependant pour cette condition, il n'a pas été observé d'effet antibactérien ni de modification de l'intégrité membranaire. La quantité de ROS émise n'est donc pas suffisante pour induire dans nos conditions (30 à 60 minutes de contact) des dommages significatifs. En revanche, plusieurs spots protéiques n'ont plus été détectés en comparaison avec le gel témoin. Ce nombre de modification est dépendant de la quantité de TiO<sub>2</sub> testée puisqu'il a été noté la disparition de 7 spots en présence de TiO<sub>2</sub> à 0,1 g/L et la disparition de 19 spots en présence de TiO<sub>2</sub> à 0,4 g/L. Il est à noter cependant que nous n'avons aucune information sur la fonctionnalité potentielle des protéines touchées ni sur les mécanismes de régulation pouvant avoir lieu après exposition à de tels stress (tel le stress cytotoxique du TiO<sub>2</sub>).

**Effet photocatalytique du TiO<sub>2</sub> à 0,1 g/L et à 0,4 g/L avec 30 min de rayonnement UV-A à 30 W/m<sup>2</sup>**

- Pour **0,1 g/L de TiO<sub>2</sub>** :

- il n'a pas été constaté :
  - d'effet antibactérien significatif
  - de modification de l'intégrité membranaire
- il a été constaté:
  - une production significative de radicaux anions superoxydes O<sub>2</sub><sup>•-</sup> de l'ordre de 200 000 RLU comparée à environ 100 000 RLU en absence de rayonnement
  - la disparition de 7 spots supplémentaires (en plus des 7 spots déjà absents lors de l'étude de l'effet cytotoxique du TiO<sub>2</sub>)

En présence de **0,1 g/L de TiO<sub>2</sub> irradié sous 30 min de rayonnement UV-A**, la quantité de radicaux anions superoxydes O<sub>2</sub><sup>•-</sup> générée dans le milieu réactionnel est de l'ordre de **200 000 RLU**. Bien que cette quantité de radicaux anions superoxydes O<sub>2</sub><sup>•-</sup> soit conséquente (en comparaison avec le signal recueilli en présence de TiO<sub>2</sub> à 0,1 g/L mais non soumis au rayonnement), les ROS générées ne sont pas **suffisants** pour induire des dommages membranaires notables ou bien des effets antibactériens significatifs. Notons toutefois qu'avec ce traitement 7 spots protéiques n'ont pas été retrouvés, ceci laisse donc suggérer que parmi les premières cibles d'action des ROS, il y aurait les protéines.

- Pour 0,4 g/L de TiO<sub>2</sub> :
  - il n'a pas été constaté :
    - de modification de l'intégrité membranaire
  - il a été constaté:
    - une production significative de radicaux anions superoxydes O<sub>2</sub><sup>•-</sup> de l'ordre de 360 000 RLU comparée à environ 100 000 RLU en absence de rayonnement
    - un effet antibactérien de 2,2 log
    - la disparition de 3 spots supplémentaires (en plus des 19 spots déjà absents lors de l'étude de l'effet cytotoxique du TiO<sub>2</sub>).

En présence de **0,4 g/L de TiO<sub>2</sub> irradié sous 30 min de rayonnement UV-A**, la quantité de radicaux anions superoxydes O<sub>2</sub><sup>•-</sup> détectée est de l'ordre de **360 000 RLU**. Du fait de cette importante quantité de ROS générée dans le milieu réactionnel, il a été constaté un effet antibactérien de 2,2 log sans toutefois observer de modification significative de l'intégrité membranaire. Ainsi, **l'obtention d'un effet antibactérien sur milieu gélosé** observé à t<sub>24h</sub> après traitement ne signifie pas nécessairement qu'une **modification visible de l'intégrité membranaire soit détectée dans notre cas à t<sub>30 min</sub> par cytométrie capillaire** (en raison des quatre hypothèses du chapitre 3 II.4.1). Pour ce traitement, seulement 3 spots protéiques ont été modifiés, mais il s'agit de 3 spots en plus des 19 disparus lors de l'action cytotoxique. Bien que nous n'ayons aucune indication sur la fonctionnalité des protéines correspondant aux spots altérés, nous n'excluons pas le fait qu'il peut y avoir des modifications protéiques pouvant augmenter les effets antibactériens.

**Effet photocatalytique du TiO<sub>2</sub> à 0,1 g/L et à 0,4 g/L avec 60 min de rayonnement UV-A à 30 W/m<sup>2</sup>**

- Pour **0,1 g/L de TiO<sub>2</sub>**
  - il n'a pas été constaté :
    - de modification de l'intégrité membranaire
  - il a été constaté:
    - une production significative de radicaux anions superoxydes O<sub>2</sub><sup>•-</sup> de l'ordre de 200 000 RLU comparée à environ 100 000 RLU en absence de rayonnement
    - une augmentation du taux de lipides peroxydés environ de 3,3
    - un effet antibactérien de 1,5 log

En présence de **0,1 g/L de TiO<sub>2</sub> irradié sous 60 min de rayonnement UV-A**, la quantité de radicaux anions superoxydes O<sub>2</sub><sup>•-</sup> générée dans le milieu réactionnel est de l'ordre de **200 000 RLU**. Bien que nous n'ayons pas constatés de modification de l'intégrité membranaire, la production continue de ROS sur 60 min a induit une augmentation significative du ratio de lipides peroxydés (augmentation de 3,3) et un effet antibactérien de 1,5 log. Ainsi comme précédemment **l'obtention d'un effet antibactérien sur milieu gélosé ne signifie pas nécessairement que l'intégrité membranaire soit altérée.**

- Pour **0,4 g/L de TiO<sub>2</sub>**

- il a été constaté:
  - une production significative de radicaux anions superoxydes O<sub>2</sub><sup>•-</sup> de l'ordre de 360 000 RLU comparée à environ 100 000 RLU en absence de rayonnement
  - des modifications de l'intégrité membranaire induisant une réduction approximative de 2,5 log du nombre d'évènements présentant une fluorescence caractéristique des bactéries vivantes (par cytométrie capillaire)
  - un effet antibactérien de 3,0 log
  - une augmentation de l'ordre de 5,9 du taux de lipides peroxydés en comparaison avec un ratio de l'ordre de 1 après exposition au rayonnement
  - une réduction de l'ordre de 50 % du taux de lipides peroxydés en présence de SOD (500 U ou 1000 U) en comparaison avec le taux de lipides peroxydés sans SOD.

En présence de **0,4 g/L de TiO<sub>2</sub> irradié sous 60 min de rayonnement UV-A**, la quantité de radicaux anions superoxydes O<sub>2</sub><sup>•-</sup> détectée est de l'ordre de **360 000 RLU**.

Cette quantité importante de ROS émise dans le milieu réactionnel pendant 60 min, a entraîné notamment une peroxydation lipidique et des modifications de l'intégrité membranaire, ce qui a conduit *in fine* à un important effet antibactérien de l'ordre de 3 log. Ces radicaux anions superoxydes O<sub>2</sub><sup>•-</sup> sont impliqués dans les phénomènes de peroxydation lipidique puisque le piégeage de ce dernier conduit à une diminution de la peroxydation lipidique d'un facteur 2. Cependant le taux de lipides peroxydés est encore relativement élevé, de ce fait nous n'excluons pas que d'autres ROS interviennent dans ces mécanismes d'oxydation.

### **Conclusion générale**

Les différentes études menées, suivi de CL, analyse de la peroxydation lipidique, analyse protéomique, analyse de l'intégrité membranaire et de l'effet bactéricide sur milieu gélosé, ont notamment montré que **le rayonnement UV-A** seul n'induisait pas de modification/changement significatifs pour ces différents paramètres.

En revanche en présence de **TiO<sub>2</sub> non irradié**, il a pu être constaté par CL, une augmentation significative de la quantité de radicaux anions superoxydes O<sub>2</sub><sup>•-</sup> émise dans le milieu dont la quantité est dépendante de la concentration en TiO<sub>2</sub>; cette augmentation restant cependant inférieure à celle ayant pu être mesurée lors de l'action photocatalytique. Il n'a toutefois pas été constaté d'augmentation significative du ratio de lipides peroxydés, ni de modifications majeures de l'intégrité membranaire. Cependant cet ajout de TiO<sub>2</sub> a entraîné la disparition de plusieurs spots protéiques avec aussi bien des protéines localisées au niveau de la membrane que du cytoplasme. Cette première étude d'identification des protéines altérées ne nous permet cependant pas de définir si ces protéines sont toujours fonctionnelles. Deux hypothèses non exclusives peuvent expliquer ces modifications protéiques : elles peuvent être induites soit par les ROS générés dans le milieu réactionnel, soit par les interactions TiO<sub>2</sub>-bactérie. En effet, les analyses menées par cytométrie capillaire et confirmées par microscopie

à fluorescence, ont entre autre montré que cette interaction entre les deux entités est presque instantanée et peut avoir lieu même en absence de rayonnement.

Cette caractéristique de produire des ROS en absence de rayonnement pourrait s'avérer intéressante pour induire des dommages aux bactéries à plus long terme ; plusieurs heures voir jours de contact.

En ce qui concerne **l'action photocatalytique du TiO<sub>2</sub>**, des radicaux anions superoxydes O<sub>2</sub><sup>•-</sup> dont la quantité est directement dépendante de la concentration en catalyseur ont été mesurés par CL.

La quantité de radicaux anions superoxydes O<sub>2</sub><sup>•-</sup> émise dans le milieu réactionnel et le temps de traitement jouent un rôle central sur l'ampleur des effets antibactériens. A partir des résultats obtenus, nous pouvons proposer des seuils minimums à partir desquels quelle que soit la concentration en TiO<sub>2</sub> testée des effets antibactériens significatifs ont été observés :

- dès 200 000 RLU pour un temps de traitement de 60 min sous rayonnement UV-A, un effet antibactérien de 1,5 log a été obtenu
- dès 360 000 RLU pour un temps de traitement de 30 min sous rayonnement UV-A, un effet antibactérien de 2,2 log a été obtenu.

Ces radicaux anions superoxydes O<sub>2</sub><sup>•-</sup> produits à des valeurs supérieures aux seuils prédéfinis sont à l'origine de la modification de divers composants cellulaires comme les lipides. Cette peroxydation lipidique serait en particulier dûe au radical anion superoxyde O<sub>2</sub><sup>•-</sup>. Ainsi comme précédemment nous pourrions définir un seuil de ratio de peroxydation lipidique induisant des effets antibactériens : à partir d'un ratio de peroxydation lipidique de l'ordre de 3, un effet antibactérien au minimum de 1,5 log est obtenu. De ce fait, il existerait une corrélation entre les dommages lipidiques observés et les effets antibactériens constatés.

Les analyses protéomiques révèlent également que les traitements photocatalytiques sont à l'origine de l'altération de différents spots protéiques dont plus spécifiquement des protéines impliquées dans le stress ou des porines. Sans toutefois connaître l'impact de ces modifications sur les protéines touchées, il est probable que l'altération de telles protéines contribue à des désordres majeurs pouvant augmenter les effets antibactériens.

Les membranes d'*E.coli* (membrane externe et membrane cytoplasmique) sont entre autre composées d'une double couche phospholipidique dans laquelle sont enchâssées des protéines, les altérations lipidiques et protéiques potentielles entraîneraient donc des changements de fluidité membranaire conduisant à une perte de l'intégrité membranaire. De ce fait, les fonctions cellulaires essentielles sont perturbées comme la respiration, le transport de nutriments ou le transfert de signaux<sup>371</sup> et l'environnement interne en molécules biologiques, sels ou en pH serait instable.<sup>372</sup> La membrane se présente donc comme une première cible d'attaque des ROS générés, ce qui suggère que la première étape d'interaction

---

<sup>371</sup> Liu P, Duan W, Wang Q, Li X: **The damage of outer membrane of *Escherichia coli* in the presence of TiO<sub>2</sub> combined with UV light.** *Colloids and surfaces B, Biointerfaces* 2010, **78**(2):171-176.

<sup>372</sup> Pulgarin C, Kiwi J, Nadtochenko V: **Mechanism of photocatalytic bacterial inactivation on TiO<sub>2</sub> films involving cell-wall damage and lysis.** *Appl Catal B: Environmental* 2012, **128**:179-183.

entre les particules de TiO<sub>2</sub> et les bactéries est nécessaire pour induire des dommages membranaires.<sup>373,374</sup>

Les ROS ainsi constamment générés peuvent ensuite entraîner une oxydation des composants membranaire et cytoplasmique comme les protéines, l'ADN ou l'ARN.<sup>375</sup> Les mécanismes de réparation cellulaire ne sont alors plus aptes à contrecarrer les dommages oxydatifs générés par les ROS ; de ce fait, il a été constaté des effets bactéricides dépendants de la concentration en TiO<sub>2</sub> et du temps de rayonnement.

---

<sup>373</sup> Saito T, Iwase T, Horie J, Morioka T: **Mode of photocatalytic bactericidal action of powdered semiconductor TiO<sub>2</sub> on mutans streptococci.** *Journal of photochemistry and photobiology B, Biology* 1992, **14**(4):369-379.

<sup>374</sup> Gogniat G, Thyssen M, Denis M, Pulgarin C, Dukan S: **The bactericidal effect of TiO<sub>2</sub> photocatalysis involves adsorption onto catalyst and the loss of membrane integrity.** *FEMS microbiology letters* 2006, **258**(1):18-24.

<sup>375</sup> Dalrymple OK, Stefanakos E, Trotz MA, Gowami DY: **A review of the mechanisms and modeling of photocatalytic disinfection.** *Applied Catalysis B: Environmental* 2010, **98**:27-38.

## **Chapitre 5 : Mise en œuvre du TiO<sub>2</sub> dans des applications photocatalytiques**

Le dernier chapitre de cette thèse est un chapitre à visée applicative consacré à la **mise en œuvre de TiO<sub>2</sub> et de la photocatalyse** dans deux applications très différentes, mais qui constituent des applications prometteuses : le traitement de l'air intérieur et les textiles auto-désinfectants. Il est ainsi composé de deux sous-chapitres.

Le **premier sous-chapitre** aura pour but de déterminer l'efficacité antibactérienne de deux **dispositifs de traitement de l'air équipés de diodes-électroluminescentes (DEL)**. Tout d'abord nous présenterons les différents composants du réacteur photocatalytique : le support (mousses de carbure de silicium), les caractéristiques du photocatalyseur (TiO<sub>2</sub> MPT623 activable sous lumière visible) et les DELs utilisées. Les aspects matériaux seront toutefois peu détaillés ici. Ensuite nous présenterons le mode opératoire pour l'évaluation de l'efficacité antimicrobienne de ces dispositifs et les résultats obtenus.

Le **deuxième sous-chapitre** s'attachera à **élaborer des textiles photocatalytiques auto-désinfectants sous lumière solaire** par la méthode de fonctionnalisation Layer-by-Layer (LbL) et à en déterminer l'efficacité antibactérienne en considérant *E.coli* comme cible modèle.

## **I. Dispositif de traitement de l'air équipé de diodes électroluminescentes (DELs)**

Ce chapitre traite des tests réalisés sur des prototypes de dispositif de traitement de l'air intérieur, développés dans le cadre du post-doctorat de Nizar Doss au sein de l'ICPEES. Ils ont été évalués en termes de capacité à dégrader/minéraliser les molécules chimiques (en prenant la méthyléthylcétone,<sup>376</sup> le limonène ou le xylène comme polluant modèle en phase gazeuse) et à décontaminer les bioaérosols (en prenant le virus T2 d'*E.coli* comme modèle de contaminant biologique). Le premier sous-chapitre de cette partie présente les résultats obtenus en décontamination de bioaérosols, inspirés des travaux réalisés par Sébastien Josset sur des dispositifs photocatalytiques destinés au traitement de l'air dans les véhicules de transport médicaux.<sup>377,378,379</sup> Les aspects matériaux ne sont que succinctement décrits car ils ont été étudiés par Nizar Doss,<sup>376</sup> Romain Masson,<sup>380</sup> et Natalie Amoin-Kouame<sup>381</sup> au sein de l'ICPEES dans leurs travaux respectifs.

La principale innovation de ces dispositifs est d'utiliser des diodes électroluminescentes (DEL) comme source d'irradiation d'un photocatalyseur immobilisé sur un support monolithique alvéolaire. L'avantage des DELs par rapport aux sources d'irradiation plus classique comme les lampes fluocompactes réside dans :

- une faible consommation d'énergie avec un rendement électricité → lumière élevé et peu de pertes thermiques
- un faible encombrement intéressant en termes de flexibilité des configurations et de potentielles miniaturisations
- une bonne durée de vie
- l'absence de mercure, qui en fait une source d'irradiation plus verte, avec un taux de recyclage pratiquement total.

A l'heure actuelle, le prix élevé des DELs UV-A de forte irradiance est encore limitant, et le développement de photocatalyseurs absorbants dans le début du visible pourrait être intéressant pour bénéficier en termes de coût de la démocratisation des DELs dans les applications de la vie courante (figure 85).

<sup>376</sup> Doss N, Bernhardt P, Romero T, Masson R, Keller N, Keller V, **Photocatalytic degradation of methylethylketone in a small-size TiO<sub>2</sub>/β-SiC alveolar foam LED photoreactor**. Submitted

<sup>377</sup> Josset S : **Décontamination photocatalytique d'un bioaérosol contaminé par *Legionella pneumophila* et autres agents biologiques**. Thèse de l'Université de Strasbourg, 2008.

<sup>378</sup> Josset S, Taranto J, Keller N, Keller V, Lett MC, Ledoux MJ, Bonnet V, Rougeau S: **UV-A photocatalytic treatment of high flow rate air contaminated with *Legionella pneumophila***. *Catalysis Today* 2007, **129**:215-222.

<sup>379</sup> Josset S, Taranto J, Keller N, Keller V, Lett MC: **Photocatalytic treatment of bioaerosols: impact of the reactor design**. *Environmental Science and Technology* 2010, **44**:2605-2611

<sup>380</sup> Masson R : **Matériaux photocatalytiques structurés à base de mousses alvéolaires de β-SiC : applications au traitement de l'air**. Thèse de l'Université de Strasbourg, 2012.

<sup>381</sup> Kouamé N, Robert D, Keller V, Keller N, Pham C, Nguyen P : **TiO<sub>2</sub>/β-SiC foam-structured photoreactor for continuous wastewater treatment**. *Environmental Science and Pollution Research* 2012, **19**(9):3727-34.

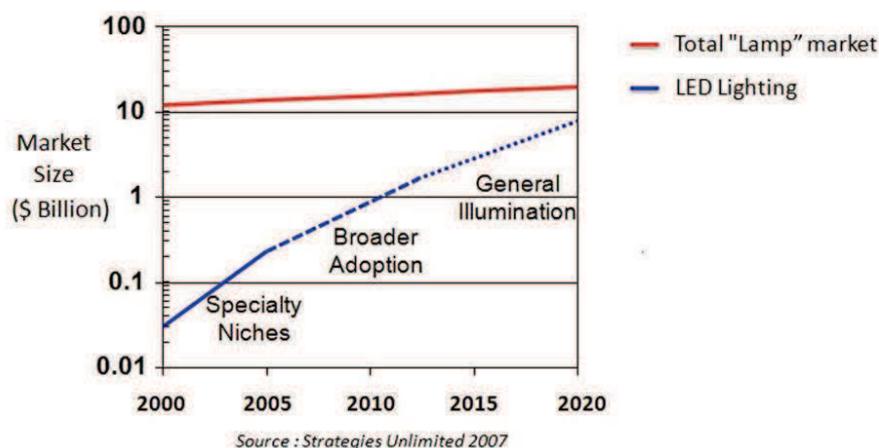


Figure 85 Démocratisation de l'utilisation des DELs depuis 2000 et extrapolation jusqu'aux années 2020

## 1. Description des modules photocatalytiques

### 1.1. Conception

Deux dispositifs de traitement de l'air ont été développés et évalués pour leur capacité à dégrader les microorganismes et donc de décontaminer l'air d'un point de vue biologique. Ces dispositifs varient en fonction du nombre de DELs (40 et 56 DELs) et incorporent un média tridimensionnel de type mousse alvéolaire monolithique en carbure de silicium de type bêta ( $\beta$ -SiC) en tant que support de  $\text{TiO}_2$  (figure 86).

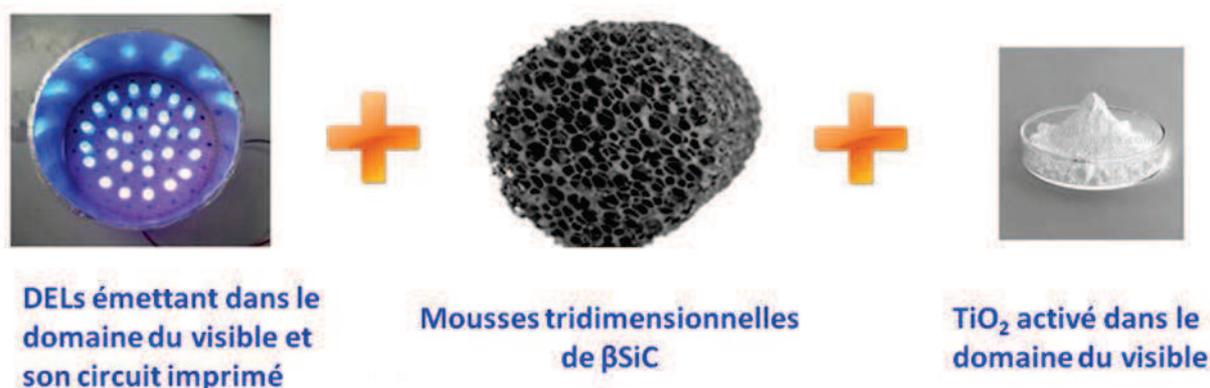


Figure 86 Composantes du dispositif de traitement de l'air

La figure 87 présente une vue schématique du module photocatalytique comprenant 40 ou 56 DELs (subdivisé en deux plateaux de 20 ou 28 DELs), un monolithe de mousse de dimensions 65 mm x 40 mm (diamètre x hauteur) et un ventilateur de débit nominal de 10  $\text{m}^3/\text{h}$ . Dans la configuration 56 DELs, toutes les DELs sont allumées, tandis que seules les DELs représentées en blanc sont allumées pour le 40 DELs.

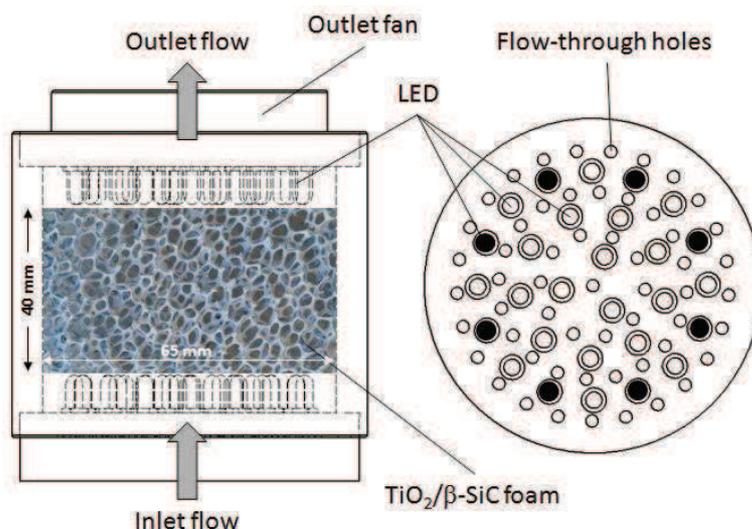


Figure 87 Schéma du réacteur photocatalytique incorporant des DELs et des mousses de MPT 623/ $\beta$ -SiC. Ce dispositif est composé de deux circuits imprimés de DELs (localisés en entrée et sortie du réacteur) et d'un ventilateur ayant un débit nominal de  $10 \text{ m}^3/\text{h}$ . Dans la configuration 56 DELs, toutes les DELs sont allumées alors que pour le 40 DELs, seules celles qui de couleurs blanches sont allumées. La distribution des DELs pour les deux circuits imprimés (supérieur et inférieur) est équivalente.

## 1.2. Le support

Les mousses utilisées dans ce travail ont été produites par la société Sicat Catalyst (Willstätt, Allemagne) selon le procédé dit « à mémoire de forme » (Shape Memory Synthesis) qui, appliqué aux mousses, consiste à convertir une préforme de mousse en polyuréthane en une mousse de  $\beta$ -SiC, tout en conservant sa forme macroscopique originelle.<sup>380,382,383,384,385</sup> Cette méthode assure non seulement une grande liberté dans la géométrie et les propriétés physico-chimiques des mousses monolithiques préparées, mais permet aussi de développer des monolithes auto-liés de surface spécifique moyenne ( $\approx 20 \text{ m}^2/\text{g}$ ), par comparaison aux matériaux à base de carbure de silicium de type alpha.

Ces mousses ont été modélisées à l'ICPEES comme un empilement tri-dimensionnel de dodécaèdres pentagonaux réguliers, et sont classiquement caractérisés par leur taille moyenne d'alvéole (ou de cellule), leur taille moyenne de fenêtre et leur taille moyenne de pont (figure 88). Les mousses utilisées dans ces dispositifs possèdent une taille moyenne d'alvéole de  $5400 \mu\text{m} \pm 700 \mu\text{m}$ . Elles présentent une porosité très ouverte ( $> 95\%$ ) qui permet :

- la fixation du photocatalyseur dans le dispositif
- la circulation du fluide à traiter sans entraîner trop de perte de charge (figure 89), par comparaison aux filtres ou préfiltres de type G4 et HVAC utilisés en traitement de l'air.
- la transmission de la lumière dans la structure de la mousse.

<sup>382</sup> Ledoux M.J, Keller N, Pham-Huu C, **Le carbure de silicium : un nouveau support pour la catalyse hétérogène.** *Actualité Chimique* 2002, **10**:8-18

<sup>383</sup> Lacroix M : **Optimisation et caractérisation d'un nouveau support catalytique à base de mousses alvéolaires de  $\beta$ -SiC : application à la synthèse de Fischer-Tropsch.** Thèse de l'Université de Strasbourg, 2008.

<sup>384</sup> Vanhaecke E : **Supports de catalyseurs à base de mousse de  $\beta$ -SiC.** Thèse de l'Université de Strasbourg, 2008.

<sup>385</sup> Kouamé A.N, Masson R, Robert D, Keller N, Keller V :  **$\beta$ -SiC foams as promising structured photocatalytic support for water and air detoxification.** *Catalysis Today* 2013, **209**:13-20.

Elles jouent également un rôle de mélangeur statique, qui permet une augmentation des probabilités de contact avec les parois.

