



Etude de l'effet antibactérien de surfaces traitées à l'aide de composés du titane et de leur applicabilité dans les industries agroalimentaires

Marion Barthomeuf

► To cite this version:

Marion Barthomeuf. Etude de l'effet antibactérien de surfaces traitées à l'aide de composés du titane et de leur applicabilité dans les industries agroalimentaires. Microbiologie et Parasitologie. Agrocampus Ouest, 2017. Français. NNT : 2017NSARB306 . tel-01996878

HAL Id: tel-01996878

<https://theses.hal.science/tel-01996878>

Submitted on 28 Jan 2019

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

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

AGRO CAMPUS

OUEST

Marion BARTHOMEUF • 26 octobre 2017

Thèse AGROCAMPUS OUEST
sous le label de l'Université Bretagne Loire
pour obtenir le grade de
DOCTEUR D'AGROCAMPUS OUEST
Spécialité Microbiologie, virologie et parasitologie

ÉCOLE DOCTORALE • Écologie, Géosciences, Agronomie
et Alimentation (EGAAL)

LABORATOIRE D'ACCUEIL • Unité hygiène et qualité des produits
avicoles et porcins / ANSES

Étude de l'effet antibactérien de surfaces traitées à l'aide de composés du titane et de leur applicabilité dans les industries agroalimentaires

Yves Le LOIR

Directeur de recherche, UMR INRA - AO STLO / *président*

Graziella BOURDIN

Directrice de projet recherche, ANSES Boulogne sur mer / *rapporteuse*

Chantal GUILLARD

Directrice de recherche, IRCE Lyon / *rapporteuse*

Sophie JAN

Maître de conférences, AGROCAMPUS OUEST, UMR INRA - AO STLO /
examinatrice

Xavier CASTEL

Professeur, IETR, IUT de Saint-Brieuc / *examineur*

Georges BARBIER

Professeur, Directeur de l'ESIAB, Brest / *examineur*

Martine DENIS

Ingénieure de recherche, Unité hygiène et qualité des produits
avicoles et porcins, ANSES / *directrice de thèse*

Christine PISSAVIN

Maître de conférences, IUT de Saint-Brieuc / *co-encadrante de thèse*



THÈSE / AGROCAMPUS OUEST
sous le sceau de l'Université Bretagne Loire
pour le grade de

**DOCTEUR DE L'INSTITUT SUPERIEUR DES SCIENCES
AGRONOMIQUES, AGRO-ALIMENTAIRES, HORTICOLES ET DU
PAYSAGE**

Mention : Biologie et Agronomie

École doctorale VIE-AGRO-SANTE

présentée par :

Marion Barthomeuf

Préparée à l'IUT de Saint-Brieuc, Département Génie Biologique/Université de Rennes 1
et à l'Anses de Ploufragan, Unité Hygiène et Qualité des Produits Avicoles