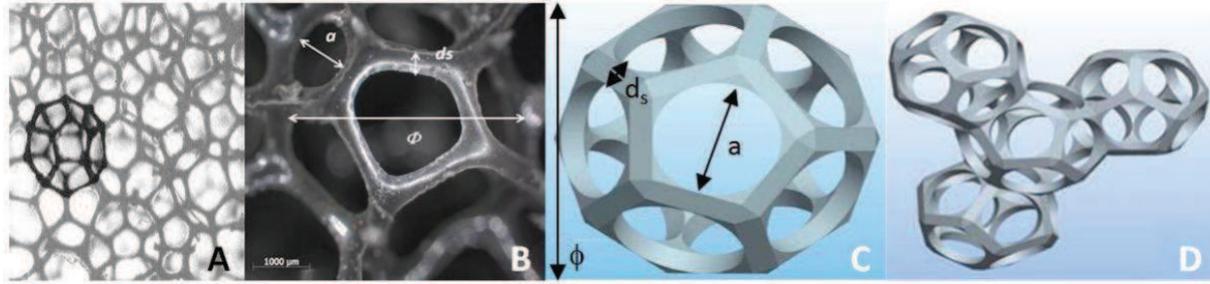


Figure 88 Connexions entre les cellules dans une mousse de polyuréthane (A) ; principaux paramètres géométriques caractéristiques des mousses alvéolaires (B) modèle de dodécaèdre pentagonal régulier conçu par Edouard *et al.* (C) et empilement tri-dimensionnel des dodécaèdres (D) <sup>386,387</sup> extrait de <sup>380</sup>

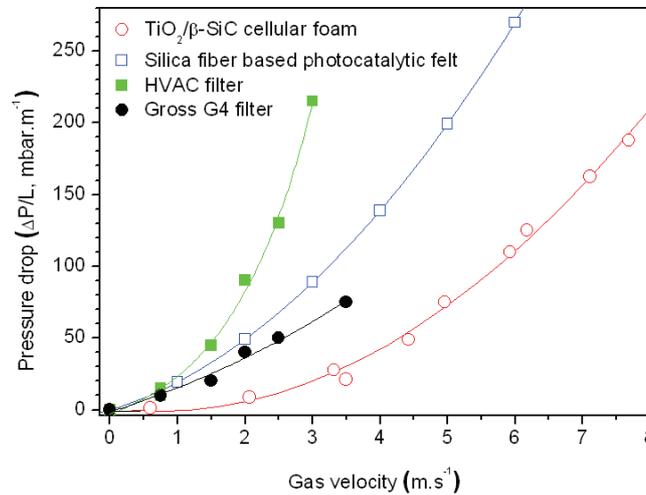


Figure 89 Comparaison des pertes de charge en fonction de la vitesse de passage de l'air pour une mousse alvéolaire de taille moyenne d'alvéole 5400 µm, le média photocatalytique Quartzel® et des filtres de type G4 et HVAC. Remarque : les données des filtres G4 et HVAC sont des données « Saint-Gobain ». Celles du média Quartzel®, fournies par Saint-Gobain, ont été vérifiées à l'ICPEES.

Ces matériaux, initialement développés pour des applications en catalyse thermique, sont aujourd'hui utilisés comme support photocatalytique pour le traitement de l'air et de l'eau. <sup>385</sup>

### 1.3. Le photocatalyseur

En raison du coût élevé des DELs émettant avec une forte irradianc centrée dans le domaine des UV-A et de l'inexistence à l'heure actuelle de photocatalyseurs commerciaux permettant une activité réellement dans le domaine du visible pour lequel le coût des DELs devient très compétitif, les résultats obtenus en minéralisation de la méthyléthylcétone ont montré l'intérêt d'associer le photocatalyseur MPT 623 de Ishihara Sangyo Kaisha (actif dans le début du visible) à des DELs dont le maximum d'irradiance est centré sur 392 nm avec une largeur

<sup>386</sup> Edouard D, Lacroix M, Pham C, Mbodji M, Pham-Huu C: **Experimental measurements and multiphase flow models in solid SiC foam beds.** *AIChE Journal* 2008, **54**(11):2823-2832.

<sup>387</sup> Huu TT, Lacroix M, Pham Huu C, Schweich D, Edouard D: **Toward a more realistic modeling of solid foam: use of the pentagonal dodecahedron geometry.** *Chemical Engineering Science* 2009, **64**(24):5131-5142.

spectrale  $\Delta \lambda = 15 \text{ nm}$  (figure 90). On peut donc considérer les DELs utilisées comme des DELs UV-Vis permettant une activation du  $\text{TiO}_2$  à la fois dans le début des UV-A et dans le début du visible. Il s'agit d'un compromis coût-efficacité. La puissance électrique des DELs VL390-5-15 fournies par le fabricant (Roithner Laser Technik, Autriche) est de 8,1 à 11,5 mW tandis que l'irradiance totale a été mesurée à proximité directe des DELs à environ  $11,7 \pm 2,0 \text{ mW/cm}^2$ .

Peu d'informations sont fournies par Ishihara Sangyo Kaisha, mais le  $\text{TiO}_2$  MPT 623 est un  $\text{TiO}_2$  de structure rutile modifié au platine (nous ne savons pas comment), et de surface spécifique environ  $60 \text{ m}^2/\text{g}$ .

Le procédé d'imprégnation du  $\text{TiO}_2$  consiste à tremper la mousse de  $\beta$ -SiC dans une suspension de  $\text{TiO}_2$  MPT 623 à 100 g/L dans de l'eau distillée, puis à désobstruer les alvéoles de la mousse à l'air comprimé (si nécessaire) et à sécher la mousse à  $100^\circ\text{C}$ , et de répéter ces opérations jusqu'à obtention de la masse désirée (figure 91). Dans notre cas, les photocatalyseurs  $\text{TiO}_2/\beta$ -SiC préparés ont une taille moyenne d'alvéole de  $5400 \mu\text{m}$  et ont une teneur en  $\text{TiO}_2$  de  $9,2 \% \pm 0,2 \%$ . Les travaux de Romain Masson ont montré que pour ce type de mousses, la charge optimale en  $\text{TiO}_2$  se situait à environ 10 %.<sup>380</sup>

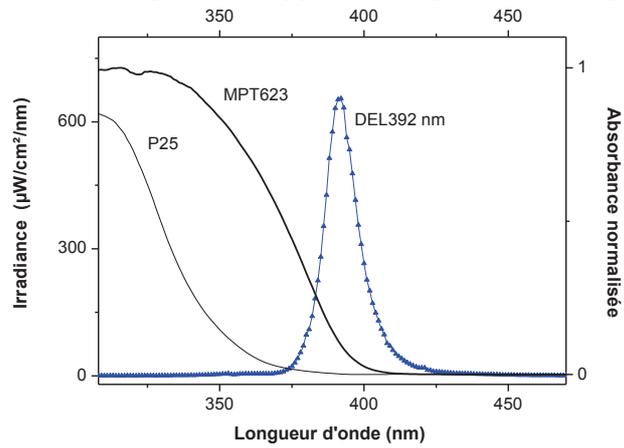


Figure 90 Spectres d'émission des DELs et d'absorption du  $\text{TiO}_2$  MPT 623 et du  $\text{TiO}_2$  P25

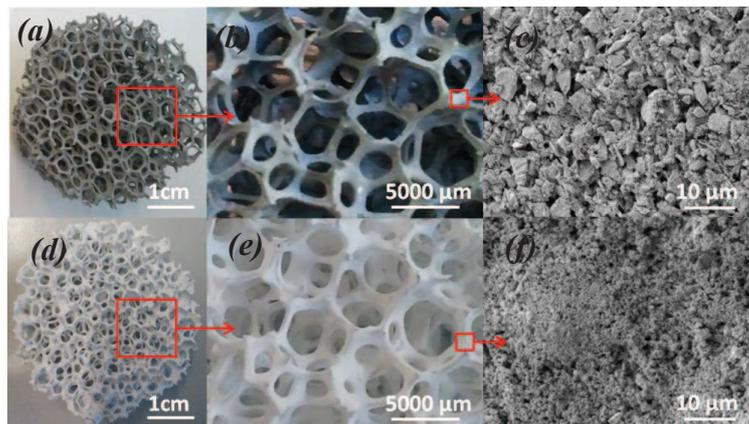


Figure 91 Mousses de  $\beta$ -SiC de taille moyenne d'alvéole  $5400 \mu\text{m}$ , avant ((a), (b), (c)) et après imprégnation ((d), (e), (f)) de  $\text{TiO}_2$

## **2. Protocole de test sur phages T2 de *E.coli***

### **2.1. La chambre de test**

La chambre de test est une boîte à gants d'un volume de 0,8 m<sup>3</sup> (figure 92). La boîte à gants est une enceinte hermétique qui est équipée : d'un double SAS (point 1) permettant de faire passer du matériel de l'intérieur vers l'extérieur et inversement ; de différents hublots (points 2 et 3) pouvant être équipés de gants permettant de travailler sans risque de contamination ; de systèmes de dépressurisation (point 4) et de repressurisation (point 6) couplés à des filtres HEPA (point 5). L'enceinte est ainsi hermétique et tout risque de contamination de l'intérieur vers l'extérieur ou inversement est assuré.<sup>377</sup>

Cette chambre hermétique est équipée d'un système de recirculation de l'air de 30 m<sup>3</sup>/h (débit nominal).

Au sein de la chambre de test, l'aérosolisation des microorganismes est assurée à l'aide d'un nébulisateur commercial.



**Figure 92** Boîte à gants faisant office de chambre de test d'un volume de 0,8 m<sup>3</sup> équipée : d'un double SAS (1), de hublots équipée de gants (2 et 3) ; d'un système de dépressurisation (4) et d'un filtre HEPA (5) ; ainsi que d'un système de repressurisation également équipé d'un filtre HEPA (6)

### **2.2. Protocole de test**

#### **Description du bioaérosol de phages T2 d'*E.coli***

Une unique suspension de phages T2 à 9.10<sup>6</sup> phages/mL est utilisée. Avant chaque expérience 5 mL de cette suspension phagique additionnée de MgSO<sub>4</sub> stérile sont aérosolisés, de sorte que l'on ait une contamination initiale dans la chambre d'environ 3,8 10<sup>7</sup> phages/m<sup>3</sup>.

Après aérosolisation (d'une durée d'environ 30 min), l'échantillonnage est réalisé lors des tests de décontamination en fonction du temps par impactage des virus sur milieux gélosés en boîte de Pétri (diamètre 14 cm).

#### **L'impactage**

Pour ce test sur phages T2 d'*E.coli*, nous avons utilisé des milieux gélosés Luria Bertani (LB) (Difco).

L'impactage est réalisé en maintenant ces milieux en sortie du dispositif photocatalytique pendant une durée de 60 secondes, à l'aide des gants de l'isolateur. Les prélèvements (échantillonnages) sont réalisés toutes les 10 min sur une durée de test de 60 min, et pour chaque prélèvement deux boîtes sont réalisées.

### Ajout de la suspension bactérienne de *E.coli* sur les phages

Afin de visualiser les plages de lyse, la souche hôte *E.coli* sensible doit être ajoutée rapidement sur les phages qui se sont impactés sur les milieux gélosés LB. Pour ce faire 50 mL de milieu LB liquifié sontensemencés de 100  $\mu$ L d'une suspension bactérienne d'*E.coli* en phase exponentielle de croissance ( $DO_{600nm}$ : 0,5). 5 mL de cette préparation sont ajoutés à la surface de chaque milieu gélosé.

### Incubation et comptage

Les milieux gélosés LB sont mis à incuber pendant 24 h à 37°C. Les plages de lyse sont comptabilisées le lendemain si besoin à l'aide d'une loupe (figure 93).

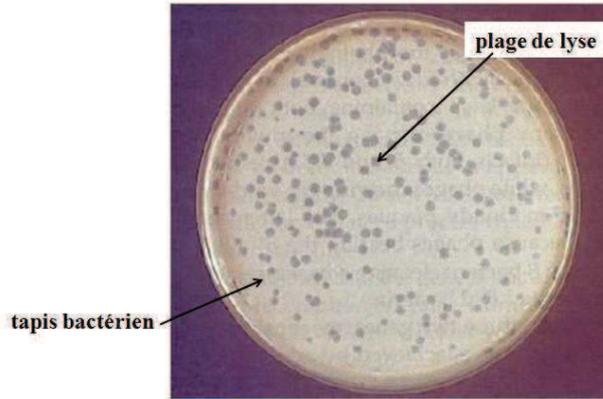


Figure 93 Milieu gélosé LB ensemencé de la souche hôte *E.coli* infectée par les virus T2 (plage de lyse)

## 3. Résultats

### 3.1. Principe

Pour chaque contaminant testé, il est nécessaire de déterminer :

- la **tenue de l'aérosol** au cours du temps lorsque seul le ventilateur de la chambre de test fonctionne. Afin d'évaluer l'efficacité de décontamination par filtration et photocatalytique, la tenue de l'aérosol dans la chambre au cours du temps a été prise en considération, pour tenir compte de la possible instabilité du bioaérosol lors du test et du fait que les bioaérosols ont tendance à s'impacter sur les parois de la boîte à gants, ou sur les pales du ventilateur de la chambre de test, ce qui cause une décroissance « naturelle » en contaminant (par « naturelle » on entend non due à la présence du module).
- l'**efficacité de filtration** du module lorsque les deux ventilateurs, celui de la chambre de test et celui du prototype photocatalytique fonctionnent. Ces tests réalisés DELs non allumées prennent en compte le possible impactage des virus dans les mousses et donc permettent d'évaluer l'efficacité de filtration du module et des mousses.
- l'**efficacité de décontamination** du module, que l'on peut considérer comme une efficacité de filtration photocatalytique (ventilateurs en fonctionnement et DELs allumées). Dans cette condition, la cinétique obtenue sera comparée à la courbe témoin de la tenue de l'aérosol dans la chambre et à la courbe correspondant à la filtration des mousses.

### 3.2. Calcul des constantes cinétiques de temps

Afin d'apprécier la cinétique de décontamination obtenue pour le prototype, nous avons utilisé le modèle de fit suivant correspondant à une cinétique de décontamination apparente du 1<sup>er</sup> ordre, caractérisée par une constante de temps apparente  $\tau$  :

$$\% C(t) = 100\% \exp(-t/\tau)$$

Cette constante de temps  $\tau$  est ensuite corrigée à l'aide des formules suivantes pour tenir compte de la constante de temps apparente des tests témoins, liée à la tenue de l'aérosol dans la chambre:

$$\%C^{corr.}(t) = \frac{\%C^{on}(t)}{\%C^{off}(t)} = \frac{100\% \cdot e^{-\frac{t}{\tau_{on}}}}{100\% \cdot e^{-\frac{t}{\tau_{off}}}} = 100\% \cdot \left( e^{-\frac{t}{\tau_{on}} + \frac{t}{\tau_{off}}} \right)$$

$$\tau^{corr.} = \frac{\tau_{on} \tau_{off}}{\tau_{off} - \tau_{on}}$$

$\tau_{ON}$  : constante de temps apparente pour un fonctionnement du dispositif en mode filtration (DELs OFF et ventilation ON) et en mode filtration photocatalytique (DELs et ventilation ON).

$\tau_{OFF}$  : constante de temps apparente correspondant à la stabilité de l'aérosol dans la chambre.

### 3.3. Résultats des tests sur les phages T2 d'*E.coli*

L'évolution de la contamination (pourcentage de la quantité initiale) en fonction du temps pour les différents modules est présentée en figure 94 pour les phages T2 d'*E.coli* et les constantes de temps apparentes pour chaque condition sont présentées dans le tableau 28.

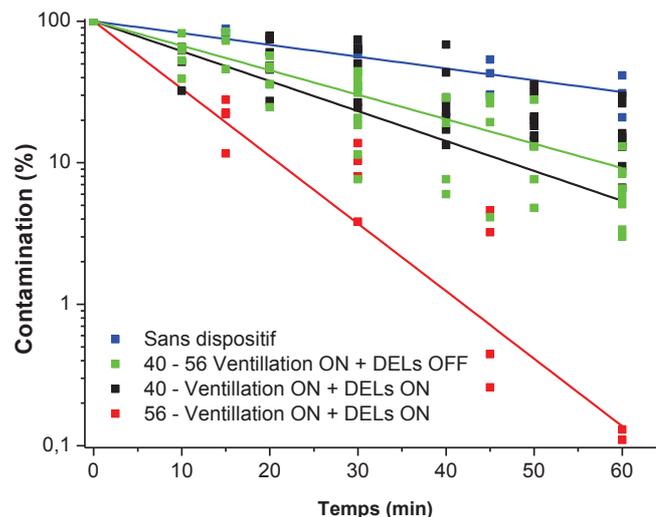


Figure 94 Cinétiques de décontamination d'un bioaérosol de phages T2 d'*E.coli* obtenues avec les deux modules photocatalytiques équipés de 40 et 56 DELs. En plus de la tenue de l'aérosol dans la chambre de test, on distingue l'efficacité de filtration photocatalytique (traits pleins noir et rouge, ventilation ON et DELs ON), de l'efficacité de filtration pure (trait plein vert, ventilation ON et DELs OFF)

**Tableau 29 Détermination des différentes constantes de temps apparentes obtenues pour les 2 modules photocatalytiques (40 et 56 DELs), non corrigées et corrigées pour tenir compte de la tenue de l'aérosol dans la chambre**

Série de tests	Constante de temps apparente (min)	Constante de temps apparente corrigée (min)
Blanc (tenue de l'aérosol – sans module)	$\tau^{\text{OFF}} = 52$ min	$\tau^{\text{OFF}} = 52$ min
Dispositif <b>40 - 56 DELs</b> avec ventilation (ventilation ON + DELs OFF)	$\tau^{\text{ON}} = 25$ min	$\tau^{\text{Corr}} = 48$ min
Dispositif <b>40 DELs</b> en fonctionnement (ventilation ON + DELs ON)	$\tau^{\text{ON}} = 21$ min	$\tau^{\text{Corr}} = 35$ min
Dispositif <b>56 DELs</b> en fonctionnement (ventilation ON + DELs ON)	$\tau^{\text{ON}} = 9$ min	$\tau^{\text{Corr}} = 11$ min

La figure 94 montre que la réduction la plus importante pour les phages T2 d'*E.coli* a été obtenue avec le module 56 DELs pour lequel nous pouvons observer une réduction de **3 log** après **60 min de fonctionnement**. Cette décontamination correspond à une constante de temps apparente corrigée de l'ordre de **11 min** (tableau 29).

Il est très intéressant de noter que l'utilisation des mousses monolithiques alvéolaires permet au système de développer des propriétés de filtration envers les microorganismes, avec une constante de temps apparente corrigée de la tenue de l'aérosol de 48 min pour les modules 40 et 56 DELs. En effet, les mousses alvéolaires sont connues pour développer des propriétés de filtration, par exemple les mousses métalliques (appelées metfoams) ou les mousses en  $\beta$ -SiC. Les mousses de  $\beta$ -SiC obtenues par synthèse SMS ont déjà été utilisées avec succès pour des applications de filtration de particules carbonées dans le domaine des échappements automobiles.<sup>384,388,389</sup>

Dans ce cas, l'obtention d'une filtration efficace pour des particules de taille 10 – 1000 nm nécessitait des tailles d'alvéoles de mousse beaucoup plus petites que celles que nous utilisons (*i.e.* comprises entre 1100 – 1750  $\mu\text{m}$  contre 5400  $\mu\text{m}$  dans notre cas). C'est pourquoi, l'effet filtrant résultant de l'impactage des microorganismes sur les parois des alvéoles demeure faible dans notre cas en raison de la porosité très ouverte des mousses. La figure 94 et la détermination des constantes de temps apparentes met bien en évidence que la décontamination par photocatalyse est supérieure à celle résultant de l'action filtrante des mousses, avec des constantes de temps apparentes corrigées de 35 min et 11 min pour respectivement les systèmes à 40 DELs et 56 DELs. Ces valeurs sont très intéressantes (surtout celle obtenue avec le dispositif 56 DELs) comparées à celles obtenues pour un

<sup>388</sup> Vanhaecke E, Ivanova S, Deneuve A, Ersen O, Edouard D, Winé G, Nguyen P, Pham C, Pham-Huu C: **1D SiC decoration of SiC macroscopic shapes for filtration devices**. *Journal of Materials Chemistry* 2008, **18**(39):4654-4662.

<sup>389</sup> Vanhaecke E, Pham-Huu C, Edouard D: **Simulation and experimental measurement of dynamic behavior of solid foam filter for diesel exhaust gas**. *Catalysis Today* 2012, **189**(1):101-110.

réacteur photocatalytique tangentiel développé à l'ICPEES, il y a quelques années.<sup>377,379</sup> Ce réacteur permettait d'obtenir pour le virus T2 d'*E.coli* une constante de temps apparente de 24 min (pour un même volume à décontaminer, mais un débit de recirculation de 140 m<sup>3</sup>/h !), en utilisant une lampe UV-A de puissance 24 W. Evidemment, il convient de rester prudent dans de telles comparaisons, car les systèmes et les conditions de fonctionnement sont différents, mais ces résultats montrent cependant que ces systèmes compacts associant des mousses monolithiques alvéolaires et des DELs comme source d'irradiation sont particulièrement prometteurs. Il conviendra évidemment de comparer à l'avenir ces systèmes à des dispositifs commerciaux, en considérant, outre les aspects de performances, les aspects économiques et environnementaux.

## **II. Développement de textiles fonctionnalisés photocatalytiques à activité auto-désinfectante sous lumière solaire**

A visée également applicative, cette partie a pour but d'étudier et d'évaluer l'activité auto-désinfectante sous illumination solaire de textiles photocatalytiques obtenus par fonctionnalisation selon la méthode Layer-by-Layer (LbL) ou multicouches. Cette méthode de fonctionnalisation de textiles est utilisée à l'ICPEES pour élaborer des textiles photocatalytiques auto-décontaminants envers les molécules chimiques (par exemple : diméthyl méthylphosphonate pour des applications ciblant les agents chimiques de guerre<sup>390,391,392,393</sup>) ou épurants (par exemple pour la dégradation d'H<sub>2</sub>S, de la méthyléthylcétone et de l'acétaldéhyde<sup>394</sup>) dans le cadre d'applications en traitement de l'air intérieur.

Cette partie est donc une étude préliminaire à visée applicative afin d'évaluer le potentiel antibactérien de textiles fonctionnalisés par la méthode LbL. Il s'agit notamment de déterminer si les textiles fonctionnalisés peuvent tirer profit de la coexistence dans les multicouches de TiO<sub>2</sub> et de polyélectrolytes. C'est pourquoi deux polyélectrolytes différents ont été utilisés pour construire les multicouches, le polyéthylèneimine (PEI)<sup>390,391,392,393,394</sup> et le polystyrène sulfonate (PSS),<sup>394,395</sup> qui sont utilisés à l'ICPEES avec succès pour différentes applications.

Précisons qu'il ne s'agit donc pas dans cette partie de procéder à des caractérisations détaillées des textiles fonctionnalisés ni à optimiser la technique de fonctionnalisation en termes de stabilité mécanique notamment.

---

<sup>390</sup> Grandcolas M: **Étude de matériaux et textiles à base de dioxyde de titane pour la dégradation photocatalytique d'agents chimiques**. Thèse de l'Université de Strasbourg, 2009.

<sup>391</sup> Grandcolas M, Sinault L, Mosset F, Louvet A, Keller N, Keller V: **Self-decontaminating layer-by-layer functionalized textiles based on WO<sub>3</sub>-modified titanate nanotubes. Application to the solar photocatalytic removal of chemical warfare agents**. *Applied Catalysis A: General* 2011, **391**:455-467.

<sup>392</sup> Grandcolas M, Louvet A, Keller N, Keller V: **Layer-by-Layer deposited titanate-based nanotubes for solar photocatalytic removal of chemical warfare agents from textiles**. *Angewandte Chemie International Edition* 2009, **48**(1):161-4.

<sup>393</sup> Möller-Siegert J, Keller N, Keller V: **Optimization of sprayed Layer-by-Layer deposition of titanium dioxide on textiles for photocatalytic self-decontamination from chemical warfare stimulants under UVA and simulated solar irradiation**. *Applied Catalysis B*, submitted.

<sup>394</sup> Dontsova D: **Titania based photocatalytically active layer-by-layer coatings on model surfaces and textile materials**. Thèse de l'Université de Strasbourg, 2011.

<sup>395</sup> Dontsova D, Keller V, Keller N, Steffanut P, Félix O, Decher G: **Photocatalytically active polyelectrolyte/nanoparticle films for the elimination of a model odorous gas**. *Macromolecular Rapid Communications* 2011, **32**(15):1145-1149.

# 1. Fonctionnalisation Layer-by-Layer et techniques de caractérisation des textiles

## 1.1. Dépôt de TiO<sub>2</sub> par la technique LbL

La méthode de fonctionnalisation Layer-by-Layer peut être mise en œuvre par immersion du textile dans les différentes solutions (de polyélectrolyte, aqueuse de rinçage) ou suspensions (de TiO<sub>2</sub>). Une alternative est la pulvérisation de ces solutions et suspensions sur le textile, ce qui correspond à un dépôt Layer-by-Layer par spray. C'est cette deuxième méthode, par spray, qui a été retenue pour fonctionnaliser les textiles dans cette étude.

### Type de textile fonctionnalisé

Dans le cadre de cette étude, des textiles 100 % polyester ont été utilisés.

### Dépôts des multicouches (PEI/TiO<sub>2</sub>) et (PSS/TiO<sub>2</sub>) sur polyester par spray

Lors de cette étude de mise au point de textiles auto-désinfectants par technique LbL, l'influence de différents paramètres a été étudiée :

- la composition des multicouches en polyélectrolytes :
  - polycation polyéthylèneimine/TiO<sub>2</sub> P25 (noté PEI/TiO<sub>2</sub>)
  - polyanion polystyrène sulfonate/TiO<sub>2</sub> P25 (noté PSS/TiO<sub>2</sub>)
- le nombre de bicouches
- l'effet d'un prétraitement du textile à KOH.

#### ✓ Effet d'un prétraitement à KOH

Le prétraitement à KOH a pour effet d'hydrolyser les fonctions esters du polyester, et ainsi crée plus de groupements OH et acide en surface (figure 95). Certains auteurs indiquent qu'un traitement à KOH augmente la rugosité de surface des fibres polyester. Pour notre étude, le textile a été introduit dans un bécher avec une solution aqueuse de KOH à 0,5 M pendant 30 min sous agitation orbitale puis il a été rincé à l'eau distillée jusqu'à pH neutre, et séché pendant 5 min à l'étuve à 100°C.

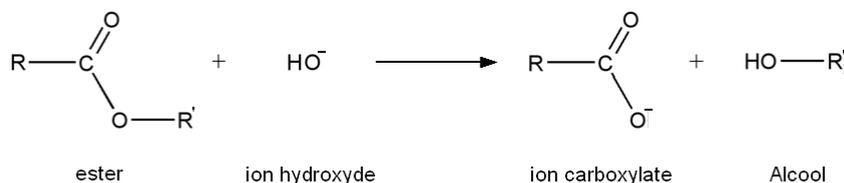


Figure 95 Exemple d'une hydrolyse basique d'une fonction ester

#### ✓ Constitution des bicouches PEI/TiO<sub>2</sub>

Pour la réalisation des bicouches PEI/TiO<sub>2</sub>, le PEI (PEI Lupasol® WF V00002 BASF à 8 g/L dans de l'eau distillée, figure 96) est utilisé en tant que polycation avec l'alternance de nanoparticules de TiO<sub>2</sub> chargées négativement (TiO<sub>2</sub> P25 à 5 g/L ajusté à pH = 9 avec NaOH)

dans un mélange eau/éthanol 50 : 50 en volume). La fonctionnalisation est alors notée  $(PEI/TiO_2)_n$  où  $n$  est le nombre de bicouches.

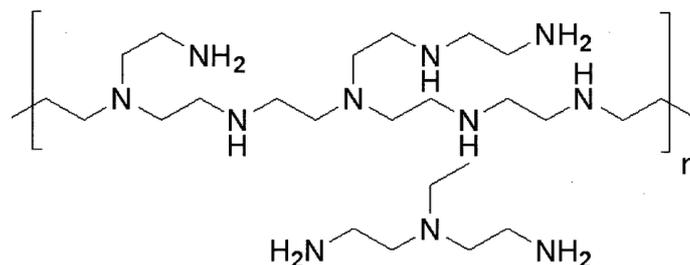


Figure 96 Formule chimique du polyéthylèneimine (PEI) utilisé

✓ Constitution des bicouches PSS/TiO<sub>2</sub>

Pour le dépôt des bicouches de PSS/TiO<sub>2</sub>, une première couche de PEI doit être préalablement déposée sur le textile qui a une charge de surface négative. Cette première couche de PEI (PEI Lupasol® WF V00002 BASF à 8 g/L dans de l'eau distillée) comporte une charge positive et elle permet l'ancrage des couches suivantes de PSS/TiO<sub>2</sub> sur le textile.

Le PSS (PSS à pH 2,5 (HNO<sub>3</sub>) à 1 g/L dans de l'eau distillée, figure 97) est utilisé en tant que polyanion avec cette fois-ci des nanoparticules de TiO<sub>2</sub> chargées positivement (TiO<sub>2</sub> P25 à pH = 2,5 ajusté avec HNO<sub>3</sub>, à 10 g/L dans un mélange eau/éthanol). La fonctionnalisation est alors notée PEI/(PSS/TiO<sub>2</sub>)<sub>n</sub> où  $n$  est le nombre de bicouches.

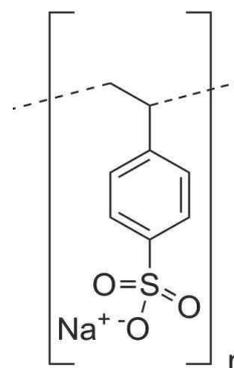


Figure 97 Formule chimique du polystyrène sulfonate (PSS)

Un exemple de polyester prétraité à KOH et fonctionnalisé avec 3 bicouches de PSS/TiO<sub>2</sub> est schématisé en figure 98.

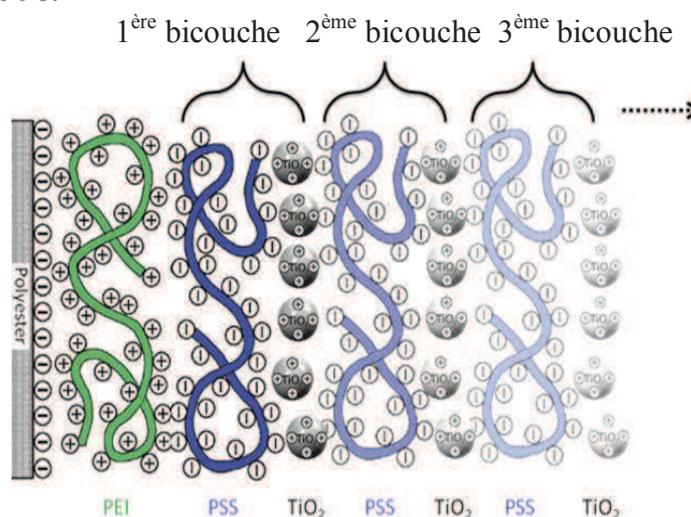
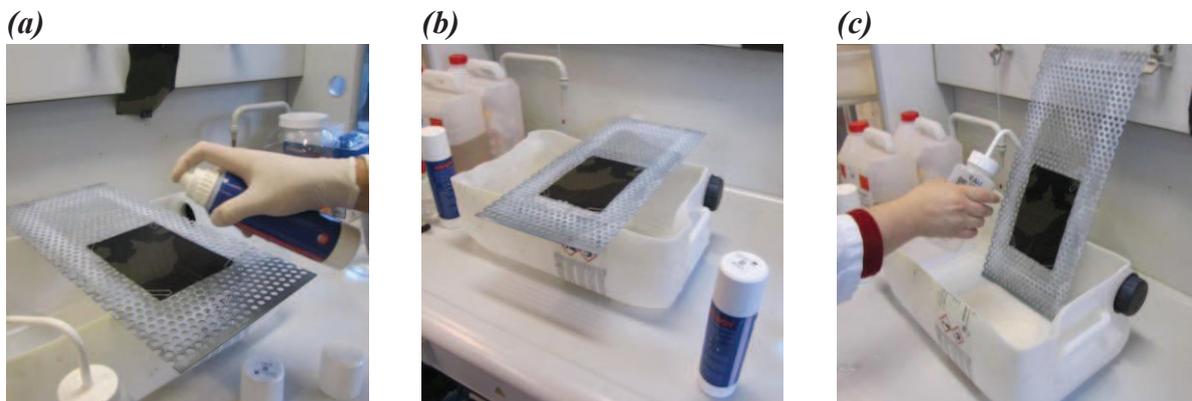


Figure 98 Exemple de composition d'un textile polyester prétraité au KOH avec une couche de PEI et 3 bicouches de PEI/(PSS/TiO<sub>2</sub>)

**Réalisation**

Sur polyester prétraité à KOH ou non, les différentes couches de polyélectrolytes et de TiO<sub>2</sub> sont déposées comme suit (figure 99) :

- 1) le PEI contenu dans la bombe manuelle en spray de pression 1 bar est pulvérisé (20 s, en réalisant deux lignes croisées), sur le textile posé sur une grille maintenue horizontalement. Cette pulvérisation s'effectue à environ 15 à 20 cm du textile
- 2) le textile est maintenu horizontalement sur la grille pendant 10 min
- 3) l'excès de PEI est éliminé par rinçage à l'ED et dans ce cas la grille est maintenue de manière verticale
- 4) le textile est mis à sécher pendant 5 min à l'étuve à 100 °C
- 5) dans le cas de
  - PEI/TiO<sub>2</sub>, la suspension de TiO<sub>2</sub> est vaporisée de la même manière que dans le 1). L'excès de TiO<sub>2</sub> est éliminé par rinçage à l'ED (étape 3) puis le textile est séché (étape 4). Ceci constitue donc la première bicouche. Cette séquence est réalisée n fois.
  - PEI/(PSS/TiO<sub>2</sub>), le PSS et TiO<sub>2</sub> sont ajoutés avec le même mode opératoire que décrit précédemment. Ceci constitue donc la première bicouche de PSS/TiO<sub>2</sub> qui peut être réalisée n fois.
- 6) après réalisation de la dernière bicouche, le textile est mis à sécher à l'air ambiant pendant 1 journée ou mis à l'étuve à 130 °C pendant 30 min.



**Figure 99** Différentes étapes de la fonctionnalisation de textiles : pulvérisation pendant 20 s en lignes croisées (de la solution de polyélectrolyte ou de la suspension de TiO<sub>2</sub>) à l'aide d'une bombe en spray (pression 1 bar) tenue horizontalement à environ 15-20 cm des tissus déposés sur une grille (a) ; après chaque couche déposée, le textile reste posé sur cette grille pendant 10 min afin de favoriser les interactions électrostatiques entre les composés de charge opposée (b) ; le textile est ensuite rincé abondamment en maintenant la grille de façon verticale, il est ensuite mis à l'étuve à 100 °C pendant 5 min (c)

**Nomenclature des différents textiles fonctionnalisés**

Au total, 13 textiles ont été fonctionnalisés, parmi lesquels 4 n'ont pas subi de prétraitement à KOH (notés A', B', C' et H') et 9 ont été prétraités à KOH (notés A, B à I) (tableau 30). Ces textiles varient par :

- leur composition chimique en bicouches (PEI ; PSS)
- le nombre de bicouches déposées.

**Tableau 30 Nomenclature des différents textiles en polyester fonctionnalisés, soit sans prétraitement à KOH, soit avec prétraitement à KOH**

<b>Sans prétraitement à KOH</b>	<b>Avec prétraitement à KOH</b>
A' : PES	A : PES KOH
B' : PES+ PEI	B : PES KOH + PEI
C' : PES+PEI + PSS	C : PES KOH + PEI + PSS
H' : PES+ PEI + (PSS/TiO <sub>2</sub> ) <sub>10</sub>	D : PES KOH + (PEI/TiO <sub>2</sub> ) <sub>1</sub>
	E : PES KOH + PEI + (PSS/TiO <sub>2</sub> ) <sub>1</sub>
	F : PES KOH + PEI + (PSS/TiO <sub>2</sub> ) <sub>5</sub>
	G : PES KOH + (PEI/TiO <sub>2</sub> ) <sub>5</sub>
	H : PES KOH + PEI + (PSS/TiO <sub>2</sub> ) <sub>10</sub>
	I : PES KOH + (PEI/TiO <sub>2</sub> ) <sub>10</sub>

**1.2. Techniques de caractérisation des textiles**

Deux techniques ont été utilisées afin de caractériser ces dépôts : l'analyse thermogravimétrique (ATG) qui renseigne sur la quantité de TiO<sub>2</sub> déposée sur le textile et la microscopie électronique à balayage (MEB) qui donne une information plus visuelle et permet d'apprécier la répartition du TiO<sub>2</sub> sur les fibres.

**Analyse thermogravimétrique (ATG)**

L'ATG consiste à mesurer la variation de la masse d'un échantillon en fonction de la température. Cette technique permet de déterminer la quantité de TiO<sub>2</sub> déposée sur le textile, puisque le textile est brûlé sous air.

Ces mesures ont été effectuées avec l'appareil TGA Q5000 de TA Instrument. Il est équipé d'une micro-balance (sensible à  $\pm 0,1 \mu\text{g}$ ) et d'une nacelle en platine dans laquelle est déposé l'échantillon (surface de textile d'environ  $5 \text{ mm}^2$ ). Durant l'analyse, le textile est tout d'abord séché pendant 60 min à 180 °C dans le four d'analyse, puis l'analyse est réalisée sous flux d'air de 20 mL/min jusqu'à 900°C avec une rampe de température de 15°C/min. La température finale est alors maintenue pendant 15 min. La perte de masse est déterminée en considérant comme masse initiale du textile sa masse après séchage à 180 °C afin de ne pas prendre en compte la perte de masse à basse température résultant de l'évaporation de l'eau des fibres textiles.

## **Microscopie électronique à balayage (MEB)**

La microscopie électronique à balayage permet de reconstruire une image de la surface d'un échantillon à l'échelle microscopique. Cette technique est basée sur le principe des interactions électrons-matière. Elle consiste à balayer la surface de l'échantillon avec un faisceau d'électrons et à analyser les électrons secondaires éjectés et issus des couches superficielles de l'échantillon. La quantité d'électrons collectée est très sensible aux variations de surface de l'échantillon, ce qui permet de réaliser une image topographique de l'échantillon.

Les analyses MEB ont été réalisées sur un microscope JEOL-JSM-6700 F opérant à une tension accélératrice de 1 à 10 kV. Avant toute analyse, un dépôt d'or de quelques angströms est effectué sous vide, afin de réduire les effets de charge se produisant durant les observations d'échantillons peu conducteurs.

## **2. Protocoles des tests**

### **2.1. Etude préliminaire de l'activité cytotoxique du PEI et du PSS en solution : détermination de la CMI et CMB en milieu liquide**

Cette première étude réalisée **en milieu liquide** a pour but d'évaluer l'**activité cytotoxique** sur *E.coli* des deux polyélectrolytes utilisés pour la fonctionnalisation des textiles par LbL (**PEI** et **PSS**). Cette activité cytotoxique a été évaluée à l'aide de la détermination de la CMI et de la CMB. Pour rappel :

- la **CMI** est la concentration minimale inhibitrice, c'est-à-dire **la plus faible concentration** en produit capable d'**inhiber** visuellement toute culture bactérienne après 18 h d'incubation. C'est une bonne indication du pouvoir antibactérien d'un produit.
  - la **CMB** est la concentration minimale bactéricide et correspond à une **réduction de 3 log de l'inoculum initial** (soit la mort d'au moins 99,9 % des bactéries d'un inoculum), c'est une valeur indicatrice du pouvoir bactéricide d'un produit.
- ✓ Détermination de la CMI en PEI et PSS vis-à-vis d'*E.coli*

La détermination de la CMI se fait grâce à une gamme de concentrations en **PEI** et **PSS** en présence d'un inoculum initial de l'ordre de  $10^6$  UFC/mL. Pour chaque produit, des solutions de concentrations de :

- 0,3 g/L à 40 g/L pour le **PEI** (figure 100)
- 0,062 g/L à 8 g/L pour le **PSS**

ont été préparées. La détermination de la CMI se réalise par suivi de densité optique à 620 nm (avec une lecture à  $t_{24}$ ). Elle peut également être déterminée de manière visuelle.

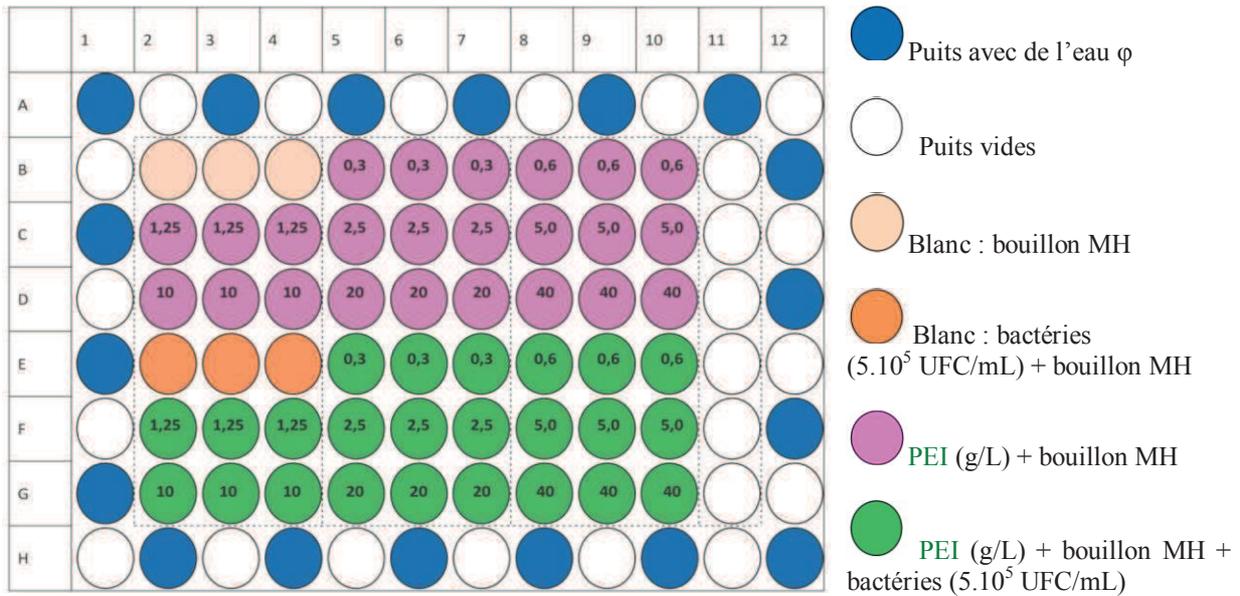


Figure 100 Plan de plaque pour l'évaluation de l'activité cytotoxique du PEI vis-à-vis d'*E.coli*. La concentration en PEI est inscrite au centre des disques.

✓ Détermination de la CMB en PEI et PSS vis-à-vis d'*E.coli*

La CMB est déterminée à partir des puits dans lesquels il n'y a pas eu de croissance bactérienne après 24 h d'incubation. Un aliquot de chaque puits (10 µL) où il n'y a pas eu de croissance en présence de produit est ensemencé sur milieu gélosé TS sous forme de stries. Après incubation 24 h à 37°C, chaque strie apparue est comparée à celles réalisées à partir des dilutions successives de l'inoculum initial (réalisées la veille). La CMB correspond à une diminution de 3 log de l'inoculum initial, les stries obtenues en présence de produit sont comparées à celles obtenues la veille avec le dépôt de 10<sup>3</sup> UFC/mL (figure 101 et figure 102).



Figure 101 Stries obtenues à partir des dilutions successives de l'inoculum initial (de 10<sup>6</sup> UFC/mL à 10<sup>3</sup> UFC/mL), pour *E.coli* après 24 h d'incubation à 37°C



Figure 102 Stries obtenues à partir des puits pour lesquels il n'y a pas eu de croissance visible (à l'œil nu) en présence de PEI (à 1,25 g/L ; et 2,5 g/L), pour *E.coli* après 24 h d'incubation à 37°C

✓ Détermination des rapports CMB/CMI

Par consensus international, il est admis qu'un produit est dit bactéricide si CMB/CMI ≤ 4 et bactériostatique si CMB/CMI > 4.

## 2.2. Protocoles d'évaluation de l'activité antibactérienne des textiles fonctionnalisés

L'évaluation de l'activité antibactérienne des textiles fonctionnalisés a été réalisée selon un protocole dérivé de celui défini dans la norme BS ISO 27447 « Fine ceramics (advanced ceramics, advanced technical ceramics) -- Test method for antibacterial activity of semiconducting photocatalytic materials – partie glass adhesion method-».

Cette activité antibactérienne a été évaluée pour une charge en contaminant bactérien de  $10^7$  UFC/ 4 cm<sup>2</sup> de textile (soit  $2,5 \cdot 10^6$  UFC/cm<sup>2</sup>) et pour une durée d'exposition au rayonnement en chambre solaire de 15, 30 ou 60 min avec une irradiance totale comprise entre 224 et 250 W/m<sup>2</sup>. (Chapitre 2 II.2).

### Dépôt de bactéries sur les textiles

Le protocole de ces expériences est présenté en figure 103. Après avoir préalablement humidifié chaque textile (textile de taille 2 x 2 cm) avec 70 µL d'eau φ, 100 µL de la suspension bactérienne d'*E.coli* à  $10^8$  UFC/mL sont déposés (soit un dépôt bactérien par textile de  $10^7$  UFC). Ce volume de préhumidification du textile a été optimisé afin d'éviter des phénomènes de dessiccation pouvant avoir lieu notamment lors de l'exposition en chambre solaire. Pour chaque textile fonctionnalisé, il est nécessaire d'évaluer les performances antibactériennes obtenues pour :

- un textile sans TiO<sub>2</sub> et conservé à l'obscurité
- un textile sans TiO<sub>2</sub> exposé au rayonnement solaire (effet du rayonnement)
- un textile avec TiO<sub>2</sub> mais conservé à l'obscurité (effet cytotoxique du TiO<sub>2</sub>).
- un textile avec TiO<sub>2</sub> exposé au rayonnement solaire (effet photocatalytique du TiO<sub>2</sub>).

### Conditions opératoires de tests photocatalytiques

Pour chaque expérience (au minimum n=3) deux plaques 6 puits identiques contenant 6 textiles contaminés ont été réalisées. Chaque textile (2 x 2 cm) est localisé au fond d'un puits à fond plat, de diamètre 3 cm et de hauteur 1,3 cm. La première a été placée à 37°C pendant 15, 30 ou 60 min à l'obscurité et la seconde en chambre solaire (irradiance totale comprise entre 224 et 250 W/m<sup>2</sup>) pendant également 15, 30 ou 60 min. Un bécher rempli d'eau a également été ajouté dans la chambre solaire afin de saturer l'atmosphère en eau et de diminuer les phénomènes d'évaporation liés à la chaleur de la source lumineuse. La température dans la chambre et celle au niveau du fond plat de la chambre ont été mesurées à 33-35°C. Une circulation d'eau dans le fond plat de la chambre contribue à maintenir cette température et à éviter tout échauffement excessif.

### Récupération du dépôt bactérien

Chaque textile est ensuite introduit dans un sac stomacher additionné de 10 mL d'eau φ stérile et de tween 80 (2 % volumique). Le tween 80 est un surfactant non-ionique qui va faciliter le décrochage des microorganismes du textile. Le sac est ensuite introduit dans le stomacher. De par son action mécanique, les pales du stomacher vont décrocher les microorganismes du textile. La suspension est ensuite dénombrée après réalisation de dilutions en cascade au

dixième en eau  $\phi$ . 1 mL de chaque dilution est coulé dans la masse en présence de 19 mL de nutriment agar à 50°C. Le milieu nutriment agar préconisé par la norme BS ISO 27447 contient de l'extrait de viande (Beef extract Bacto TM, Difco), de la peptone pancréatique (Peptone pancréatique de gélatine) et de l'agar bactériologique (agar bactériologique type A, Biokar Diagnostics). Afin de visualiser les bactéries non décrochées des fibres de textiles, 5 mL de ce même milieu nutriment agar sont également coulés sur les textiles.

Les milieux sont mis à incuber 24 h à 37°C et un dénombrement est effectué.

### Comparaisons des différentes étapes du protocole de la norme BS ISO 27447 avec notre mode opératoire

Notre mode opératoire diffère de la norme en différents points :

- nous avons **préhumidifié** les textiles avec 100  $\mu$ L d'ED alors que cela n'est pas préconisé dans la norme
- **préparation de l'inoculum bactérien** :
  - norme : différentes subcultures en milieu nutritif nécessitant deux jours de préparation ont été réalisées afin d'obtenir une suspension bactérienne à  $10^7$  UFC/mL
  - nous avons écourté cette étape en repiquant les bactéries sur gélose TS en pente (24 h d'incubation) et en réalisant ensuite une mesure de la  $DO_{620}$  afin d'avoir de 1 à  $3.10^8$  UFC/mL
- **dépôt et charge bactérienne de l'inoculum** sur textile :
  - norme : dépôt de 150  $\mu$ L d'une suspension bactérienne à  $10^7$  UFC/mL
  - nous avons déposé 100  $\mu$ L d'une suspension bactérienne à  $10^8$  UFC/mL
- **taille des textiles** :
  - norme : textile de taille 5 x 5 cm
  - nous avons découpé des textiles de taille 2 x 2 cm afin d'augmenter le nombre de manipulations pouvant être réalisés sur un même échantillon de textile fonctionnalisé (ou non)
- **irradiance appliquée et la durée d'exposition au rayonnement** :
  - norme : exposition des textiles de 4 à 8 h avec une irradiance maximale de 2,5  $W/m^2$  (lampe UV type BLB)
  - nos textiles ont été exposés au rayonnement en chambre solaire avec une irradiance totale comprise entre 224 et 250  $W/m^2$  pendant 15, 30 ou 60 min

Le reste des autres paramètres est commun aux deux modes opératoires comme les textiles utilisés; le volume et la composition du nutriment agar ajouté par boîte de Pétri...

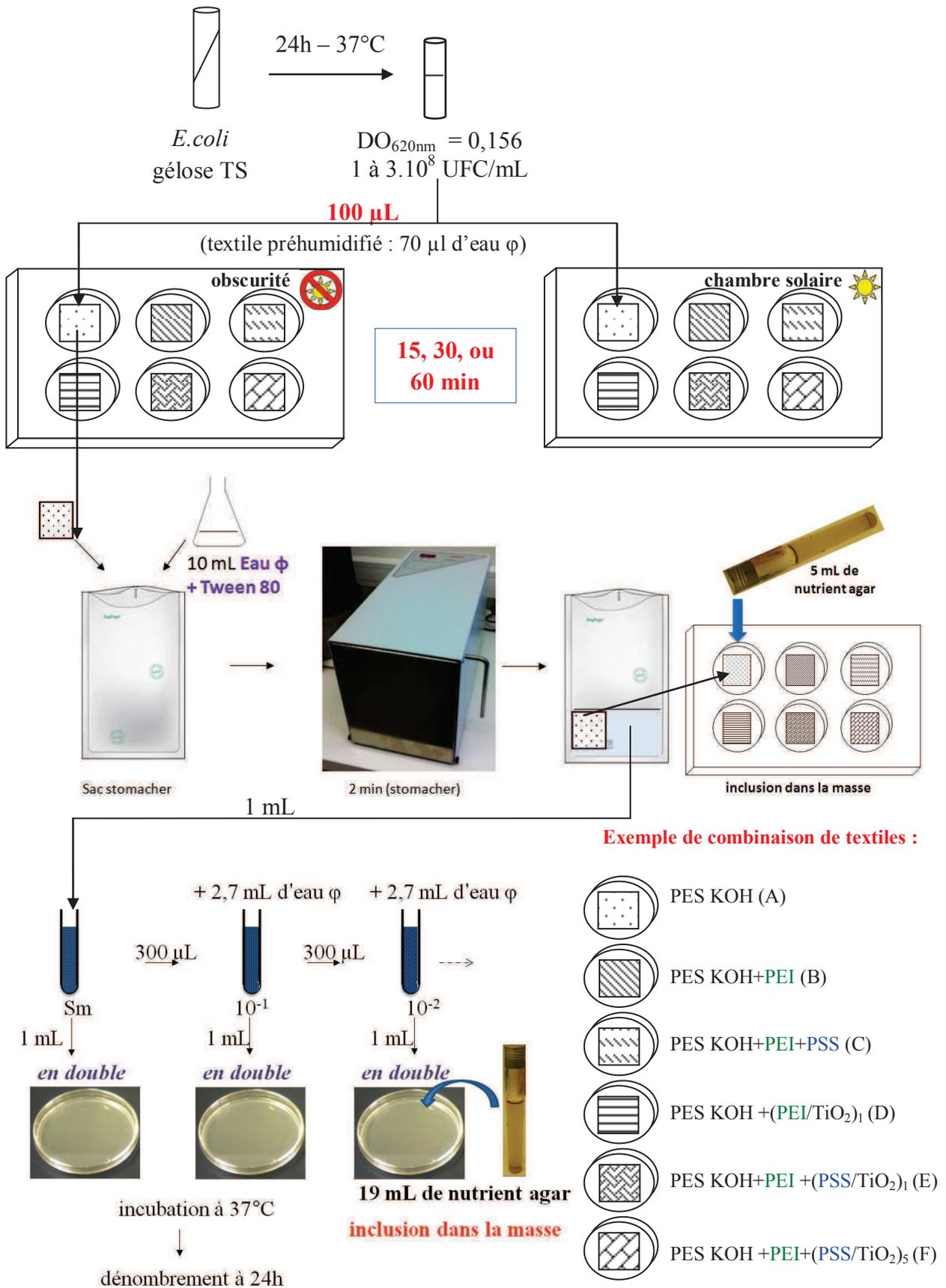


Figure 103 Schéma du protocole de l'évaluation de l'activité antibactérienne sur textiles fonctionnalisés

### 3. Résultats

#### 3.1. Caractérisation des textiles

✓ Polyester sans prétraitement à KOH : PES + (PEI/TiO<sub>2</sub>)<sub>10</sub>

Les images MEB du textile polyester non prétraité à KOH et non fonctionnalisé sont présentées en figures 104 (a) et (b) à différents grossissements. Sur les images MEB du textile polyester sans prétraitement à KOH fonctionnalisé avec dix bicouches de PEI/TiO<sub>2</sub> (figures 104 (b) et (c)), nous pouvons constater que le dépôt de TiO<sub>2</sub> n'est pas uniforme le long des fibres. A grossissement plus important (échelle 10 µm (d)), on peut constater que le TiO<sub>2</sub> s'est fixé en formant des agrégats de quelques micromètres.

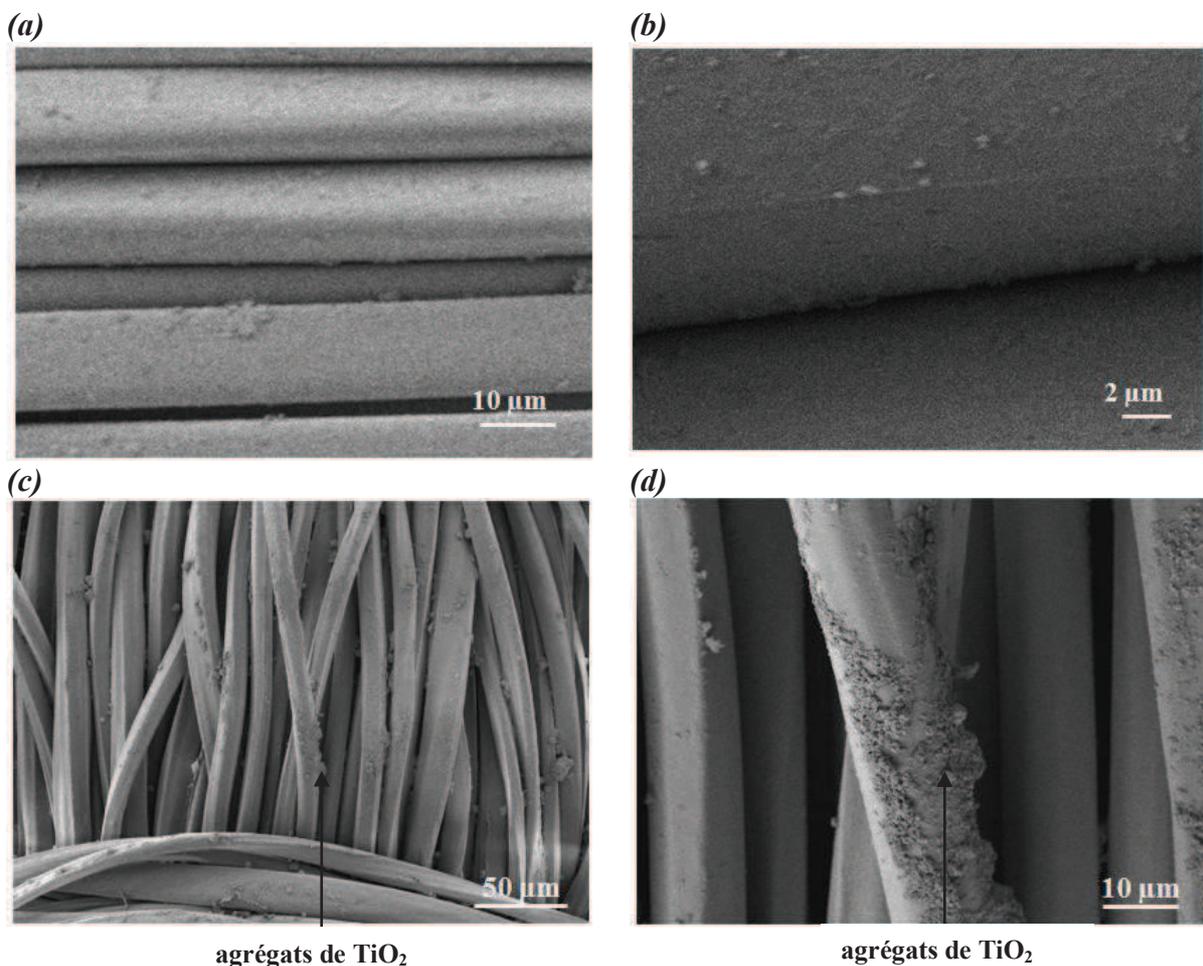


Figure 104 Images MEB du textile polyester sans prétraitement à KOH et non fonctionnalisé (nu), échelle de 10 µm (a) et de 2 µm (b).

Images MEB du textile polyester sans prétraitement à KOH avec 10 bicouches de PEI/TiO<sub>2</sub>, échelle de 50 µm (c) et de 10 µm (d).

✓ Polyester avec prétraitement à KOH : PES KOH + (PEI/TiO<sub>2</sub>)<sub>10</sub> (textile I)

L'analyse de microscopie à balayage a notamment permis de montrer qu'un prétraitement à KOH permettait d'améliorer légèrement la répartition du TiO<sub>2</sub> sur les fibres en comparaison avec les fibres non prétraitées (figure 105). En effet, les dépôts semblent aussi former des

agrégats, mais à plus fort grossissement, on s'aperçoit que les agrégats sont de tailles plus petites, moins de quelques micromètres (figure 105 (b)). Les fibres semblent ainsi recouvertes de manière légèrement plus homogène que sans prétraitement à KOH.

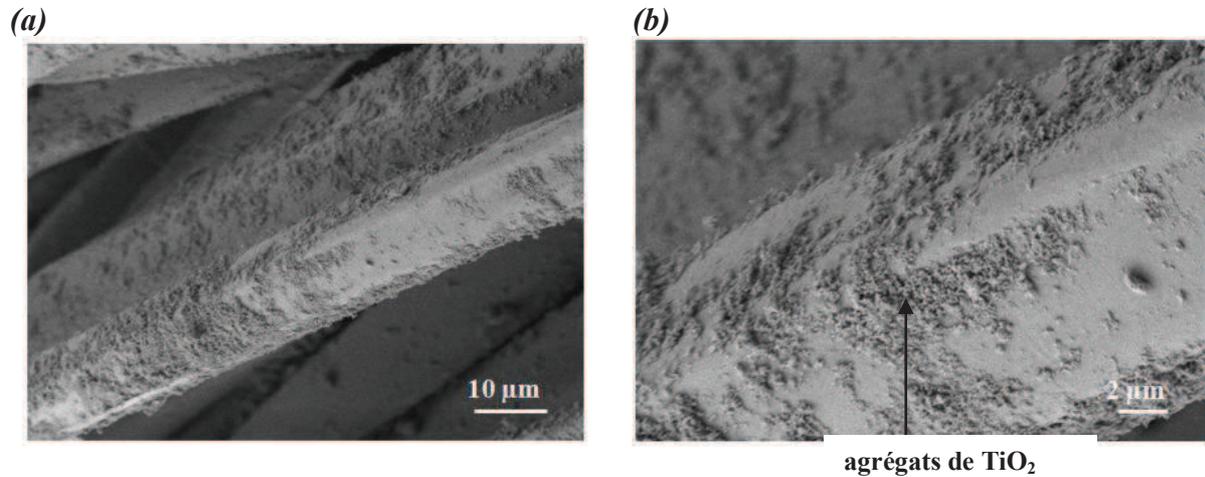


Figure 105 Images MEB du textile polyester avec prétraitement à KOH avec 10 bicouches de PEI/TiO<sub>2</sub>, échelle de 10 µm (a) et de 2 µm (b).

✓ Polyester avec prétraitement à KOH : PES KOH + PEI + (PSS/TiO<sub>2</sub>)<sub>10</sub> (textile H)

La figure 106 montre que l'utilisation du PSS en tant que polyanion dans la construction des multicouches permet une dispersion du TiO<sub>2</sub> bien plus homogène que lorsque le PEI est utilisé. Le revêtement de surface sur la fibre semble être plus dense et plus homogène qu'avec le PEI, il semble qu'il y ait formation de moins d'agrégats. Ceci pourrait résulter d'une interaction plus favorable entre le TiO<sub>2</sub> et le PSS qu'entre le TiO<sub>2</sub> et le PEI, ou bien de la différence de pH de la suspension de TiO<sub>2</sub> utilisée pour l'élaboration des couches. En effet, les particules de TiO<sub>2</sub> sont à priori légèrement mieux dispersées dans la suspension utilisée dans le cas de PSS (à pH=2,5 soit très éloigné du PZC du TiO<sub>2</sub>), que dans celle utilisée dans le cas de PEI (à pH=9 soit plus proche du PZC du TiO<sub>2</sub>) ce qui conduit a priori à une moins bonne désagglomération du TiO<sub>2</sub>.

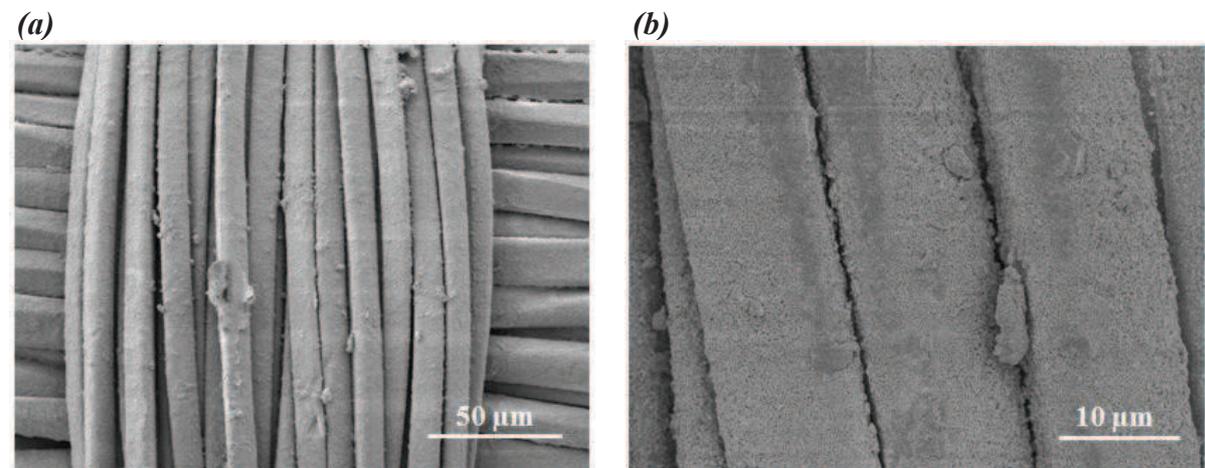


Figure 106 Images MEB du textile polyester avec prétraitement à KOH avec 10 bicouches de PSS/TiO<sub>2</sub>, échelle de 50 µm (a) et 10 µm (b)

Il ne s'agit cependant ici que d'une appréciation visuelle, ces textiles seront également évalués d'un point de vue microbiologique et la quantité de  $\text{TiO}_2$  déposée sur chacun d'entre eux sera également appréciée par ATG.

### Analyses thermogravimétriques (ATG)

D'après cette étude, on constate que quelles que soient les fibres fonctionnalisées prétraitées ou non à KOH, le fait d'augmenter le nombre de bicouches de  $\text{TiO}_2$  augmentant le pourcentage de  $\text{TiO}_2$  déposé (tableau 31). En effet, dans le cas par exemple du polyester prétraité à KOH avec dépôt de PEI/(PSS/ $\text{TiO}_2$ ) pour 5 bicouches le pourcentage en masse de  $\text{TiO}_2$  est de l'ordre de 1,1 % ; pour 10 bicouches il est de l'ordre de 1,5 % et pour 20 bicouches, de l'ordre de 2,9 %. Le pourcentage de  $\text{TiO}_2$  mesuré est donc directement fonction du nombre de couches de  $\text{TiO}_2$ .

**Tableau 31** Teneurs en  $\text{TiO}_2$  en pourcentage massique déterminées par ATG. Les pertes en masse à 180°C étant relativement modérées, la quantité de résidus après calcination à 900°C est une mesure directe de la teneur en  $\text{TiO}_2$  des textiles

Echantillon	Dénomination	Masse à 180°C (%)	Masse à 900°C (%) = $\text{TiO}_2$ (%)
PES	A'	99,3	0,0
PES + PEI + (PSS/ $\text{TiO}_2$ ) <sub>5</sub>		99,7	2,5
PES + PEI + (PSS/ $\text{TiO}_2$ ) <sub>20</sub>		99,8	7,7
PES KOH	A	99,0	0,0
PES KOH + PEI + (PSS/ $\text{TiO}_2$ ) <sub>5</sub>	F	99,8	1,1
PES KOH + PEI + (PSS/ $\text{TiO}_2$ ) <sub>10</sub>	H	99,9	1,5
PES KOH + PEI + (PSS/ $\text{TiO}_2$ ) <sub>20</sub>		99,6	2,9
PES (PEI/ $\text{TiO}_2$ ) <sub>10</sub>		99,9	2,3
PES KOH (PEI/ $\text{TiO}_2$ ) <sub>1</sub>	D	99,8	0,1
PES KOH (PEI/ $\text{TiO}_2$ ) <sub>5</sub>	G	99,9	1,2
PES KOH (PEI/ $\text{TiO}_2$ ) <sub>10</sub>		99,9	2,2

### 3.2. Effet cytotoxique du PEI et du PSS en solution sur *E.coli*

Cette étude nous a permis de déterminer la CMI et la CMB du PEI et du PSS.

Lors de l'évaluation de l'activité cytotoxique du PEI vis-à-vis d'*E.coli* (figure 107), nous avons observé que la CMI était identique à la CMB soit 2,5 g/L. Etant donné que le ratio CMB/CMI = 1, le PEI a donc bien un effet bactéricide sur *E.coli* et ce pour de faibles concentrations en PEI (dès 2,5 g/L). Cette première analyse de l'évaluation de l'activité cytotoxique du PEI, indique que cette molécule présente en solution une activité bactéricide.

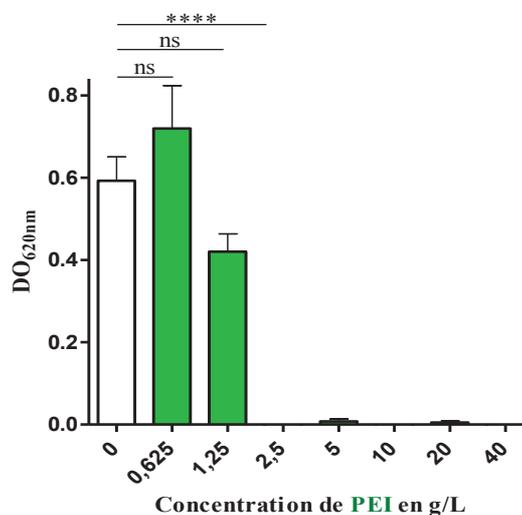


Figure 107 Estimation de l'effet cytotoxique du PEI en g/L sur *E.coli* par mesure de la DO à 620 nm.

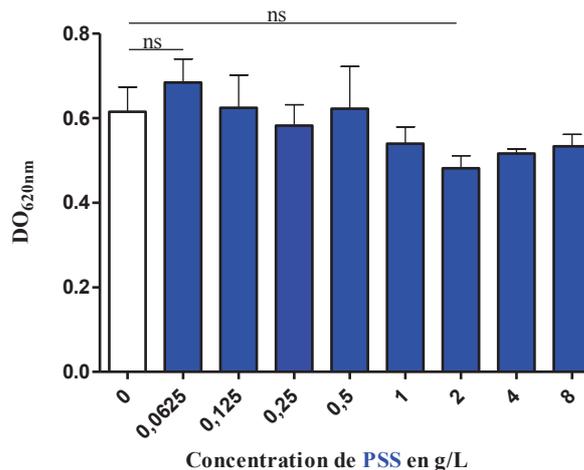
Analyse statistique test *t* de Student avec ns : non significatif et \*\*\*\*P < 0,0001

L'effet antibactérien du PEI est par ailleurs connu. Cet effet bactéricide serait en partie dépendant de la longueur de la chaîne du polymère et donc du poids moléculaire du PEI. En effet, une étude réalisée en 2002 a montré sur 4 espèces bactériennes différentes, *E.coli*, *P.aeruginosa*, *S.aureus*, et *S.epidermidis*, que des molécules de PEI de grandes tailles (masse molaire supérieure à 25 kDa) induisent un effet bactéricide plus important que des molécules de PEI de plus faibles tailles. Cet effet bactéricide serait dû aux chaînes polycationiques hydrophobes qui pourraient traverser la membrane et conduire à la formation de dommages irréparables.<sup>396,397</sup> Pour notre étude, nous avons utilisé un PEI commercial ayant une masse molaire de 25 kDa. De ce fait, il n'est pas surprenant que nous observions un effet bactéricide sur *E.coli*.

<sup>396</sup> Lin J, Qiu S, Lewis K, Klivanov AM: **Mechanism of bactericidal and fungicidal activities of textiles covalently modified with alkylated polyethylenimine.** *Biotechnology and bioengineering* 2003, **83**(2):168-172.

<sup>397</sup> Beyth N, Hourri-Haddad Y, Baraness-Hadar L, Yudovin-Farber I, Domb AJ, Weiss EI: **Surface antimicrobial activity and biocompatibility of incorporated polyethylenimine nanoparticles.** *Biomaterials* 2008, **29**:4157-4163.

En ce qui concerne, l'effet cytotoxique du PSS vis-à-vis d'*E.coli* (figure 108), il n'a pas été déterminé de CMI ni de CMB étant donné que quelle que soit la concentration en PSS utilisée (la concentration maximale en PSS utilisée était de 8 g/L) il y a eu une croissance bactérienne. De ce fait aucun effet bactéricide ou bactériostatique n'a été relevé avec l'utilisation de PSS.



**Figure 108** Estimation de l'effet cytotoxique du PSS en g/L sur *E.coli* par mesure de la DO à 620 nm.

Analyse statistique test *t* de Student avec ns : non significatif

Cette étude (réalisée en phase liquide) nous montre :

- que l'utilisation de PEI dans l'élaboration des multicouches photocatalytiques pourrait être intéressante pour que le textile développe une activité cytotoxique également en absence de lumière, pour améliorer l'activité antibactérienne du textile fonctionnalisé, mais également pour élargir le spectre d'action en associant les deux modes d'action.
- qu'il faut tenir compte du potentiel effet toxique du PEI lors de l'évaluation de l'activité antibactérienne photocatalytique sur textiles fonctionnalisés. Le remplacement du PEI par le PSS permettra alors de pallier le problème lié à la bactéricidie induite par le polyélectrolyte et non par le TiO<sub>2</sub>, lors de l'évaluation des propriétés photocatalytiques des textiles fonctionnalisés.

Cependant la quantité de PEI ou de PSS réellement déposée sur le textile est inconnue, il est alors difficile de transposer quantitativement ces résultats en solution sur les textiles. Il ne s'agit ici que d'une étude préliminaire permettant de nous orienter vers le choix d'un polyélectrolyte adapté pour évaluer l'effet photocatalytique.

### 3.3. Effet d'un prétraitement à KOH sur l'efficacité antibactérienne des textiles fonctionnalisés

Les résultats de l'étude de l'effet cytotoxique du PEI et du PSS en milieu liquide ont permis de mettre en évidence l'effet bactéricide du PEI sur la survie d'*E.coli*.

L'influence d'un prétraitement à KOH sur l'efficacité antibactérienne des textiles fonctionnalisés a été étudiée envers *E.coli* en utilisant un textile fonctionnalisé avec dix bicouches de (PSS/TiO<sub>2</sub>) et une couche d'ancrage de PEI. Ce textile a été choisi car, on le verra dans la partie 3.5, la fonctionnalisation PEI+(PSS/TiO<sub>2</sub>)<sub>10</sub> permet d'évaluer l'efficacité antibactérienne liée à la présence de TiO<sub>2</sub> sans que les mesures ne soient perturbées par l'effet cytotoxique du PEI.

Après dépôt d'un inoculum en *E.coli* de l'ordre de 10<sup>7</sup> UFC/textile (soit 2,5.10<sup>6</sup> UFC/cm<sup>2</sup>), les textiles (avec ou sans prétraitement à KOH) ont été exposés au rayonnement solaire (15, 30

ou 60 min) ou gardés à l'obscurité pendant le même laps de temps. Dans chaque cas, un textile non fonctionnalisé (avec ou sans prétraitement à KOH) a été utilisé comme témoin (correspondant aux textiles A et A' pour respectivement les textiles fonctionnalisés H et H').

### Textile non prétraité à KOH

La figure 109 présente l'effet de la durée d'exposition au rayonnement (15 min, 30 min et 60 min) sur l'efficacité de réduction de la viabilité cellulaire d'*E.coli* après dépôt sur un textile **non prétraité à KOH** fonctionnalisé avec dix bicouches de PSS/TiO<sub>2</sub> (H') après dépôt d'une première couche de PEI.

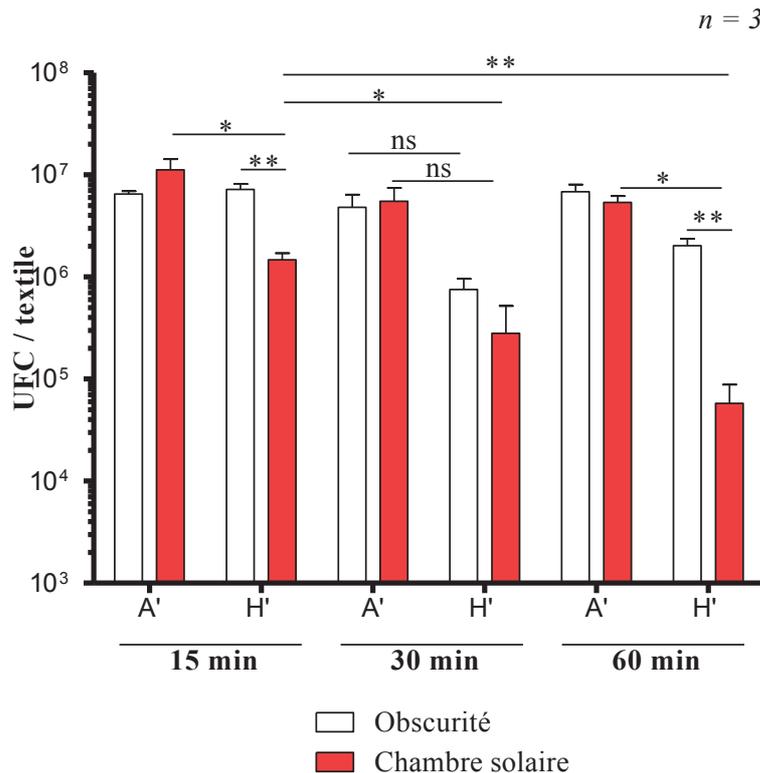


Figure 109 Survie bactérienne d'*E.coli* (UFC/textile) en fonction de la durée d'exposition au rayonnement solaire ou à l'obscurité (15, 30 et 60 min) pour les textiles non prétraités à KOH ; PES (A') ; PES+PEI+(PSS/TiO<sub>2</sub>)<sub>10</sub> (H').

Analyse statistique test *t* de Student avec ns : non significatif, \*P<0,05 et \*\*P<0,01

Tout d'abord, il a été vérifié que le textile non fonctionnalisé (A') n'est pas bactéricide à l'obscurité et que le rayonnement seul n'induisait pas d'effet bactéricide.

Ensuite sur cet histogramme, nous pouvons constater que :

- l'addition de dix bicouches de PSS/TiO<sub>2</sub> sur textile (H') non exposé au rayonnement solaire, ne suffit pas à induire un effet antibactérien significatif en comparaison avec le textile non fonctionnalisé et non exposé au rayonnement (A') : **pas d'effet cytotoxique du revêtement seul**
- l'exposition au rayonnement du textile fonctionnalisé (H') induit **une diminution de la viabilité cellulaire qui est dépendante de la durée d'exposition au rayonnement**. En effet, pour :

- 15 min de rayonnement, on passe de  $1,1 \cdot 10^7$  UFC/textile (A') à  $1,5 \cdot 10^6$  UFC/textile (H')
- 30 min de rayonnement, on passe de  $5,5 \cdot 10^6$  UFC/textile (A') à  $2,8 \cdot 10^5$  UFC/textile (H') (réduction de plus de un log mais pas de différence significative)
- 60 min de rayonnement, on passe de  $5,4 \cdot 10^6$  UFC/textile (A') à  $5,7 \cdot 10^4$  UFC/textile (H')

Il peut paraître surprenant de ne pas obtenir de différence significative pour le traitement à 30 min (malgré plus d'un log de réduction), tandis que nous avons une différence significative dès 15 min de rayonnement. Un écart type plus grand attribué à des incertitudes de mesures peut expliquer cette différence non significative (pour 60 min, nous avons de nouveau une différence significative avec deux log de réduction).

### Textile prétraité à KOH

La figure 110 présente l'effet de la durée d'exposition au rayonnement (15 min, 30 min et 60 min) sur l'efficacité de réduction de la viabilité cellulaire d'*E.coli* après dépôt sur un textile prétraité à KOH et fonctionnalisé avec dix bicouches de PSS/TiO<sub>2</sub> (H).

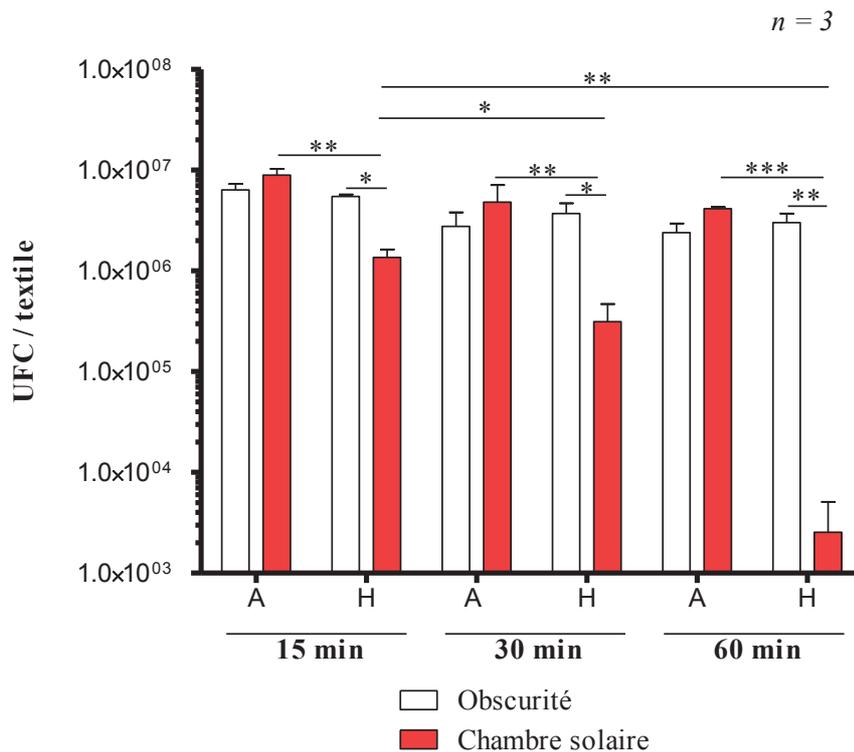


Figure 110 Survie bactérienne d'*E.coli* (UFC/textile) en fonction de la durée d'exposition au rayonnement solaire ou à l'obscurité (15, 30 et 60 min) pour les textiles prétraités à KOH ; PES KOH (A) ; PES KOH + PEI+ (PSS/TiO<sub>2</sub>)<sub>10</sub> (H).

Analyse statistique test *t* de Student avec ns : non significatif, \*P<0.05, \*\*P<0,01 et \*\*\*P<0,001

Sur cet histogramme, nous pouvons constater que :

- l'addition de dix bicouches de PSS/TiO<sub>2</sub> sur textile (H) non exposé au rayonnement solaire, ne suffit pas à induire un effet bactéricide significatif en comparaison avec le textile non fonctionnalisé et non exposé au rayonnement (A) : **pas d'effet cytotoxique du revêtement seul**
- l'exposition au rayonnement du textile fonctionnalisé (H') induit **une diminution de la viabilité cellulaire significative qui est dépendante de la durée d'exposition au rayonnement**. En effet, pour :
  - 15 min de rayonnement, on passe de  $9,0 \cdot 10^6$  UFC/textile (A) à  $1,4 \cdot 10^6$  UFC/textile (H)
  - 30 min de rayonnement, on passe de  $4,8 \cdot 10^6$  UFC/textile (A) à  $3,1 \cdot 10^5$  UFC/textile (H)
  - 60 min de rayonnement, on passe de  $4,1 \cdot 10^6$  UFC/textile (A) à  $2,6 \cdot 10^3$  UFC/textile (H)

### Conclusion

Après 60 min d'exposition au rayonnement solaire du textile fonctionnalisé, nous avons obtenu :

- une réduction de la viabilité cellulaire d'*E.coli* de **2 log** pour le textile **non prétraité à KOH**
- une réduction de la viabilité cellulaire d'*E.coli* de **plus de 3 log** pour le textile **prétraité à KOH**.

Au vu de ces résultats, nous avons décidé de travailler uniquement sur textile prétraité à KOH.

### 3.4. Effet du nombre de bicouches PEI/TiO<sub>2</sub> sur l'efficacité antibactérienne

Ainsi, tous les textiles fonctionnalisés avec le PEI/TiO<sub>2</sub> ont subi un prétraitement à KOH. L'effet antibactérien a été étudié pour une durée d'exposition de 60 min en chambre solaire. Cette étude a pour but d'évaluer l'efficacité de désinfection en fonction du nombre de bicouches (PEI/TiO<sub>2</sub>) (1 ou 5 bicouches) sur le textile (figure 111).

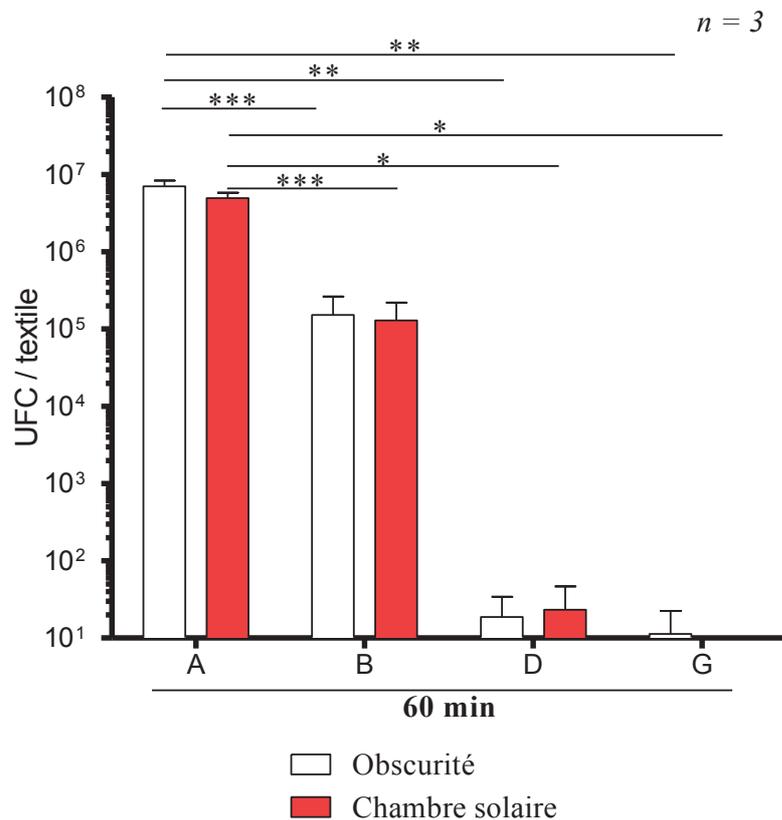


Figure 111 Survie d'*E.coli* en fonction du nombre de bicouches de PEI/TiO<sub>2</sub> sur textile prétraité à KOH et de l'exposition ou non au rayonnement (60 min) ; PES KOH (A), PES KOH (PEI) (B), PES KOH (PEI/TiO<sub>2</sub>)<sub>1</sub> (D), PES KOH (PEI/TiO<sub>2</sub>)<sub>5</sub> (G).

Analyse statistique test *t* de Student avec ns non significatif, \*P<0,05, \*\*P<0,01 et \*\*\*P<0,001

L'analyse de la figure 111 montre que :

- pour le textile polyester témoin exposé au rayonnement ou non (A), le dépôt théorique en *E.coli* est bien retrouvé, ce qui valide par ailleurs notre méthode d'évaluation.
- une couche unique de PEI sur textile (B) induit une diminution significative de la population bactérienne de l'ordre de 2 log comparé au témoin (A), ce qui traduit un effet cytotoxique chimique.
- pour le textile composé d'une bicouche de PEI/TiO<sub>2</sub> (D) et non exposé au rayonnement, il y a une réduction de la viabilité cellulaire d'*E.coli* de près de 5 log en comparaison avec le témoin non éclairé (A). Ainsi, même en absence de rayonnement, nous pouvons remarquer que pour ce textile (D), l'effet cytotoxique du couple PEI/TiO<sub>2</sub>

est très déjà très important. Compte tenu de l'effet cytotoxique important il est difficile d'estimer une réduction supplémentaire lorsque ce même textile est irradié.

- le textile composé de **5 bicouches de PEI/TiO<sub>2</sub> (G)**, induit un effet bactéricide très important conduisant à une réduction de plus de **6 log** de la viabilité cellulaire d'*E.coli*. Ce résultat est obtenu même en absence de rayonnement et correspond à la limite du seuil de détection, soit un minimum de 10 UFC.

Cette expérience nous montre qu'une bicouche de PEI induit un effet antibactérien de l'ordre de 2 log mais que le dépôt d'une seule couche de TiO<sub>2</sub> sur cette première couche permet d'augmenter considérablement l'effet antibactérien puisqu'une réduction de près de 5 log a été obtenue même à l'obscurité.

Les résultats obtenus dans le chapitre 3 sur la détermination de l'effet antibactérien, que ce soit dans le cas de TiO<sub>2</sub> déposé sur surface (en milieu gélosé nutritif ou sur surface « sèche ») ou TiO<sub>2</sub> en milieu liquide, ont montré que l'effet cytotoxique du TiO<sub>2</sub> était négligeable. De même, nous verrons dans le graphique suivant (figure 112) avec les textiles fonctionnalisés avec 5 ou 10 bicouches de PSS/TiO<sub>2</sub> déposées sur une couche de PEI (textiles F et H) que l'effet toxique du PEI est annihilé, mais surtout qu'il n'y a pas d'effet cytotoxique du TiO<sub>2</sub>. Dès lors, il paraît peu probable que l'ajout d'une couche de TiO<sub>2</sub> sur la première couche de PEI (I) suffise à induire cet effet antibactérien de près de 5 log.

Le PEI est un polymère aliphatique qui perméabilise la membrane externe. Cependant l'association PEI/TiO<sub>2</sub> permet une réduction de la viabilité cellulaire de l'ordre de 5 log ce qui peut paraître suprenant. Bien que nous ayons peu d'éléments pour étayer cette hypothèse, nous suggérons toutefois que le TiO<sub>2</sub> perturberait les membranes (peut-être à cause de son interaction avec les protéines membranaires (comme suggéré lors de l'étude protéomique Chapitre 4 III.)) ce qui aurait pour conséquence de potentialiser (effet synergique) l'effet du PEI vis-à-vis d'*E.coli*.

Cette expérience nous montre que quel que soit le nombre de bicouches de PEI/TiO<sub>2</sub> (1 ou 5 bicouches), l'effet bactéricide est **très important de l'ordre de 5 à 6 log**. L'effet cytotoxique du couple PEI/TiO<sub>2</sub> étant trop important dès l'ajout d'une bicouche, il nous est alors impossible d'apprécier l'effet du nombre de bicouches sur l'efficacité de réduction. De même, le possible effet photocatalytique du TiO<sub>2</sub> est masqué par cet effet cytotoxique. Nous allons essayer de nous en affranchir en réalisant une fonctionnalisation multicouches avec le PSS comme polyélectrolyte (section suivante). **Dans une application commerciale il serait donc judicieux d'utiliser cette association qui semble avoir un effet bactéricide très important même sans irradiation.**

### 3.5. Effet du nombre de bicouches de PSS/TiO<sub>2</sub> sur l'efficacité antibactérienne

Dans le cadre de cette étude, nous avons étudié l'influence du nombre de bicouches de PSS/TiO<sub>2</sub> (1 ; 5 ou 10 bicouches) sur l'efficacité antibactérienne (après la fonctionnalisation initiale avec le PEI), pour des durées d'exposition au rayonnement solaire de 60 min. Rappelons que lors de l'étude de CMI et CMB, le PSS n'a pas induit d'effet bactériostatique ou bactéricide vis-à-vis d'*E.coli*.

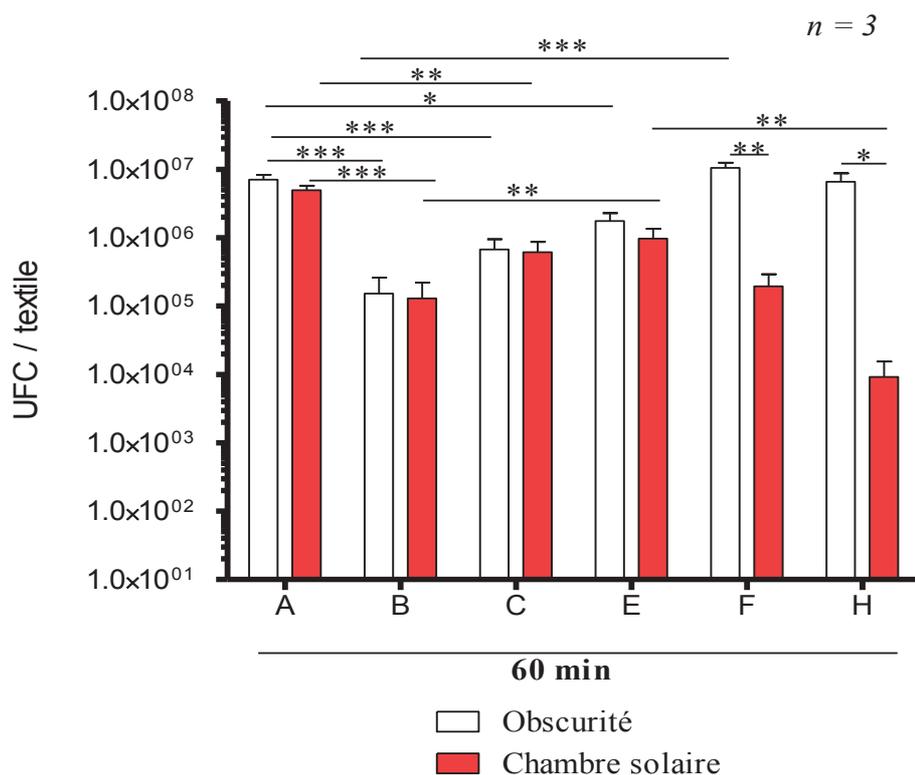


Figure 112 Survie d'*E.coli* en fonction du nombre de bicouches de PSS/TiO<sub>2</sub> sur textile prétraité à KOH et de l'exposition ou non au rayonnement (60 min); PES KOH (A), PES KOH (PEI) (B), PES KOH + PEI + PSS (C), PES KOH + PEI + (PSS/TiO<sub>2</sub>)<sub>1</sub> (E), PES KOH + PEI + (PSS/TiO<sub>2</sub>)<sub>5</sub> (F) ; PES KOH + PEI + (PSS/TiO<sub>2</sub>)<sub>10</sub> (H).

Analyse statistique test *t* de Student avec \*P < 0,05 ; \*\*P < 0,01 et \*\*\*P < 0,001

L'analyse de la figure 112 montre que :

- pour le textile témoin exposé au rayonnement ou non (A), le dépôt théorique est bien retrouvé
- pour le textile additionné d'une couche de PEI et recouvert d'une couche de PSS (C) qu'il soit exposé au rayonnement ou non, nous observons une réduction de la viabilité cellulaire de 1 log en comparaison avec le textile témoin (A). Le PSS ne présentant pas d'effet cytotoxique en solution, il est peu probable qu'il le soit par dépôt, nous pouvons donc attribuer cet effet toxique à la première couche de PEI déposée. Cependant, la

couche de **PSS** masque déjà partiellement l'action cytotoxique de la couche initiale de **PEI**, car la réduction était de 2 log en absence de **PSS** additionnel (B).

- pour le textile composé d'une bicouche de **PSS/TiO<sub>2</sub>** (E), il n'y a pas d'effet photocatalytique. En revanche, en comparaison avec le textile non fonctionnalisé (A) et non irradié, nous constatons toujours un effet cytotoxique provenant très certainement de la première couche de **PEI** ajoutée. L'addition d'une seule bicouche de **PSS/TiO<sub>2</sub>** ne permet pas d'annihiler complètement l'effet toxique dû à la première couche de **PEI**
- pour le textile composé de 5 bicouches de **PSS/TiO<sub>2</sub>** (F), nous ne constatons plus d'effet cytotoxique et l'action photocatalytique engendre une réduction de la viabilité cellulaire de l'ordre de 2 log comparée au même textile non exposé au rayonnement (F) (on passe respectivement de  $1,2 \cdot 10^7$  UFC/textile à  $1,9 \cdot 10^5$  UFC/textile). La présence de 5 bicouches de **PSS/TiO<sub>2</sub>** a permis ainsi d'annihiler l'effet toxique du **PEI** (en comparaison avec les résultats obtenus avec le textile non irradié constitué que d'une couche **PEI** (B) et le textile témoin (A)).
- pour le textile composé de 10 bicouches de **PSS/TiO<sub>2</sub>** (H), l'action photocatalytique engendre une réduction de la viabilité cellulaire de l'ordre de 3 log comparée au même textile non exposé au rayonnement (H) (on passe respectivement de  $4,4 \cdot 10^6$  UFC à  $8,9 \cdot 10^3$  UFC/textile), tandis que l'effet cytotoxique de 10 bicouches de **PSS/TiO<sub>2</sub>** est logiquement nul (comme avec 5 bicouches).

En résumé, pour cette étude de l'effet antibactérien en présence de textiles fonctionnalisés **PSS/TiO<sub>2</sub>**, nous avons montré que **l'effet toxique du PEI ne peut être annihilé complètement qu'à partir d'un dépôt de 5 bicouches de PSS/TiO<sub>2</sub>** (l'addition de plusieurs couches de **PSS/TiO<sub>2</sub>** empêchant le contact des bactéries avec le **PEI**). En effet, l'addition d'une couche de **PSS** ou d'une bicouche de **PSS/TiO<sub>2</sub>**, si elle diminue progressivement la cytotoxicité du textile, n'est cependant pas suffisante pour masquer en totalité l'effet toxique dû à la première couche de **PEI**. **Dès lors ayant masqué cet effet toxique**, nous avons pu apprécier l'effet photocatalytique. Un effet photocatalytique a été observé à partir de 5 bicouches de **PSS/TiO<sub>2</sub>**. Nous constatons également que **plus on augmente le nombre de bicouches de PSS/TiO<sub>2</sub>, plus l'effet antibactérien est prononcé avec une réduction allant jusqu'à 3 log en présence de 10 bicouches de PSS/TiO<sub>2</sub>**.

#### **4. Conclusion**

La technique Layer-by-Layer a été utilisée avec succès pour élaborer des textiles fonctionnalisés photocatalytiques auto-décontaminants sous lumière solaire, dont l'efficacité a été évaluée vis-à-vis d'*E.coli*. Nous avons pu conclure qu'une étape préalable de traitement à **KOH** des fibres est bénéfique aux performances, tandis que la fonctionnalisation initiale des fibres par le polyélectrolyte **PEI**, si elle est très intéressante d'un point de vue applicatif, pose des problèmes pour évaluer l'activité auto-décontaminante photocatalytique. En effet, cette étude a montré que :

- l'association **PEI/TiO<sub>2</sub>** même en absence de rayonnement induit un effet bactéricide important avec une réduction de la viabilité cellulaire d'*E.coli* de plus de **6 log**

(correspondant à la limite du seuil de détection), et même 5 log pour une seule bicouche (PEI/TiO<sub>2</sub>). Pour une application industrielle, il serait ainsi judicieux d'utiliser l'association PEI/TiO<sub>2</sub>, car cette combinaison induit un effet bactéricide même sans exposition au rayonnement. D'autre part, il pourrait être possible d'élargir le spectre des cibles microbiologiques. Dans ce cadre, il serait intéressant d'étudier plus particulièrement des microorganismes :

- résistants au PEI mais pas à la photocatalyse... En toute logique, pour ces microorganismes, le PEI devrait présenter une CMI plus élevée et dans ce cas l'utilisation de bicouches PEI/TiO<sub>2</sub> sous irradiation pourrait alors se révéler efficace pour inhiber leur développement
- considérés comme résistants à la photocatalyse tels que les spores bactériennes, les levures et les moisissures. Lors de notre étude avec TiO<sub>2</sub> déposé en milieu gélosé (Chapitre 3 I.1), d'autres microorganismes avaient également été notés comme résistants à la photocatalyse : *E.cloacae*, *K.pneumoniae*, *S.Abony*, *S.maltophilia*, *A.baumannii* ou encore *A.hydrophila* (tableau 18). La présence de PEI pourrait ainsi inactiver ces bactéries dans le cas où elles seraient résistantes au traitement photocatalytique

Dans des perspectives d'application pour la décontamination d'agents biologiques et chimiques, la fonctionnalisation de textiles avec des bicouches PEI/TiO<sub>2</sub> s'avèrent ainsi très prometteuse, en raison de la complémentarité des différents composants des multicouches.

- l'association PSS/TiO<sub>2</sub> n'entraîne pas d'effet cytotoxique mais entraîne un **effet antibactérien lors de l'exposition au rayonnement** pouvant atteindre 3 log avec le textile fonctionnalisé avec 10 bicouches de PSS/TiO<sub>2</sub>. L'effet antibactérien est dépendant du nombre de bicouches PSS/TiO<sub>2</sub> ajoutées puisque plus le nombre de bicouches est important, plus la réduction de la viabilité cellulaire est importante. Cependant il est fort probable qu'au-delà d'un certain nombre de bicouches, il n'y ait plus d'amélioration de l'effet bactéricide, étant donné que les couches inférieures de TiO<sub>2</sub> ne seraient plus accessibles ni au rayonnement ni aux bactéries. De plus, il serait probable que la stabilité mécanique des systèmes soit dégradée. Cependant les systèmes (PSS/TiO<sub>2</sub>)<sub>n</sub> sont intéressants d'un point de vue fondamental car ils permettent – à partir d'un certain nombre de bicouches – de ne pas considérer la cytotoxicité du PEI dans l'évaluation de l'activité auto-désinfectante des textiles fonctionnalisés, et ainsi de déterminer la réduction de viabilité cellulaire provenant uniquement de la photocatalyse.

Ces textiles auto-désinfectants pourraient être utilisés dans un premier temps pour des populations cibles comme les populations hautement sensibles aux infections (patients en attente de greffe de moelle osseuse, les grands brûlés...) ou bien encore les personnes travaillant en ZAC A. Cependant, avant de mettre à disposition de tels équipements, il est nécessaire d'évaluer la tenue des différentes couches sur le substrat et ce après exposition à différents traitements (chimique comme le lavage par exemple ou thermique comme le

repassage...), afin de s'assurer de la pérennisation des propriétés antimicrobiennes et d'éviter tout contact éventuel de l'utilisateur avec les différents composants du système multicouche (polyélectrolytes,  $\text{TiO}_2$ ). De plus, il serait important de prendre en considération si un contact entre une peau qui peut être lésée et de tels textiles est possible ; ces textiles ne doivent pas être à l'origine d'irritations ou d'allergies ni contribuer à la destruction de la flore cutanée ou encore participer au développement de bactéries résistantes. En effet, bien que les textiles ne soient fonctionnalisés que d'un seul côté, il est fortement probable que le côté fonctionnalisé puisse entrer en contact avec la peau.

## **Conclusions et perspectives**

Ce travail a été réalisé dans le cadre d'une thèse cofinancée par la DGA et la Région Alsace. S'inscrivant dans le thème général de la désinfection de l'eau, de l'air et des surfaces par photocatalyse, l'objectif principal de cette thèse a été de mieux **comprendre les mécanismes à l'origine de l'action photocatalytique antibactérienne et d'étudier l'influence du mode d'évaluation et des protocoles de test sur les propriétés antibactériennes observées**. Une connaissance plus approfondie de ces mécanismes participerait incontestablement à l'**élaboration** et à l'**optimisation** de **matériaux** et/ou de **dispositifs photocatalytiques**.

✓ Effet antimicrobien de la photocatalyse sur surfaces ou en milieu liquide

Avant d'aborder l'étude de la compréhension des mécanismes réactionnels oxydatifs à l'origine de l'effet antibactérien, nous avons procédé à l'**évaluation de l'effet antimicrobien** de TiO<sub>2</sub> irradié **sur une vingtaine de microorganismes** (bactéries à Gram négatif, bactéries à Gram positif, spores, levures et moisissures), réalisée dans **différents environnements représentatifs** soit d'une surface nutritive riche, soit d'un revêtement de surface « pauvre » (« sec ») ou d'un milieu liquide.

Cette évaluation de l'effet antimicrobien avec TiO<sub>2</sub> sur surface montre que quelle soit la surface utilisée (gélose *versus* lame de verre), l'effet cytotoxique du TiO<sub>2</sub> envers les bactéries sélectionnées est négligeable.

En revanche de réelles différences de sensibilité à la photocatalyse ont été observées en fonction du milieu utilisé. En effet, sur milieu gélosé nutritif nous avons globalement constaté que **les bactéries à Gram positif sont plus sensibles à la photocatalyse que les bactéries à Gram négatif** mais ceci ne préjuge pas du fait que certaines bactéries à Gram négatif présentent quand même une sensibilité élevée. Il est reconnu que l'intégrité de la membrane cytoplasmique est responsable de la survie cellulaire. Chez les bactéries à Gram positif, les ROS générées pourraient franchir aisément le peptidoglycane et attaquer la membrane cytoplasmique. A l'inverse chez les bactéries à Gram négatif, la membrane externe constituerait comme l'ont suggéré certains auteurs, une barrière semi-perméable aux ROS. On suppose ainsi que chez les bactéries à Gram négatif, les ROS peuvent préférentiellement interagir avec les lipides de la membrane externe plutôt que de la franchir et de ce fait, être moins disponibles pour dégrader la membrane cytoplasmique.

A l'inverse, les résultats obtenus sur lame de verre montrent une séparation nette entre les réponses **des bactéries à Gram négatif qui sont beaucoup plus sensibles à la photocatalyse que les bactéries à Gram positif**. En effet, nous pensons que le LPS des bactéries à Gram négatif par ses propriétés hydrophiles, permet une meilleure adhésion de ces dernières sur les surfaces recouvertes de TiO<sub>2</sub>, ce qui augmente la réduction de la viabilité cellulaire étant donné que le **contact bactéries-TiO<sub>2</sub> est primordial pour la photocatalyse**. De plus, nous pensons que l'origine des bactéries à Gram négatif sélectionnées qui sont toutes **d'environnement aquatique** influe directement sur ces différences de réduction. Dès lors, le stress hydrique pouvant se combiner à la photocatalyse augmenterait l'effet photocatalytique. **Ce contact primordial entre les bactéries et le TiO<sub>2</sub>** a été étudié par la cytométrie capillaire qui nous a permis d'établir que quel que soit l'état physiologique des bactéries, l'agrégation

des particules de TiO<sub>2</sub> avec ces dernières est quasi spontanée et ne dépend pas de l'exposition au rayonnement. Elles s'agrègent rapidement avec TiO<sub>2</sub> et la taille des agrégats bactéries-TiO<sub>2</sub> correspond à celle des agrégats de TiO<sub>2</sub> seul. De plus cette technique, nous a permis d'évaluer l'efficacité antibactérienne de TiO<sub>2</sub> **en milieu liquide sur l'intégrité membranaire** grâce à l'ajout de sondes fluorescentes (kit Live/Dead) sur 4 espèces bactériennes (*E.coli*, *P.aeruginosa*, *B.cereus* et *S.aureus*) en partant de **l'hypothèse qu'une atteinte de la membrane cytoplasmique est un reflet de la viabilité cellulaire**. Nous avons montré que cette atteinte de l'intégrité membranaire est fonction du temps de rayonnement et de la concentration en TiO<sub>2</sub> utilisée.

Le nombre d'évènements détecté dans la zone de fluorescence caractéristique des bactéries dont l'intégrité membranaire est conservée a, par la suite, été relié aux résultats obtenus par **dénombrements sur milieu gélosé**. Ces deux méthodes d'évaluation de la viabilité affichent la même tendance, à savoir que des réductions logarithmiques plus importantes ont été obtenues dans le cas des deux bactéries à Gram positif en comparaison avec celles obtenues dans le cas des deux bactéries à Gram négatif, ce qui confirme nos résultats obtenus avec TiO<sub>2</sub> en milieu gélosé nutritif et montre **l'importance de l'intégrité de la membrane cytoplasmique pour la survie bactérienne**.

Il n'en reste pas moins qu'il **existe de réelles différences** entre les deux méthodes d'évaluation : en effet quelles que soient les conditions testées, de fortes réductions logarithmiques de la viabilité cellulaire (pouvant aller jusqu'à 5 log) ont été obtenues pour le dénombrement sur milieu gélosé comparées aux réductions obtenues par cytométrie capillaire (réductions au maximum obtenues de 3 log) qui elle ne l'oublions pas est un reflet de la mesure de l'intégrité membranaire. Plusieurs hypothèses ont été exposées afin d'expliquer ces différences de résultats : temps d'analyse différents après traitement photocatalytique (30 ou 60 min pour la cytométrie *versus* 24 h pour le dénombrement), interférence des agrégats de bactéries-TiO<sub>2</sub> comptabilisées comme une seule colonie bien que plusieurs bactéries peuvent être présentes, présence de BVNC, effet rémanent cytotoxique du TiO<sub>2</sub> lors de la croissance bactérienne.

Malheureusement **aucune réduction de la viabilité cellulaire n'a été obtenue dans le cas des spores bactériennes, des levures et des moisissures**. Ceci peut s'expliquer par la différence de composition des parois et des membranes. Les spores bactériennes sont composées d'une tunique et d'un cortex ce qui leur confère leur résistance aux agents chimiques et environnementaux et les champignons sont composés d'une paroi composée de polysaccharide et de protéine leur conférant une certaine protection vis-à-vis de l'action néfaste des ROS.

Ces études réalisées sur surfaces ou en milieu liquide avec des systèmes mixtes TiO<sub>2</sub>-bactéries ont permis de montrer que **la détermination de l'efficacité antibactérienne de TiO<sub>2</sub> est liée fortement au mode d'évaluation et aux protocoles de test et dépend de différents paramètres tels que la composition du milieu, la méthode de test et de comptage...** La photocatalyse induit des effets antimicrobiens intéressants en termes d'efficacité, mais qui peuvent varier énormément selon la nature des microorganismes et selon les conditions

opératoires des tests et la méthode de comptage. Le **choix de la méthode d'évaluation** au sens large s'avère donc être crucial et influence indéniablement l'interprétation des résultats.

✓ Compréhension des mécanismes réactionnels à l'origine de l'effet antibactérien

Une meilleure connaissance des cibles cellulaires de  $\text{TiO}_2$  à l'obscurité et irradié et donc activé permettrait d'améliorer l'efficacité antimicrobienne des procédés ou des revêtements mettant en œuvre  $\text{TiO}_2$  et la photocatalyse.

Il est connu que les **radicaux anions superoxydes  $\text{O}_2^{\circ-}$**  sont générés lors de la photocatalyse. Nous avons voulu voir s'ils sont impliqués dans **l'effet antibactérien de  $\text{TiO}_2$**  et avons suivi leur production par la technique de chimiluminescence (CL).

L'utilisation d'une molécule scavenger spécifique, la **SOD** nous a permis de mettre en évidence l'implication de ces radicaux dans l'effet antibactérien. En effet, la présence de SOD durant la photocatalyse a permis de **restaurer complètement la viabilité cellulaire** montrant ainsi - dans nos conditions expérimentales - que **les radicaux anions superoxydes  $\text{O}_2^{\circ-}$  sont bien responsables de l'effet antibactérien.**

De ce fait, nous nous sommes posés la question de savoir : quelle était **la cible moléculaire de ces radicaux anions superoxydes dans l'effet antibactérien ?** La membrane externe chez les bactéries à Gram négatif étant la première cible rencontrée par les radicaux anions superoxydes  $\text{O}_2^{\circ-}$  nous nous sommes intéressés chez *E.coli* à l'analyse des **principaux composés moléculaires des membranes à savoir les lipides et les protéines.**

**L'analyse de la peroxydation lipidique** réalisée par **quantification du malondialdéhyde** a permis d'observer qu' **$\text{O}_2^{\circ-}$  était impliqué dans les phénomènes de peroxydation lipidique** lors de la photocatalyse. En effet, l'inhibition de ces mécanismes par la **SOD induit une diminution de moitié du taux de peroxydation**, montrant ainsi l'implication des radicaux anions superoxydes  $\text{O}_2^{\circ-}$  mais également **pour moitié d'autres ROS responsables.**

Des **analyses protéomiques par gel d'électrophorèse bi-dimensionnelle couplée à la spectrométrie de masse** ont été réalisées. Elles montrent que  **$\text{TiO}_2$  seul est à l'origine de la modification sur les gels de nombreux spots identifiés comme étant aussi bien des protéines membranaires que cytoplasmiques appartenant à diverses catégories fonctionnelles** (porine, protéine du stress, protéine impliquée dans le transport de molécules...). **De même  $\text{TiO}_2$  irradié entraîne la modification de spots supplémentaires** sur les gels d'électrophorèses. Ces spots correspondent à des protéines appartenant aux mêmes catégories fonctionnelles que celles décrites précédemment.

Ceci est tout à fait en accord avec le mode d'action de  $\text{TiO}_2$  qui peut être considéré comme un désinfectant. En effet, les désinfectants, contrairement aux antibiotiques qui ciblent un élément bien spécifique d'une voie métabolique, agissent très souvent par des mécanismes d'oxydation sur les protéines, les lipides ou les acides nucléiques sans avoir une cible privilégiée.

Ainsi sans toutefois savoir **si les protéines restent fonctionnelles**, cette première étude relative à l'effet d'un traitement cytotoxique du TiO<sub>2</sub> et/ou photocatalytique met à disposition **une liste de protéines pouvant correspondre à des cibles d'action préférentielles**.

Au vu de ces résultats, nous **suggérons** donc que **suivant les milieux d'étude**, les résultats de la photocatalyse vis-à-vis des bactéries vont être différents en fonction de la structure de la paroi et que malgré tout, au sein de la classification Gram positif/Gram négatif, il est **difficile d'extrapoler les effets de la photocatalyse d'une bactérie à l'autre**. Nous montrons que lors de la photocatalyse, les **interactions bactéries-TiO<sub>2</sub> sont primordiales** et qu'il y a une altération de la membrane cytoplasmique, reflet de la peroxydation lipidique et de la modification des profils protéiques, dû à la production importante de ROS entraînant un effet antibactérien.

- ✓ Dispositif de traitement de l'air intérieur équipé de DELs et textiles fonctionnalisés par LbL auto-désinfectants sous lumière solaire

Le dernier chapitre de cette thèse est une partie plus **applicative** avec le développement et l'évaluation de dispositifs de traitement de l'air intérieur ainsi que de textiles aux propriétés auto-désinfectantes sous lumière solaire.

Les dispositifs de **traitement de l'air intérieur** développés ont la particularité d'être équipé de systèmes de rayonnement miniaturisés au faible impact écologique et à longue durée de vie : les DELs. Ils sont également composés de supports photocatalytiques innovants, des mousses de SiC sur lesquelles sont imprégnés du TiO<sub>2</sub> actif sous lumière visible. Des réductions logarithmiques de l'ordre de 3 log pour les phages T2 d'*E.coli* ont été obtenues après 60 min d'irradiation.

**Des textiles fonctionnalisés par dépôt de TiO<sub>2</sub> selon la technique multicouches ou Layer-by-Layer (LbL) et activés sous lumière solaire** ont été élaborés et **leurs propriétés auto-désinfectantes ont été évaluées vis-à-vis d'*E.coli***. Ces textiles variaient en nombre de couches de TiO<sub>2</sub> et en nature du polyélectrolyte utilisé pour la construction des multicouches : un polycation le polyéthylèneimine (PEI) et un polyanion le polystyrène sulfonate (PSS)). Cette étude montre que :

- l'ajout d'une seule couche de PEI entraîne une réduction de la viabilité cellulaire de 2 log
- l'ajout d'une couche supplémentaire de TiO<sub>2</sub> sur cette première couche de PEI entraîne une réduction de 5 log. Cet effet synergique (PEI/TiO<sub>2</sub>) paraît surprenant. Toutefois, lors des études réalisées sur surface, nous n'avons pas observé d'effet cytotoxique du TiO<sub>2</sub>, de même les études réalisées dans le cas de la fonctionnalisation de bicouches avec PSS/TiO<sub>2</sub> (dans le cas de 5 ou 10 bicouches) n'ont pas montré d'effet cytotoxique du TiO<sub>2</sub>, ceci suggère ainsi que TiO<sub>2</sub> fragiliserait les membranes (peut être de par son interaction avec les protéines membranaires) ce qui aurait pour conséquence d'augmenter l'action toxique du PEI.

Bien que la fonctionnalisation initiale des fibres par le polyélectrolyte PEI soit très intéressante d'un point de vue applicatif, puisque fonctionnant même sans irradiation, cette association pose des problèmes pour évaluer l'activité auto-décontaminante photocatalytique. Dès lors nous avons évalué l'efficacité auto-désinfectante photocatalytique dans le cas de la fonctionnalisation de textiles avec PSS/TiO<sub>2</sub>. Il a été montré que :

- TiO<sub>2</sub> n'induisait pas d'effet cytotoxique sur la viabilité cellulaire d'*E.coli*
- à partir 5 bicouches de PSS/TiO<sub>2</sub>, l'effet cytotoxique du PEI était annihilé
- lors de l'exposition au rayonnement solaire, l'efficacité de réduction photocatalytique était directement dépendante du nombre de bicouches de PSS/TiO<sub>2</sub> avec un maximum de 3 log de réduction obtenu dans le cas de l'addition de 10 bicouches de PSS/TiO<sub>2</sub>

D'un point de vue fondamental, ces systèmes (PSS/TiO<sub>2</sub>)<sub>n</sub> sont très intéressants car avec un nombre conséquent de bicouches, ils nous affranchissent de l'effet toxique du PEI, nous permettant ainsi d'évaluer réellement l'efficacité de désinfection photocatalytique.

### Perspectives

Diverses stratégies pourraient être envisagées afin d'avoir une meilleure connaissance des mécanismes impliqués dans l'effet photocatalytique antibactérien. Ainsi, il serait intéressant :

- pour étayer notre hypothèse selon laquelle les bactéries à Gram négatif adhèrent mieux sur les surfaces hydrophiles des mutants LPS<sup>-</sup> devraient être utilisés.
- d'utiliser la technique de chimiluminescence pour l'identification des ROS en adaptant le système de lecture afin que TiO<sub>2</sub> soit toujours irradié lors de l'ajout du luminol et de la prise de mesure. Avec de tels systèmes continuellement irradiés, nous pourrions ainsi suivre la production et déterminer l'implication des radicaux hydroxyles (avec le mannitol et l'urée comme molécules scavengers) ou de l'oxygène singulet (avec l'histidine) ce que ne nous a pas permis notre technique. Ainsi après avoir sélectionné les molécules scavengers efficaces pour piéger spécifiquement chaque ROS générés, il serait intéressant d'étudier plus précisément, la part de chaque ROS dans les mécanismes de peroxydation lipidique. Il serait également intéressant de comprendre pourquoi les radicaux anions superoxydes O<sub>2</sub><sup>•-</sup> sont générés dans de l'eau physiologique à l'obscurité.
- de compléter les analyses de l'intégrité membranaire par la cytométrie en présence de SOD pour montrer si les radicaux anions superoxydes O<sub>2</sub><sup>•-</sup> générés sont bien responsables des altérations membranaires
- d'obtenir de plus amples informations sur l'état physiologique des bactéries après exposition au traitement. Pour ce faire, nous pourrions utiliser d'autres types de sondes fluorescentes et analyser ces différences de fluorescence par cytométrie. Actuellement, nombreuses sont les sondes fluorescentes disponibles sur le marché, parmi celles-ci, nous pouvons citer les sondes permettant d'évaluer les différences de potentiel

membranaire, d'activité enzymatique ou bien encore les dommages aux acides nucléiques.<sup>398,399</sup>

- de quantifier les dommages à l'ADN en utilisant par exemple le test des comètes.<sup>400</sup>
- de poursuivre l'analyse des modifications protéiques, et plus particulièrement de nous focaliser sur les enzymes afin de voir si leur activité est modifiée par la photocatalyse. De ce fait, nous pourrions réaliser des mutants qui seraient alors dépourvus du gène codant pour l'enzyme et réaliser un suivi de la survie cellulaire afin de voir si cette délétion est létale pour la bactérie ou n'induit qu'un ralentissement de la croissance
- d'identifier les mécanismes de régulation impliqués dans la réponse au traitement photocatalytique.

En ce qui concerne les deux domaines d'applications étudiés, nous pourrions dans le cas du dispositif de traitement de l'air intérieur :

- nous attacher à optimiser la technique d'accroche du catalyseur sur le support. En effet, il est primordial de s'assurer que l'accroche soit efficace afin d'éviter tout relargage de nanoparticules
- tester l'efficacité du dispositif avec d'autres contaminants comme les spores ou les moisissures qui peuvent constituer des problèmes récurrents dans les habitats mal aérés ou humides

Pour la mise au point de textiles auto-désinfectants, il serait intéressant :

- de confirmer l'élargissement du spectre des cibles microbiologiques qu'offre l'association PEI/TiO<sub>2</sub>. Pour cela, il s'agirait de tester d'autres espèces microbiennes comme les spores bactériennes, les champignons ou d'autres espèces bactériennes à Gram négatif (*E.cloacae*, *K.pneumoniae*, *S.Abony*, *S.maltophilia*, *A.baumannii*, *A.hydrophila*...) du fait de leur résistance à la photocatalyse
- d'appliquer ces types de revêtement sur d'autres types de matériaux (coton, nylon...)
- de réaliser des modifications de TiO<sub>2</sub> afin que son activité antimicrobienne dans le domaine du solaire soit augmentée
- d'évaluer l'influence des différents paramètres pouvant influencer sur l'efficacité photocatalytique en conditions réelles (irradiance, humidité relative...)
- d'évaluer la durabilité de la fonctionnalisation des textiles.

---

<sup>398</sup> Joux F, Lebaron P: **Use of fluorescent probes to assess physiological functions of bacteria at single-cell level.** *Microbes and infection* 2000, **2**:1523-1535.

<sup>399</sup> Davey HM: **Life, death, and in-between: meanings and methods in microbiology.** *Applied and environmental microbiology* 2011, **77**(16):5571-5576.

<sup>400</sup> Dhawan A, Bajpayee M, Parmar D: **Comet assay: a reliable tool for the assessment of DNA damage in different models.** *Cell Biology and Toxicology* 2009, **25**:5-32.

# Publications et communications

## Publications

**Gaëlle CARRE**, Dounia BENHAMIDA, Jean PELUSO, Christian D. MULLER, Marie-Claire LETT, Jean-Pierre GIES, Valérie KELLER, Nicolas KELLER and Philippe ANDRE  
On the use of capillary cytometry for assessing the bactericidal effect of TiO<sub>2</sub>. Identification and involvement of reactive oxygen species.

*Photochemical and Photobiological Sciences*, 2013, **12** (4):610-620.

**Gaëlle CARRE**, Erwann HAMON, Jean PELUSO, Peter HORVATOVICH, Nicolas KELLER, Marie-Claire LETT, Valérie KELLER, Christian D.MULLER, Saïd ENNAHAR, Jean- Pierre GIES, and Philippe ANDRE

On the damages induced by TiO<sub>2</sub> photocatalysis on lipid and protein *Escherichia coli* key cell components.

*Applied and Environmental Microbiology*, soumise

Laurent SCHLUR, Sylvie BEGIN-COLIN, Pierre GILLIOT, Mathieu GALLART, **Gaëlle CARRE**, Spiros ZAFEIRATOS, Nicolas KELLER, Valérie KELLER, Philippe ANDRE, Jean Marc GRENECHE, Bernard HEZARD, Marie-Hélène DESMONTS, Geneviève POURROY

Effect of Doping Element on the Visible Light Photocatalytic Activity of Fe- and Al- Doped TiO<sub>2</sub>

*Materials Science and Engineering C*, soumise

Emilie SICK, **Gaëlle CARRE**, Gilliane COUPIN, Kenneth TAKEDA, Jean-Pierre GIES and Philippe ANDRE

A role for CD47 in the phagocytosis of *Listeria monocytogenes* by macrophages

*Medical Microbiology and Immunology*, en révision.

## Communications orales dans des colloques nationaux ou internationaux

*(l'auteur en gras est celui qui a présenté les résultats)*

**2013-1** : **Gaëlle CARRE**, Erwann HAMON, Saïd ENNAHAR, Marie-Claire LETT, Peter HORVATOVICH, Jean- Pierre GIES, Valérie KELLER, Nicolas KELLER and Philippe ANDRE

Bactericidal effect of photocatalysis on the cellular components of *E. coli*.

9<sup>ème</sup> Congrès de la Société Française de Microbiologie, 8 février, Lille, France

**2013-2** : **Gaëlle CARRE**, Erwann HAMON, Saïd ENNAHAR, Marie-Claire LETT, Peter HORVATOVICH, Jean- Pierre GIES, Valérie KELLER, Nicolas KELLER et Philippe ANDRE

Effets photocatalytiques du TiO<sub>2</sub> sur les lipides et les protéines d'*E.coli*.

Séminaire de Microbiologie 3, 11 avril, Strasbourg, France

**2012:** Gaëlle CARRE, Dounia BENHAMIDA, Jean PELUSO, Christian D. MULLER, Marie-Claire LETT, Jean-Pierre GIES, Philippe ANDRE, Valérie KELLER and **Nicolas KELLER**

Photocatalysis applied to bacteria removal: contribution of capillary cytometry, protein 2D Electrophoresis and chemiluminescence methods.

*The 17<sup>th</sup> International Conference on Semiconductor Photocatalysis and Solar Energy Conversion (SPASEC-17), November 13, Florida, USA.*

**2011-1:** Gaëlle CARRE, Nicolas KELLER, Marie-Claire LETT, Valérie KELLER, Jean PELUSO, Jean- Pierre GIES, and Philippe ANDRE

Study of the bactericidal effect of TiO<sub>2</sub> photocatalysis by flow cytometry on *Escherichia coli*.  
*Séminaire de Microbiologie 1, 31 mars, Strasbourg, France*

**2011-2 :** Gaëlle CARRE, Nicolas KELLER, Marie-Claire LETT, Valérie KELLER, Jean PELUSO, Jean- Pierre GIES, and Philippe ANDRE

Bactericidal effect of TiO<sub>2</sub> photocatalysis.

*Journée Campus Illkirch, 3 mai, Illkirch, France*

**2011-3 :** Gaëlle CARRE, Erwann HAMON, Jean PELUSO, Nicolas KELLER, Marie-Claire LETT, Valérie KELLER, Saïd ENNAHAR, Jean- Pierre GIES, and Philippe ANDRE

Décontamination biologique de l'eau, de l'air et des surfaces par photocatalyse.

*Séminaire Jeunes Chercheurs, 10 octobre, Strasbourg, France*

### **Communications orales sur invitation dans des colloques internationaux**

**2012 :** Gaëlle CARRE, Dounia BENHAMIDA, Jean PELUSO, **Christian D. MULLER**, Marie-Claire LETT, Jean-Pierre GIES, Valérie KELLER, Nicolas KELLER and Philippe ANDRE

Capillary cytometry to assess bactericidal effect of TiO<sub>2</sub>

*Irish Cytometry Society, 6-7 november, Galway, Ireland*

**2011:** Gaëlle CARRE, Jean PELUSO, Christian MULLER, Nicolas KELLER, Marie-Claire LETT, Valérie KELLER, Jean- Pierre GIES, and Philippe ANDRE

Bactericidal effect of TiO<sub>2</sub> photocatalysis.

*European Micro-Volume Cytometry congress, 29 november, Strasbourg, France*

### **Communications par affiche dans des colloques nationaux ou internationaux**

**2013:** Gaëlle CARRE, Erwann HAMON, Saïd ENNAHAR, Marie-Claire LETT, Jean- Pierre GIES, Peter HORVATOVICH, Valérie KELLER, Nicolas KELLER, and Philippe ANDRE

TiO<sub>2</sub> photocatalysis effects on lipids and proteins from *Escherichia coli*.

*Congrès FEMS, july 21-25, Leipzig, Germany*

**2012-1 : Gaëlle CARRE**, Jean PELUSO, Christian MULLER, Nicolas KELLER, Marie-Claire LETT, Valérie KELLER, Jean- Pierre GIES, and Philippe ANDRE  
Study of TiO<sub>2</sub> photocatalysis on different bacterial species.  
*Séminaire de Microbiologie 2, 15 mars, Strasbourg, France*

**2012 -2: Gaëlle CARRE**, Dounia BENHAMIDA, Nicolas KELLER, Jean PELUSO, Christian D. MULLER, Marie-Claire LETT, Valérie KELLER, Jean- Pierre GIES and Philippe ANDRE (a fait l'objet d'une communication flash-orale)  
On the use of capillary cytometry for assessing the bactericidal effect of TiO<sub>2</sub>. Identification and involvement of ROS.  
*Solar Chemistry and Photocatalysis: Environmental Applications (SPEA), june 20, Porto, Portugal*

**2012-3 :** Gaëlle CARRE, Nizar DOSS, Sébastien JOSSET, Pierre BERNHARDT, Thierry ROMERO, **Jean-Marc LEDOUX**, Nicolas KELLER, Valérie KELLER, Philippe ANDRE, Florence GOULHEN-CHOLLET, Marie-Claire LETT (a fait l'objet d'une communication flash-orale)  
Advances in photocatalysis at the frontier of microbiology. From fundamental insights to the design of LED-based photocatalytic air purifier  
*15<sup>th</sup> international congress on catalysis, July 1-6, ICC, Munich, Allemagne*

**2011: Gaëlle CARRE**, Nizar DOSS, Pierre BERNHARDT, Thierry ROMERO, Philippe ANDRE, Marie-Claire LETT, Valérie KELLER, Christian MULLER, Jean-Pierre GIES, Nicolas KELLER  
Development of UVC free photocatalytic air purifiers for indoor air decontamination, bacteria and virus bioaerosol removal.  
*Congrès FEMS, june 27, Genève, Suisse*

**2010: Gaëlle CARRE**, Nicolas KELLER, Marie-Claire LETT, Valérie KELLER, Jean-Pierre GIES et Philippe ANDRE  
Décontamination biologique de l'eau, de l'air et des surfaces par photocatalyse.  
*Doctoriales DGA, 4 octobre, Fréjus, France*

## On the use of capillary cytometry for assessing the bactericidal effect of TiO<sub>2</sub>. Identification and involvement of reactive oxygen species †

Cite this: *Photochem. Photobiol. Sci.*, 2013, **12**, 610

Gaëlle Carré,<sup>\*a,b</sup> Dounia Benhamida,<sup>a</sup> Jean Peluso,<sup>c</sup> Christian D. Muller,<sup>c</sup> Marie-Claire Lett,<sup>d</sup> Jean-Pierre Gies,<sup>a</sup> Valérie Keller,<sup>\*b</sup> Nicolas Keller<sup>b</sup> and Philippe André<sup>\*a</sup>

The photocatalytic antimicrobial properties of TiO<sub>2</sub> were studied on *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, and *Pseudomonas aeruginosa* bacterial strains taken as model strains for pathogenic species mainly implied in nosocomial infections. Capillary cytometry, coupled to a double-staining method for visualizing membrane integrity as a cell viability indicator, was highlighted as a rapid, easy-to-use, and automated numeration technique for quantitative and reproducible determination of cellular viability and thus, was able to give an accurate evaluation of the bactericidal effect of UV-A photocatalysis. Cytometry also enabled the study of TiO<sub>2</sub>-bacteria interactions and aggregation in the dark as well as TiO<sub>2</sub> cytotoxicity. Compared with the traditional agar plate cultivation method, a significantly weaker reduction in cell viability was recorded by cytometry whatever the bacteria, TiO<sub>2</sub> concentration, and duration of the photocatalytic treatment. The mismatch between both numeration methods was attributed to: (i) the presence of mixed bacteria-TiO<sub>2</sub> aggregates that could interfere with bacteria measurement on plates, (ii) prolonged contact of the bacteria with TiO<sub>2</sub> during incubation, which could cause additional cytotoxic damage to the bacterial wall, and (iii) the counting of viable but non-culturable bacteria as live bacteria in cytometry, whereas they cannot grow on solid media. A more pronounced difference was observed for *P. aeruginosa* and *S. aureus* bacteria, for which 2.9 and 1.9 log<sub>10</sub> survival reduction overestimations were measured by plate counting, respectively. Using chemiluminescence, full restoration of cell viability by controlled addition of the O<sub>2</sub><sup>•-</sup> scavenger superoxide dismutase enzyme suggests that O<sub>2</sub><sup>•-</sup> acts, in our conditions, as the main reactive oxygen species responsible for the photocatalytic attack towards the targeted bacteria.

Received 14th June 2012,  
Accepted 27th August 2012  
DOI: 10.1039/c2pp25189b

www.rsc.org/ppp

### 1. Introduction

The increase of antibiotic resistant bacteria has become an important public health problem. The emergence and increasing incidence of antibiotic resistant bacteria such as

*Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, and *Pseudomonas aeruginosa* indicate a progressive need to identify and analyse new antibacterial agents.<sup>1–3</sup> Furthermore, many bacteria such as *E. coli* and *P. aeruginosa* are able to initiate waterborne diseases.<sup>4,5</sup> *S. aureus*, is frequently associated with aquatic biotopes and is involved in the formation of aquatic biofilms.<sup>6</sup> Bacterial inactivation by UV-A heterogeneous photocatalysis on TiO<sub>2</sub> has been considered as an alternative disinfection method to several water disinfection techniques used in hospitals, including chlorination, ozonation, and germicidal 254 nm UVC lamps. This advanced oxidation process is based on the activation of a semiconductor by absorption of photons with irradiation wavelengths equal to or greater than the semiconductor band-gap.

Among the used semiconductors, TiO<sub>2</sub> with a 3.2 eV band gap energy in its anatase form and a near-UV illumination, is still the most attractive and efficient example, due to a high quantum yield, a high stability towards photo-corrosion and

<sup>a</sup>Laboratoire de Biophotonique et de Pharmacologie, CNRS and Strasbourg University, 74 route du Rhin, Illkirch, France. E-mail: gaëlle.carre@etu.unistra.fr, andre@unistra.fr; Tel: +33-368854308

<sup>b</sup>Laboratoire des Matériaux, Surface et Procédés pour la Catalyse (LMSPC), CNRS and Strasbourg University, 25 rue Becquerel, Strasbourg, France. E-mail: vkeller@unistra.fr; Fax: +33-368852761; Tel: +33-368852736

<sup>c</sup>Laboratoire d'Innovation Thérapeutique, CNRS and University of Strasbourg, 74 route du Rhin, Illkirch, France

<sup>d</sup>Laboratoire de Génétique Moléculaire, Génomique, Microbiologie, CNRS and University of Strasbourg, 28 rue Goethe, Strasbourg, France

† This paper is published as part of the themed issue of contributions from the 7th European Meeting on Solar Chemistry and Photocatalysis: Environmental Applications held in Porto, Portugal, June 2012.

chemicals, and low costs. The transfer of photogenerated charge carriers to the  $\text{TiO}_2$  surface allows redox reactions to occur with adsorbed species to initiate the formation of reactive oxygen species (ROS).<sup>7</sup> The main ROS produced during the photocatalytic process are  $\text{OH}^\cdot$  hydroxyl radicals and  $\text{O}_2^{\cdot-}$  superoxide anions.<sup>8–10</sup> Other ROS have also been proposed, such as the hydroperoxide radical, hydrogen peroxide, and singlet oxygen.<sup>11</sup> ROS production induces many damages to the bacterial cell, such as lipid peroxidation,<sup>8</sup> protein degradation,<sup>12,13</sup> and DNA damage,<sup>14,15</sup> consequently leading to cell death. Metrological aspects related to the choice of numeration methods for assessing the efficiency of UV-A heterogeneous photocatalysis on microorganisms are crucial, keeping in mind that a valuable count process should be, on the one hand, accurate, and on the other, easily and financially practicable, particularly if the aim is the establishment of standards. Among the various methods, analysis of membrane integrity is described as a rapid parameter generally used to determine cell viability<sup>16</sup> which can be monitored by capillary cytometry in association with a suitable staining procedure.<sup>17</sup> Capillary cytometry presents many advantages compared to counting on agar plate, especially if the building up of standards is targeted, and the possibility of automation as well as that of performing all measurements on a single sampling without additional processing, enabling faster analysis, lowers the number of preparation steps and consequently increases reproducibility. Therefore, capillary cytometry combined with fluorescent probes is emerging as a leading technology for cultivation-free analysis of bacterial viability in disinfection experiments.<sup>12,18</sup> Routinely used for comparing the size and granularity of suspended bacteria or human cells, the use of capillary cytometry remains scarcely reported for assessing the efficiency of photocatalysis as a bactericidal treatment, except in the study of Gogniat *et al.*<sup>19</sup>

It is established that short lifetime ROS emitted during the photocatalytic process are implied in the bactericidal effect of  $\text{TiO}_2$ <sup>20</sup> and that the first target of the oxidative species is the cellular wall.<sup>21</sup> Usually, both formation and amount of ROS such as  $\text{O}_2^{\cdot-}$ ,  $\text{H}_2\text{O}_2$  and  $\text{OH}^\cdot$  are monitored by electron paramagnetic resonance coupled with the spin-trapping technique.<sup>11,22–24</sup> However, this method cannot be used in the presence of living cells, and so, the chemiluminescence (CL) technique has emerged as an easy and rapid alternative method to identify the nature of ROS produced during photocatalysis and to point out relationships with cell viability. Luminol is the most commonly used CL probe for measuring ROS concentration in biological systems, more specifically that of  $\text{O}_2^{\cdot-}$ , identified using superoxide dismutase (SOD) scavenger which is one of the most important antioxidative enzymes, playing an important role in the balance between oxidation and antioxidation of the organism.<sup>23,25,26</sup>

The aim of this paper is thus to first highlight the use of capillary cytometry for evaluating the bactericidal efficiency of the liquid phase photocatalytic treatment toward *S. aureus*, *E. coli*, and *P. aeruginosa* bacteria, and to compare the results with counts on agar plate, known as the traditional

numeration method.<sup>12,27</sup> Further, the identification of the ROS implied in the photocatalytic process was monitored by CL and correlated with cell viability and the observed bactericidal effect.

## 2. Experimental

### 2.1 Bacterial strain and bacterial inoculums

Bacterial strains were *E. coli* (ATCC 8739), *P. aeruginosa* (CIP 82118) and *S. aureus* (ATCC 6538). Bacteria were kept at  $-80^\circ\text{C}$  in brain heart infusion broth (BioRad) supplemented with 20% glycerol. Before each experiment, one loopful of bacteria was scratched from the frozen surfaces of the stock culture, seeded on a slant of trypticase soy agar (TSA) (BioRad), and grown aerobically at  $37^\circ\text{C}$  overnight.

Bacterial inoculum was monitored by setting the culture optical density (measured in distilled water at an absorbance wavelength of 620 nm) at 0.156 for *E. coli* and *P. aeruginosa* and 0.300 for *S. aureus*, corresponding to  $10^8$  CFU  $\text{mL}^{-1}$ . Bacterial suspensions were further adjusted to  $10^6$  CFU  $\text{mL}^{-1}$  in sterile water.

### 2.2 Photocatalytic device and procedure

Experiments were performed with commercial  $\text{TiO}_2$  aerioxide P25 (Degussa-Evonik, 20% rutile–80% anatase crystalline forms with a specific surface area of  $50\text{ m}^2\text{ g}^{-1}$ ). The photocatalytic device was composed of a 96 well plate, with each  $7 \times 11.4$  mm well acting as a liquid phase photocatalytic reactor, and of four equidistant commercial BlackLight Blue lamps (BLB, 40W, Actinic, Philips) with a spectral peak centered at 365 nm, thus allowing a homogeneous  $30\text{ W m}^{-2}$  irradiance top-illumination of the different wells. Each photocatalytic well reactor was filled with 90  $\mu\text{L}$  of the  $10^6$  CFU  $\text{mL}^{-1}$  bacterial suspension to which  $\text{TiO}_2$  was added at different concentrations in distilled water to get a  $\text{TiO}_2$  concentration in the well reactor ranging from 0 to  $0.8\text{ g L}^{-1}$ . The wells were further maintained under orbital stirring at 1000 rpm during the course of the runs to ensure adequate mixing and contact between  $\text{TiO}_2$  and bacteria. The photocatalytic suspensions displayed a pH of 7.8. The tests were carried out with or without UV-A radiation (for 0, 30, or 60 min). Each operating condition in terms of test duration and of  $\text{TiO}_2$  concentration corresponded to a single well and was triplicated.

### 2.3 Live/dead kit and capillary cytometry

For cytometry analysis, positive controls were cells in exponential growth phase while negative control bacteria were treated with sodium hypochlorite (4.5 chlorometric degree). Cellular viability was evaluated by using the Live/dead BacLight kit (Invitrogen), in which the analysis of membrane integrity for distinguishing viable from dead cells was performed following manufacturer instructions, through a double-staining method combining two fluorescent probes: Syto9 and propidium iodide (PI). Syto9, a green fluorescent nucleic acid stain, can stain live and dead bacteria, whereas propidium iodide

penetrates only in dead bacteria with damaged membranes.<sup>12,28</sup> After bacterial staining, the different samples were analyzed on the Guava EasyCyte Plus system with Guava Express® Plus/Expresspro softwares (Merck Millipore Guava Tech), equipped with a 488 nm blue excitation laser and four emission filters at 520/40, 585/42, 675/30 and 780/30 nm. Cytometry provided the small angle forward scatter (FSC) and side scatter (SSC) intensities of TiO<sub>2</sub>-bacteria mixed systems after the different photocatalytic runs. For signal acquisition, the trigger was set to cellular autofluorescence at 780 nm, and SSC, FSC, and fluorescence intensity parameters were recorded for 10 000 cells. A dot plot gate was used on forward and side scatter to eliminate debris. For all bacterial strains, an initial population of 10<sup>6</sup> CFU mL<sup>-1</sup> was used as recommended by the kit.

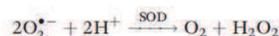
Whatever the numeration method (cytometry or agar plate count), control C<sub>0</sub> (live bacteria without TiO<sub>2</sub> in the dark in CFU mL<sup>-1</sup>) was used to calculate log reduction and C corresponded to the number of live bacteria in CFU mL<sup>-1</sup>.

#### 2.4 Cell viability determined by counts on agar plate

After the different photocatalytic runs and in parallel to capillary cytometry analysis, bacteria were counted on TSA. Each agar plate was incubated at 37 °C for 24 h.

#### 2.5 Identification and scavenger-helped inhibition of ROS during the photocatalytic process

Taking the operating conditions with 0.1 g L<sup>-1</sup> TiO<sub>2</sub>, ROS detection was realized by the CL method, based on the detection of the photon emitted by the luminol probe, in response to ROS. Each bacterial strain (1 mL, corresponding to 1.0 × 10<sup>8</sup> CFU) was added to 9 mL distilled water. Each bacteria suspension (3.6 mL) at 1.0 × 10<sup>7</sup> CFU mL<sup>-1</sup> was added to 400 μL of 1 g L<sup>-1</sup> TiO<sub>2</sub> suspension to asset the final TiO<sub>2</sub> concentration at 0.1 g L<sup>-1</sup>. Characterization of ROS was obtained by the use of the ROS scavenger SOD. It is well known that SOD is an enzyme which catalyses the conversion of superoxide radicals into hydrogen peroxide and molecular oxygen as follows:



The SOD enzyme was added following three different ways in terms of time and concentration during the photocatalytic run: 500 U at t<sub>0</sub>, 500 U at t<sub>0</sub> followed by 500 U at t<sub>30</sub>, and 1000 U at t<sub>0</sub>. ROS measurements were performed every 15 min for 1 h, by measuring the relative light unit (RLU) signal at room temperature with a Lumac M-2500 Biocounter (Perstorp Analytical) after mixing 0.1 mL of 10<sup>-4</sup> M luminol (Sigma), 0.1 mL of 1.0 M sodium carbonate, and 0.1 mL of the bacterial suspension sampled from the well reactor, either with or without SOD.<sup>29</sup> Photon emission and the RLU signal were directly correlated to the ROS production since luminol was in excess. All samples were analyzed in triplicate to ensure the reproducibility of the method. To prove that ROS production was truly implied in the TiO<sub>2</sub> bactericidal effect, bacterial counts were realized after each run in the presence or in the absence of SOD.

#### 2.6 Statistical analysis

Statistical analysis was performed using Prism 5 (GraphPad Software) and was calculated using one way ANOVA test.

### 3. Results and discussion

#### 3.1 Capillary cytometry study of TiO<sub>2</sub>-bacteria mixed systems

Capillary cytometry was performed for investigating mixed systems formed by aggregated TiO<sub>2</sub> nanoparticles and bacteria through the SSC vs. FSC dot plots (Fig. 1). SSC is generally thought to be related to both cell granularity and cell mass,

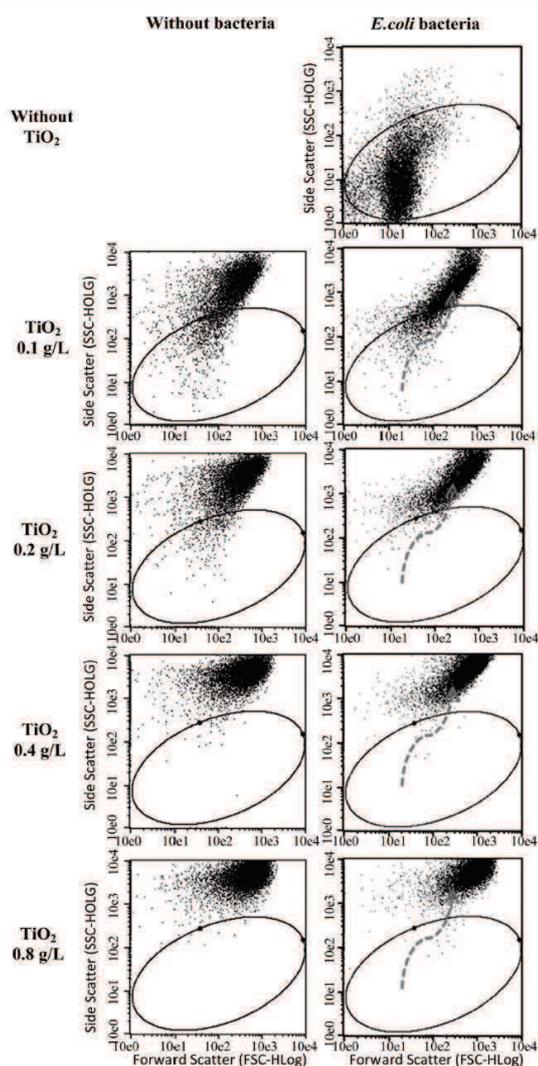


Fig. 1 Influence of the TiO<sub>2</sub> concentration on both the FSC and SSC parameters of TiO<sub>2</sub>-*E. coli* live bacteria mixed systems (10 000 events) in the dark.

whereas FSC corresponds to cell volume, so that in the present work, the cell terminology is used here whether it concerns bacterial cells, TiO<sub>2</sub> grains, or mixed systems.

Fig. 1 shows the influence of the TiO<sub>2</sub> concentration on both FSC and SSC parameters of TiO<sub>2</sub>-*E. coli* live bacteria mixed systems in the dark. In the absence of any bacteria, the aggregation of TiO<sub>2</sub> Degussa P-25 particles was particularly more pronounced when the TiO<sub>2</sub> concentration was high, with an increase of FSC and SSC from 150 to 488 arbitrary units (A.U.) and from 1120 to 4467 A.U., respectively, with increasing the TiO<sub>2</sub> concentration from 0.1 to 0.8 g L<sup>-1</sup>.

In the absence of any TiO<sub>2</sub> particles, the *E. coli* live bacteria population was homogeneous and not agglomerated, with an FSC centered at 17 A.U. and an SSC at around 7 A.U. One could note that dead bacteria also did not show any agglomeration phenomena, and also displayed low values of both parameters (data not shown). Similar results were also obtained for live and dead *P. aeruginosa* and *S. aureus* (data not shown). TiO<sub>2</sub> addition in the presence of *E. coli* live bacteria induced a shift of the FSC and SSC signals, as visualized by the arrows, from 17 and 7 A.U. to 777 and 4869 A.U., respectively, in the presence of 0.8 g L<sup>-1</sup> TiO<sub>2</sub>. The increase of both parameters suggests that TiO<sub>2</sub> aggregation with bacteria increases with TiO<sub>2</sub> concentration. This shift was also observed with *P. aeruginosa*, *S. aureus*, and *E. coli* live or dead cells (data only shown for live *E. coli* cells). In the absence of any bacteria and close to the isoelectric point of TiO<sub>2</sub> P25 (*i.e.* about 7.0), attractive van der Waals forces dominate over the repulsive electrostatic forces, causing rapid TiO<sub>2</sub> nanoparticle aggregation in water,<sup>30–32</sup> that quickly exceeds the micron size and is affected by many parameters, such as pH.<sup>21</sup> The interaction between nanoparticles and negatively charged bacterial cells is often reported to occur *via* interfacial forces, which can be affected by the physico-chemical properties of the medium (pH, ionic strength, electrolyte composition, temperature, *etc.*).<sup>32,33</sup> Such TiO<sub>2</sub>-bacteria aggregation aspects are of high importance, since cell adsorption onto aggregated TiO<sub>2</sub> has been suggested to be key to the bactericidal effect of photocatalysis by being a prerequisite for bacterial inactivation.<sup>19</sup>

It can not be ruled out that aggregation would have been more pronounced if the photocatalytic tests had been carried out in a more acidic reaction medium, since it would have potentially provided a better contact between the positively charged TiO<sub>2</sub> surface and the negatively charged bacterial cells.

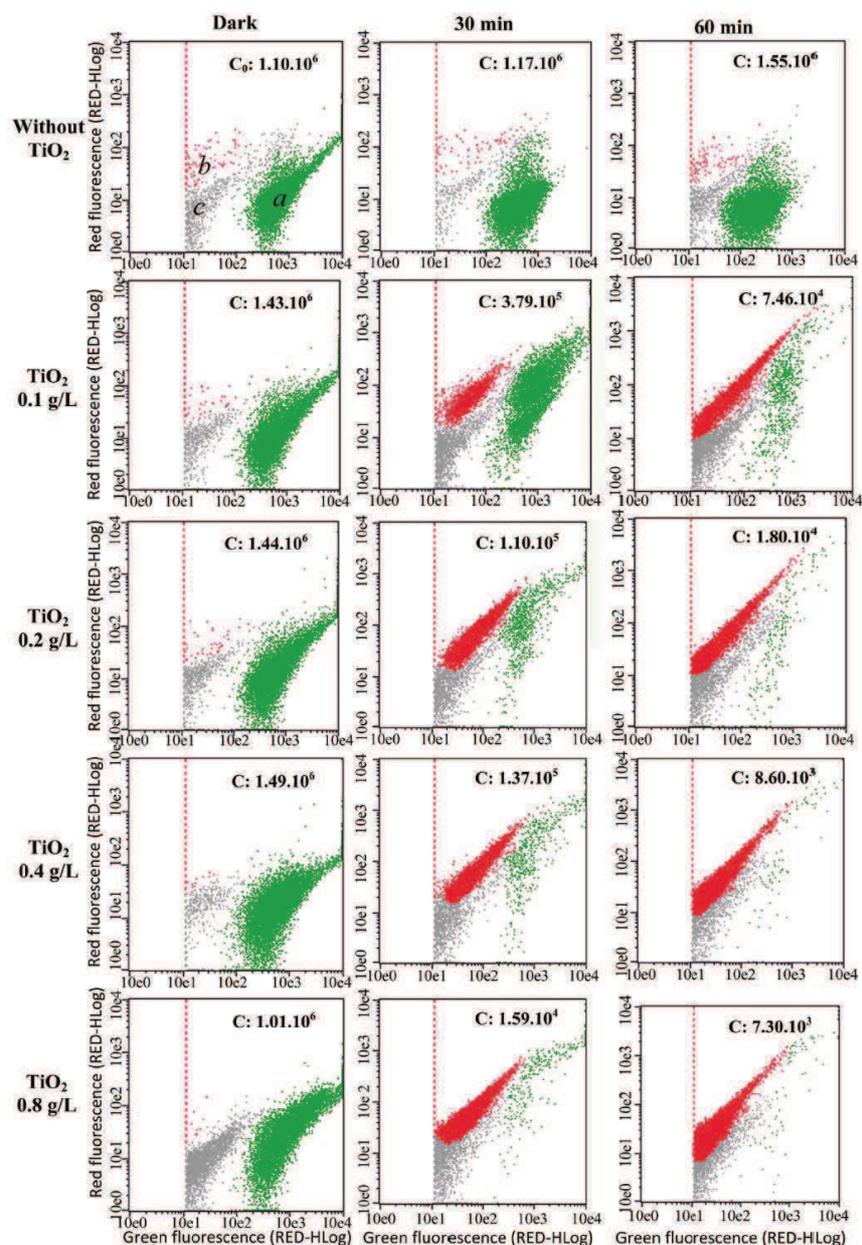
### 3.2 Cytometry study of cell viability during the photocatalytic process

Fluorescence channels of the cytometer were used after bacterial staining for studying *P. aeruginosa*, *E. coli*, and *S. aureus* cell viability as a function of the TiO<sub>2</sub> concentration and of the exposure duration under UV-A light (Fig. 2 and 3A–C). Taking *P. aeruginosa* cell as the target, Fig. 2 evidenced three areas corresponding to: (a) live bacteria with high and low levels of green and red fluorescence, respectively; (b) dead bacteria and bacteria with a damaged membrane, which could integrate both fluorochromes; and (c) TiO<sub>2</sub> photocatalyst or cell debris

fluorescence defined as an area with lower green fluorescence (below the green fluorescence threshold) and a lower red fluorescence.

The cytotoxic effect of TiO<sub>2</sub> on cell viability was first investigated by studying the influence of the TiO<sub>2</sub> concentration in the dark. For *E. coli* (Fig. 3B) and *S. aureus* (Fig. 3C), an increase in the TiO<sub>2</sub> concentration from 0.1 to 0.8 g L<sup>-1</sup> induced a decrease in the number of live bacteria from  $2.32 \times 10^6$  to  $1.31 \times 10^6$  CFU mL<sup>-1</sup> and from  $1.11 \times 10^6$  to  $9.32 \times 10^5$  CFU mL<sup>-1</sup>, respectively, with a maximal cytotoxic effect obtained with the highest TiO<sub>2</sub> concentration (0.8 g L<sup>-1</sup>), although, this reduction did not exceed 0.3 log<sub>10</sub>. In contrast, no cytotoxic effect has been obtained for *P. aeruginosa* (Fig. 2 and 3A). These cytotoxic effects were very low compared to the reduction obtained through photocatalysis.

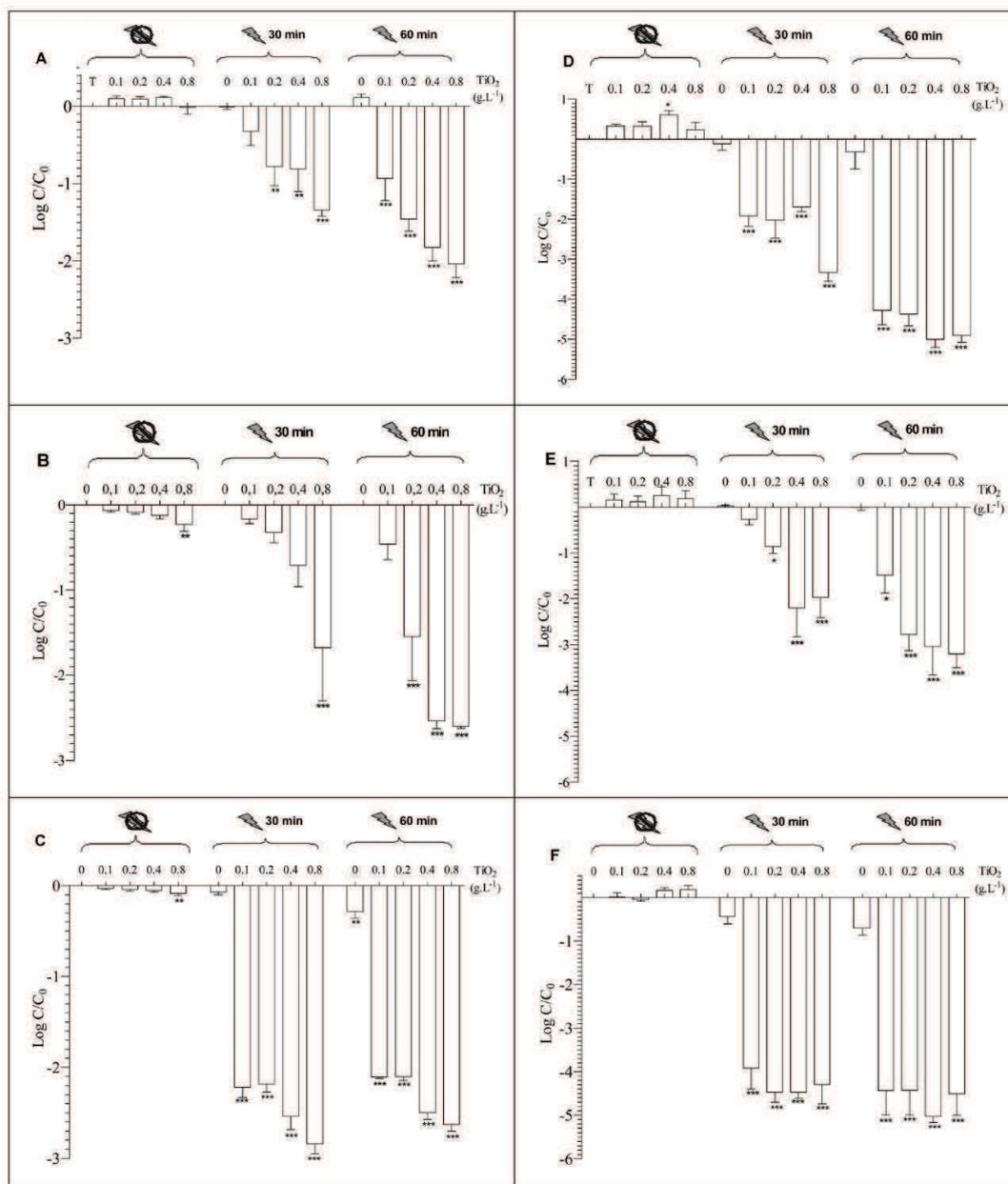
This is in agreement with results reported by Gogniat *et al.* which suggest that adsorption without illumination can alter *E. coli* membrane integrity and that the phenomenon was greatly amplified during illumination,<sup>16</sup> as well the report by Pagnout *et al.* on the toxicity of TiO<sub>2</sub> nanoparticles on *E. coli* in the dark, evaluated by double-staining/epifluorescence microscopy.<sup>32</sup> This results from the sorption of TiO<sub>2</sub> nanoparticles onto the *E. coli* cell wall, which causes direct toxicity toward bacteria in the dark through several mechanisms, such as interruption of transmembrane electron transfer, modification of the membrane potential, or physical damage resulting in leakage of the cell content. Pagnout *et al.* also highlighted the role played by interfacial bacteria-TiO<sub>2</sub> electrostatic interactions—which are strongly influenced by physico-chemical parameters such as pH, ionic strength, and electrolyte composition—in the TiO<sub>2</sub> nanoparticle toxicity, which vary within a wide range of the magnitude as a function of the experimental conditions. The paramount role of electrostatic interaction was also evidenced in the initial mechanism by which antimicrobial cationic peptides target the negatively charged lipid membranes of bacteria, and a relationship was drawn between the surface charge of the peptide and the bacteria, the membrane binding activity, and the biocidal effect.<sup>34,35</sup> In addition, Zhang *et al.* have also reported that the catalyst nanoparticles adhered to the outer cell membrane of *E. coli* so that the bacteria could not nourish from aqueous media even in the dark.<sup>36</sup> The increase of the cytotoxicity with increasing the TiO<sub>2</sub> concentration was in agreement with the key role played by the cell adsorption at the TiO<sub>2</sub> surface,<sup>37,38</sup> since it strongly enhanced the bacteria-TiO<sub>2</sub> contact. This contact is seen as the first step of the reaction by analogy to chemical molecule adsorption, and enables a more efficient use of ROS generated under irradiation. Concerning the photocatalytic efficiency, Fig. 2 shows that the cell reduction for *P. aeruginosa* strongly depended on the TiO<sub>2</sub> concentration and on the irradiation duration (30 or 60 min), a substantial drop in the green fluorescence in area (a) being observed simultaneously to the increase in the red fluorescence area (b), the phenomena being more pronounced with increasing the TiO<sub>2</sub> concentration and the irradiation duration. Indeed, a TiO<sub>2</sub> concentration of 0.1 g L<sup>-1</sup> reduced the amount of live bacteria



**Fig. 2** Influence of the TiO<sub>2</sub> concentration and of the duration under UV-A light (30 or 60 min) on *P. aeruginosa* cell viability analysis, determined by capillary cytometry. Bacteria were double-stained with Syto9 (green fluorescence) and PI (red fluorescence). Different fluorescence zones labelled as a, b, and c were defined, corresponding to live bacteria, to dead cells, and to TiO<sub>2</sub> photocatalyst or cell debris fluorescence, respectively.

from  $1.43 \times 10^6$  initially, to  $3.79 \times 10^5$  CFU mL<sup>-1</sup> and subsequently down to  $7.46 \times 10^4$  CFU mL<sup>-1</sup> for 30 and 60 min of UV-A exposure duration, respectively. In a more pronounced manner, at  $0.8 \text{ g L}^{-1}$  of TiO<sub>2</sub>, the amount of live bacteria was reduced from  $1.01 \times 10^6$  initially, down to  $1.59 \times 10^4$  CFU mL<sup>-1</sup>

and subsequently to  $7.30 \times 10^3$  CFU mL<sup>-1</sup> for 30 and 60 min of UV-A exposure, respectively. An optimum reduction of the *P. aeruginosa* population was thus obtained at  $0.8 \text{ g L}^{-1}$  TiO<sub>2</sub> and 60 min of UV-A irradiation, with a 3 log<sub>10</sub> reduction. Similar results were obtained for *E. coli* and *S. aureus* (data not shown).



**Fig. 3** Influence of the photocatalytic treatment on *P. aeruginosa* (A, D), *E. coli* (B, E) and *S. aureus* (C, F) cell viability, determined by capillary cytometry (left column) and by counting on agar plate (right column). Bars indicate standard deviations. \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ , \*\*\* $P < 0.001$ : significantly different according to the one-way ANOVA test.

### 3.3 Cell viability comparison between capillary cytometry and agar plate count

Fig. 3 compares the bacterial  $\log_{10}$  reduction during the photocatalytic bactericidal treatment on *P. aeruginosa*, *E. coli*, and

*S. aureus* evaluated by cytometry and agar plate count, and reported in Fig. 3A–C (left column) and Fig. 3D–F (right column), respectively.

In both methods, the photocatalytic inactivation of *P. aeruginosa* (Fig. 3A,D) and *E. coli* (Fig. 3B,E) strongly depended on

both the TiO<sub>2</sub> concentration and the irradiation exposure duration, with an increase in the cellular viability reduction determined by cytometry of up to 2.6 and 2.0 log<sub>10</sub> units for 60 min of run at 0.8 g L<sup>-1</sup> TiO<sub>2</sub> in the case of *E. coli* and *P. aeruginosa*, respectively. A similar trend was observed with viable counts on agar plate, but with up to 3.2 and 4.9 log<sub>10</sub> unit reduction, respectively. For the Gram positive *S. aureus*, the influence of both TiO<sub>2</sub> content and irradiation exposure duration was less strongly marked, and a duration longer than 30 min as well as a TiO<sub>2</sub> content higher than 0.1 g L<sup>-1</sup> did not increase significantly the bactericidal effect, even if the same mismatch was observed between both methods, with 2.8 and 4.3 log<sub>10</sub> of cell viability reduction being recorded for 30 min at 0.1 g L<sup>-1</sup> by cytometry and agar plate count, respectively.

Comparison of both numeration methods revealed that higher unit reductions were obtained by counting on agar plate. Indeed, after 60 min of photocatalytic test at 0.8 g L<sup>-1</sup> of TiO<sub>2</sub>, *P. aeruginosa*, *E. coli*, and *S. aureus* displayed a viability reduction of 4.9, 3.2, and 4.5 log<sub>10</sub> by agar plate counting, respectively, whereas 2.0, 2.6, and 2.6 log<sub>10</sub> was measured by cytometry, respectively. Thus, a 5 log<sub>10</sub> unit reduction in survival counts was obtained by the traditional method whereas the maximum obtained by the fluorescence technique was only 3 log<sub>10</sub> bacterial reduction. This higher photocatalytic sensitivity of *Staphylococcaceae* in aqueous solution compared to *E. coli* or *P. aeruginosa* bacteria was in agreement with results obtained by different authors.<sup>21,39,40</sup> It is known that microbial susceptibility to antiseptic and disinfectant agents are classified in a descending resistance ranking order as follows: Gram negative bacteria (*E. coli*, *P. aeruginosa*) > Gram positive bacteria (*S. aureus*).<sup>41</sup> Additionally, in photocatalysis, an explanation of the sensitivity differences could be attributed to the specific Gram positive cell wall structure characterized by a single peptidoglycan layer, whereas Gram negative bacteria presents a peptidoglycan layer surrounded by an outer membrane. One could note that a similar ranking order of resistance has been obtained on self-disinfecting surfaces by Dunlop *et al.*, targeting the same microorganisms and using fluorescence microscopy associated with the cellular viability test after incubation on agar plates as the numeration technique.<sup>42</sup>

Similar divergent results between both numeration methods were also obtained for *Salmonella* Abony and *Bacillus cereus* (data not shown). Three non-exclusive explanations for this discrepancy in terms of viability reduction level can be put forward. First, the divergence could be related to the presence of mixed bacteria-TiO<sub>2</sub> aggregates, that could interfere with the bacteria measurement on conventional plate counts. Indeed, whereas each fluorescent event was quantified by cytometry as corresponding to a single bacterium, the traditional plate count technique could not discriminate between TiO<sub>2</sub>-bacteria aggregates, including an individual or multiple bacteria, since the aggregate could only produce one colony. So even if all cells in the aggregate were capable of dividing, they will be recorded as a single CFU.<sup>43</sup> Second, TiO<sub>2</sub> nanoparticles remained in contact with bacteria during plate incubation

(24 h) and may induce many cytotoxic damages to the bacterial wall, whereas incubation between TiO<sub>2</sub> and bacteria was reduced to the duration of the photocatalytic run (60 min) for direct methods based on fluorescent probes, thus reducing the cytotoxic effect of TiO<sub>2</sub>. A third explanation could result from the frequent appearance in extreme conditions, like those of disinfection, of a special state of bacteria called "viable but non-culturable" (VBNC). VBNC bacteria, due to this loss of cultivability in standard culture media, are not considered as viable bacteria during numeration on plates, while they are taken into account by cytometry during the cell viability evaluation through the membrane integrity criteria. The inability of bacterial counts on agar plate to detect VBNC bacteria has indeed been reported as one of the most important significant limitations of the method, making its reliability quite limited.<sup>12,44</sup>

#### 3.4 Identification and involvement of O<sub>2</sub><sup>•-</sup> ROS in the bactericidal effect of TiO<sub>2</sub>

The RLU emission, correlated to the ROS production, was monitored during the photocatalytic run on *P. aeruginosa*, *E. coli*, and *S. aureus* bacteria in the absence or presence of 0.1 g L<sup>-1</sup> TiO<sub>2</sub> (Fig. 4A-C). Whatever the bacteria species tested, a stable and low RLU signal at about 3 × 10<sup>4</sup> RLU (baseline level) was measured in the absence of TiO<sub>2</sub> during the run (60 min), whereas in the presence of 0.1 g L<sup>-1</sup> TiO<sub>2</sub>, the RLU signal strongly increased up to 1.0 × 10<sup>5</sup> RLU for *P. aeruginosa*, 1.7 × 10<sup>5</sup> RLU for *E. coli*, and 1.4 × 10<sup>5</sup> RLU for *S. aureus*. These results are in agreement with the fact that TiO<sub>2</sub> is able to produce a large amount of ROS under UV-A illumination.

ROS identification was performed using SOD as a ROS scavenger molecule, SOD being an enzyme which specifically traps O<sub>2</sub><sup>•-</sup>, one of the ROS emitted during the photocatalytic process, by catalysing the conversion of superoxide radicals into hydrogen peroxide and molecular oxygen. Fig. 4A-C suggests that whatever the bacteria species, the addition of 1000 U of SOD at *t*<sub>0</sub> of the photocatalytic run with 0.1 g L<sup>-1</sup> TiO<sub>2</sub> completely inhibited the RLU signal down to its baseline level throughout the course of the test. It is noteworthy that the addition of a lower SOD concentration (500 U) only inhibited the RLU signal for 30 min before the RLU signal reached or at least came closer to its level without any SOD. This suggested that in this operating condition, the SOD enzyme was not in excess relative to the ROS produced by illuminated TiO<sub>2</sub> and, therefore, that inhibition of the SOD effect could result from the degradation of SOD by UV-A irradiation, or more probably from the photocatalytic attack of the SOD enzyme. However, this effect towards SOD would be slow, because partial SOD inhibition took place only after 30–45 min of the test, and not at the beginning of the test. It should also be pointed out that the organic role of the SOD enzyme, *i.e.* to catalyze the 2O<sub>2</sub><sup>•-</sup> + 2H<sup>+</sup> → O<sub>2</sub> + H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> reaction, makes impossible the oxidation of the SOD by the O<sub>2</sub><sup>•-</sup> substrate itself. This was confirmed by adding a second 500 U dose of SOD at *t*<sub>30</sub> of the test consecutively to the initial addition of 500 U SOD. This consecutive double SOD dose maintained the RLU signal at its baseline level over the whole test.

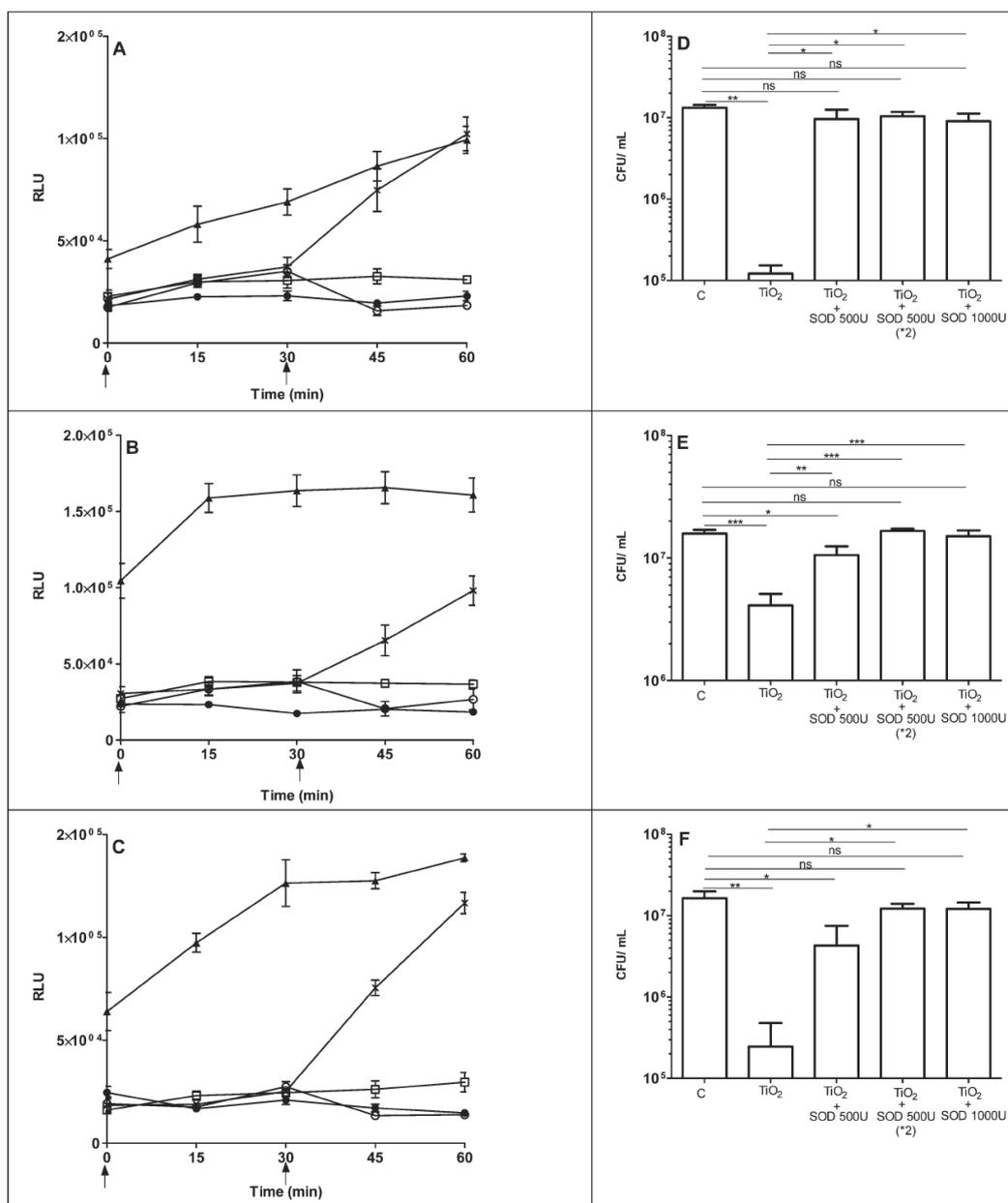


Fig. 4 Left: Chemiluminescence signal expressed in RLU recorded during a 60 min photocatalytic test targeting *P. aeruginosa* (A), *E. coli* (B) and *S. aureus* (C) bacteria ( $10^7$  CFU mL<sup>-1</sup>), with  $0.1$  g L<sup>-1</sup> TiO<sub>2</sub> (▲) and without TiO<sub>2</sub> (□). Effect of the SOD enzyme as O<sub>2</sub><sup>•-</sup> ROS scavenger at different units: SOD 500 U at t<sub>0</sub> + 500 U at t<sub>30</sub> (○); SOD 1000 U (●). Right: Effects of the different units of SOD on the bacterial growth of *P. aeruginosa* (D), *E. coli* (E) and *S. aureus* (F) after 60 min of photocatalytic treatment with UV-A irradiation at  $0.1$  g L<sup>-1</sup> TiO<sub>2</sub>. Bars indicate standard deviations. \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ , \*\*\* $P < 0.001$ : significantly different according to the one-way ANOVA test; ns: not significant.

The involvement of the O<sub>2</sub><sup>•-</sup> radical in the bactericidal effect of TiO<sub>2</sub> in our experimental test conditions was double-checked by investigating the influence of the SOD enzyme on

*P. aeruginosa*, *E. coli*, and *S. aureus* bacterial growth, shown in Fig. 4D–F. Counts on agar plate were performed after 60 min in the presence of SOD added following three different ways as

previously described. It was found that 60 min of run at 0.1 g L<sup>-1</sup> TiO<sub>2</sub> induced a reduction of the bacterial population, from 1.33 × 10<sup>7</sup> to 1.21 × 10<sup>5</sup> CFU mL<sup>-1</sup>, 1.58 × 10<sup>7</sup> to 4.11 × 10<sup>6</sup> CFU mL<sup>-1</sup>, and 1.63 × 10<sup>7</sup> to 2.45 × 10<sup>5</sup> CFU mL<sup>-1</sup> for *P. aeruginosa*, *E. coli*, and *S. aureus*, respectively. Whatever the bacteria tested, a 1000 U SOD addition completely restored the cell viability during the photocatalytic process. When the SOD enzyme acts as a scavenger for O<sub>2</sub><sup>•-</sup>, so that O<sub>2</sub><sup>•-</sup> cannot inactivate the bacterial cells, the cell viability is completely restored, although other ROS are still generated at the surface of the illuminated TiO<sub>2</sub>. Thus, we can propose that among the different ROS generated at the surface of TiO<sub>2</sub>, O<sub>2</sub><sup>•-</sup> acts as the main ROS taking part in the bactericidal effect in our experimental test conditions. Except for *P. aeruginosa* bacteria, this restoration was SOD concentration dependent. Indeed, a 500 U SOD dose was sufficient enough to completely restore the cell viability of *P. aeruginosa* bacteria. This dose was too weak to fully inhibit the effects of ROS in the cases of *E. coli* and *S. aureus* bacteria, and thus, two consecutive 500 U SOD doses or a single dose of 1000 U SOD was necessary for enabling the complete restoration of the cell viability of such targets.

#### 4. Conclusions

We have shown that capillary cytometry, coupled to a double-staining method for visualizing membrane integrity as a cell viability indicator, is an interesting numeration technique for evaluating the bactericidal effect of UV-A photocatalysis towards *P. aeruginosa*, *E. coli* and *S. aureus* bacteria.

Comparison with traditional agar plate count pointed out that a significantly higher reduction in cell viability was recorded through the cultivation method whatever the targeted bacteria, the TiO<sub>2</sub> concentration, or the duration of the photocatalytic treatment. A more pronounced difference was observed for *P. aeruginosa*, and *S. aureus* bacteria, for which a 2.9 and 1.9 log<sub>10</sub> survival reduction overestimation was measured by plate counting, respectively. The divergence between both numeration methods, even if similarities were observed, was attributed to the presence of mixed bacteria-TiO<sub>2</sub> aggregates that could interfere with (i) the bacteria measurement on conventional plate counts, (ii) the count of VBNC as live bacteria in cytometry that could not grow on solid media, and (iii) the prolonged contact of bacteria with TiO<sub>2</sub> during incubation that could cause additional cytotoxic damage to the bacterial wall.

Compared to culture on agar plate, cytometry benefits from an easy automation of the method, its rapidity of implementation, and from the interest of analysing a single sampling, which lowers the number of preparation steps, enables faster analysis, and thus, increases reproducibility. Cytometry also enabled studying TiO<sub>2</sub>-bacteria interaction and aggregation in the dark as well as TiO<sub>2</sub> cytotoxicity.

The role of O<sub>2</sub><sup>•-</sup> in the bactericidal effect of photocatalysis on TiO<sub>2</sub> was studied by chemiluminescence and double-checked through the help of the SOD enzyme as O<sub>2</sub><sup>•-</sup>

scavenger. The SOD enzyme inhibited the activity of O<sub>2</sub><sup>•-</sup> on the cell membrane, phospholipid peroxidation, or other cell component damage implied in the TiO<sub>2</sub> bactericidal effect, so that total or partial restoration of cell viability was obtained by the controlled addition of the SOD enzyme. Thus, we can propose that O<sub>2</sub><sup>•-</sup> acts, in our experimental conditions, as the main ROS responsible for the photocatalytic inactivation of the bacteria.

Work is ongoing for (i) consideration of other cell viability indicators using fluorescent probes specific to enzyme activity, membrane potential, or DNA lesions, for analyzing relationships between the photocatalytic treatment and different physiologic and metabolic states of bacteria population corresponding to damages induced by (oxidative) stress, and (ii) for studying the impact of ROS on protein modifications and lipid peroxidation.

#### Acknowledgements

The authors are grateful to DGA (Direction Générale de l'Armement) and Alsace regional council for financially supporting this work in the form of a PhD grant for G.C.

#### References

- 1 J. A. Karlowsky, P. R. Lagace-Wiens, P. J. Simner, M. R. DeCorby, H. J. Adam, A. Walkty, D. J. Hoban and G. G. Zhanel, Antimicrobial resistance in urinary tract pathogens in Canada from 2007 to 2009: CANWARD surveillance study, *Antimicrob. Agents Chemother.*, 2011, **55**, 3169–3175.
- 2 M. E. De Kraker, P. G. Davey and H. Grundmann, Mortality and hospital stay associated with resistant *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli* bacteremia: estimating the burden of antibiotic resistance in Europe, *PLoS Med.*, 2011, **8**, e1001104.
- 3 H. Hanberger, D. Arman, H. Gill, V. Jindrak, S. Kalenic, A. Kurecz, M. Licker, P. Naaber, E. A. Scicluna, V. Vanis and S. M. Walther, Surveillance of microbial resistance in European Intensive Care Units: a first report from the Care-ICU programme for improved infection control, *Intensive Care Med.*, 2009, **35**, 91–100.
- 4 H. Leclerc, L. Schwartzbrod and E. Dei-Cas, Microbial agents associated with waterborne diseases, *Crit. Rev. Microbiol.*, 2002, **28**, 371–409.
- 5 E. J. Anaissie, S. R. Penzak and M. C. Dignani, The hospital water as a source of nosocomial infections, *Arch. Intern. Med.*, 2002, **162**, 1483–1492.
- 6 T. Schwartz, W. Kohnen, B. Jansen and U. Obst, Detection of antibiotic-resistant bacteria and their resistance genes in wastewater, surface water, and drinking water biofilms, *FEMS Microbiol. Ecol.*, 2003, **43**, 325–335.
- 7 M. Cho, H. Chung, W. Choi and J. Yoon, Different inactivation behaviors of MS-2 phage and *Escherichia coli* in TiO<sub>2</sub>

- photocatalytic disinfection, *Appl. Environ. Microbiol.*, 2005, **71**, 270–275.
- 8 P. C. Maness, S. Smolinski, D. M. Blake, Z. Huang, E. J. Wolfrum and W. A. Jacoby, Bactericidal activity of photocatalytic TiO<sub>2</sub> reaction: toward an understanding of its killing mechanism, *Appl. Environ. Microbiol.*, 1999, **65**, 4094–4098.
  - 9 A. Vohra, D. Y. Goswami, D. A. Deshpande and S. S. Block, Enhanced photocatalytic inactivation of bacterial spores on surfaces in air, *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.*, 2005, **32**, 364–370.
  - 10 J. Yu, J. Chen, C. Li, X. Wang, B. Zhang and H. Ding, ESR signal of superoxide radical anion adsorbed on TiO<sub>2</sub> generated at room temperature, *J. Phys. Chem. B*, 2004, **108**, 2781–2783.
  - 11 M. C. Lee, F. Yoshino, H. Shoji, S. Takahashi, K. Todoki, S. Shimada and K. Kuse-Barouch, Characterization by electron spin resonance spectroscopy of reactive oxygen species generated by titanium dioxide and hydrogen peroxide, *J. Dent. Res.*, 2005, **84**, 178–182.
  - 12 S. Josset, N. Keller, M. C. Lett, M. J. Ledoux and V. Keller, Numeration methods for targeting photoactive materials in the UV-A photocatalytic removal of microorganisms, *Chem. Soc. Rev.*, 2008, **37**, 744–755.
  - 13 F. Goulhen-Chollet, S. Josset, N. Keller, V. Keller and M.-C. Lett, Monitoring the bactericidal effect of UV-A photocatalysis: a first approach through 1D and 2D protein electrophoresis, *Catal. Today*, 2009, **147**, 169–172.
  - 14 G. Gogniat and S. Dukan, TiO<sub>2</sub> photocatalysis causes DNA damage via fenton reaction-generated hydroxyl radicals during the recovery period, *Appl. Environ. Microbiol.*, 2007, **73**, 7740–7743.
  - 15 A. Kumar, A. K. Pandey, S. S. Singh, R. Shanker and A. Dhawan, Engineered ZnO and TiO<sub>2</sub> nanoparticles induce oxidative stress and DNA damage leading to reduced viability of *Escherichia coli*, *Free Radical Biol. Med.*, 2011, **51**, 1872–1881.
  - 16 P. Breeuwer and T. Abee, Assessment of viability of microorganisms employing fluorescence techniques, *Int. J. Food Microbiol.*, 2000, **55**, 193–200.
  - 17 S. Allegra, F. Berger, P. Berthelot, F. Grattard, B. Pozzetto and S. Riffard, Use of flow cytometry to monitor *Legionella pneumophila*, *Appl. Environ. Microbiol.*, 2008, **74**, 7813–7816.
  - 18 M. Berney, F. Hammes, F. Bosshard, H. U. Weilenmann and T. Egli, Assessment and interpretation of bacterial viability by using the LIVE/DEAD BacLight Kit in combination with flow cytometry, *Appl. Environ. Microbiol.*, 2007, **73**, 3283–3290.
  - 19 G. Gogniat, M. Thyssen, M. Denis, C. Pulgarin and S. Dukan, The bactericidal effect of TiO<sub>2</sub> photocatalysis involves adsorption onto catalyst and the loss of membrane integrity, *FEMS Microbiol. Lett.*, 2006, **258**, 18–24.
  - 20 S. Pigeot-Rémy, F. Simonet, E. Errazuriz-Cerda, J. C. Lazzaroni, D. Atlan and C. Guillard, Photocatalysis and disinfection of water: identification of potential bacterial targets, *Appl. Catal., B*, 2011, **104**, 390–398.
  - 21 S. Malato, P. Fernandez-Ibanez, M. I. Maldonado, J. Blanco and W. Gernjak, Decontamination and disinfection of water by solar photocatalysis: recent overview and trends, *Catal. Today*, 2009, **147**, 1–59.
  - 22 A. Lipovsky, L. Levitski, Z. Tzitrinovich, A. Gedanken and R. Lubart, The different behavior of rutile and anatase nanoparticles in forming oxy radicals upon illumination with visible light: an EPR study, *Photochem. Photobiol.*, 2012, **88**, 14–20.
  - 23 C. Lu, G. Song and J.-M. Lin, Reactive oxygen species and their chemiluminescence-detection methods, *TrAC, Trends Anal. Chem.*, 2006, **25**, 985–995.
  - 24 T. Sawada, F. Yoshino, K. Kimoto, Y. Takahashi, T. Shibata, N. Hamada, T. Sawada, M. Toyoda and M. C. Lee, ESR detection of ROS generated by TiO<sub>2</sub> coated with fluoridated apatite, *J. Dent. Res.*, 2010, **89**, 848–853.
  - 25 D. J. Vidon, S. Donze, C. Muller, A. Entzmann and P. Andre, A simple chemiluminescence-based method for rapid enumeration of *Listeria* spp. microcolonies, *J. Appl. Microbiol.*, 2001, **90**, 988–993.
  - 26 P. Andre, S. Bilger, P. Remy, S. Bettinger and D. J. Vidon, Effects of iron and oxygen species scavengers on *Listeria* spp. chemiluminescence, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 2003, **304**, 807–811.
  - 27 A. Rault, C. Beal, S. Ghorbal, J. C. Ogier and M. Bouix, Multiparametric flow cytometry allows rapid assessment and comparison of lactic acid bacteria viability after freezing and during frozen storage, *Cryobiology*, 2007, **55**, 35–43.
  - 28 L. Boulos, M. Prevost, B. Barbeau, J. Coallier and R. Desjardins, LIVE/DEAD BacLight : application of a new rapid staining method for direct enumeration of viable and total bacteria in drinking water, *J. Microbiol. Methods*, 1999, **37**, 77–86.
  - 29 P. Andre, C. Metzger, S. Petey, D. Muller and D. J. Vidon, Chemiluminescence of enterococci isolates from freshwater, *FEMS Microbiol. Lett.*, 2005, **245**, 123–129.
  - 30 W. Tseng and K.-C. Lin, Rheology and colloidal structure of aqueous TiO<sub>2</sub> nanoparticle, *Mater. Sci. Eng., A*, 2003, **355**, 186–192.
  - 31 A. M. Horst, A. C. Neal, R. E. Mielke, P. R. Sisljan, W. H. Suh, L. Madler, G. D. Stucky and P. A. Holden, Dispersion of TiO<sub>2</sub> nanoparticle agglomerates by *Pseudomonas aeruginosa*, *Appl. Environ. Microbiol.*, 2010, **76**, 7292–7298.
  - 32 C. Pagnout, S. Jomini, M. Dadhwal, C. Caillet, F. Thomas and P. Bauda, Role of electrostatic interactions in the toxicity of titanium dioxide nanoparticles toward *Escherichia coli*, *Colloids Surf., B*, 2012, **92**, 315–321.
  - 33 A. Neal, What can be inferred from bacterium–nanoparticle interactions about the potential consequences of environmental exposure to nanoparticles?, *Ecotoxicology*, 2008, **17**, 362–371.
  - 34 M. Zasloff, Antimicrobial peptides of multicellular organisms, *Nature*, 2002, **415**, 389–395.
  - 35 M. R. Yeaman and N. Y. Yount, Mechanisms of antimicrobial peptide action and resistance, *Pharmacol. Rev.*, 2003, **55**, 27–55.

- 36 D. Zhang, G. Li and J. C. Yu, Inorganic materials for photocatalytic water disinfection, *J. Mater. Chem.*, 2010, **20**, 4529–4536.
- 37 O. K. Dalrymple, E. Stefanakos, M. A. Trotz and D. J. Goswami, A review of the mechanisms and modeling of photocatalytic disinfection, *Appl. Catal., B*, 2010, **98**, 27–38.
- 38 H. A. Foster, I. B. Ditta, S. Varghese and A. Steele, Photocatalytic disinfection using titanium dioxide: spectrum and mechanism of antimicrobial activity, *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 2011, **90**, 1847–1868.
- 39 M. Boyle, C. Sichel, P. Fernandez-Ibanez, G. B. Arias-Quiroz, M. Iriarte-Puna, A. Mercado, E. Ubomba-Jaswa and K. G. McGuigan, Bactericidal effect of solar water disinfection under real sunlight conditions, *Appl. Environ. Microbiol.*, 2008, **74**, 2997–3001.
- 40 J. Lonnen, S. Kilvington, S. C. Kehoe, F. Al-Touati and K. G. McGuigan, Solar and photocatalytic disinfection of protozoan, fungal and bacterial microbes in drinking water, *Water Res.*, 2005, **39**, 877–883.
- 41 G. McDonnell and A. D. Russell, Antiseptics and disinfectants: activity, action and resistance, *Clin. Microbiol. Rev.*, 1999, **12**, 147–179.
- 42 P. S. M. Dunlop, C. P. Sheeran, J. A. Byrne, M. A. S. McMahon, M. A. Boyle and K. G. McGuigan, Inactivation of clinically relevant pathogens by photocatalytic coatings, *J. Photochem. Photobiol., A*, 2010, **216**, 303–310.
- 43 L. V. Zhukova, J. Kiwi and V. V. Nikandrov, TiO<sub>2</sub> nanoparticles suppress *Escherichia coli* cell division in the absence of UV irradiation in acidic conditions, *Colloids Surf., B*, 2012, **97**, 240–247.
- 44 D. Venieri, E. Chatzisyneon, M. S. Gonzalo, R. Rosal and D. Mantzavinos, Inactivation of *Enterococcus faecalis* by TiO<sub>2</sub>-mediated UV and solar irradiation in water and wastewater: culture techniques never say the whole truth, *Photochem. Photobiol. Sci.*, 2011, **10**, 1744–1750.



Gaëlle CARRE



## Compréhension des mécanismes lors de la photocatalyse appliquée à la dégradation des microorganismes. Application au traitement de l'air et aux textiles auto-décontaminants.

### Résumé

L'objectif principal de ce travail est d'étudier les mécanismes d'oxydation lors de la photocatalyse ( $\text{TiO}_2$  irradié sous UV-A) appliquée à la dégradation des microorganismes et leurs effets sur les composants cellulaires. L'étude de l'efficacité antimicrobienne de  $\text{TiO}_2$  sur un panel de microorganismes (bactéries, spores, champignons) réalisée dans différents milieux ( $\text{TiO}_2$  en milieu riche, 'sec', en phase liquide) montre l'influence des méthodes d'évaluation, de test et de comptage sur les efficacités d'inactivation. Des études menées en présence de molécules scavengers d'anions superoxydes ( $\text{O}_2^{\circ-}$ ) mettent en évidence l'implication des  $\text{O}_2^{\circ-}$  dans l'effet antibactérien et dans la peroxydation lipidique. Au niveau protéomique, diverses cibles d'action potentielles du  $\text{TiO}_2$  sont aussi proposées. Enfin, une partie applicative détermine l'efficacité antimicrobienne de dispositifs photocatalytiques équipés de mousses alvéolaires de  $\beta$ -SiC et de diodes électroluminescentes, et met en avant les propriétés auto-désinfectantes sous lumière solaire de textiles photocatalytiques fonctionnalisés par la technique layer-by-layer.

photocatalyse,  $\text{TiO}_2$ , bactérie, désinfection, ROS, cytométrie capillaire, peroxydation lipidique, protéine, purificateur d'air, textile auto-désinfectant

### Abstract

The main objective of this work is to study the oxidation mechanisms of UV-A photocatalysis on  $\text{TiO}_2$  applied to the degradation of microorganisms and their effects on cellular components. The study of the antimicrobial efficiency of  $\text{TiO}_2$  towards a panel of microorganisms (bacteria, spores, fungi) in different media ( $\text{TiO}_2$  in rich or 'dry' environment, in liquid phase) shows the influence of the evaluation methods, test and counting on the inactivation efficiency. Studies carried out in the presence of scavenger molecule of superoxide anions ( $\text{O}_2^{\circ-}$ ) highlight the involvement of  $\text{O}_2^{\circ-}$  in the antibacterial effect and lipid peroxidation. Proteomics analysis leads to propose various potential targets of the  $\text{TiO}_2$  action. Finally, an application part deals with the design of photocatalytic devices based on LEDs and  $\beta$ -SiC alveolar foams for air disinfection, and of sunlight active self-disinfecting layer-by-layer functionalized photocatalytic textiles.

photocatalysis,  $\text{TiO}_2$ , bacteria, disinfection, ROS, capillary cytometry, lipid peroxidation, protein, air purifier, self-disinfecting textiles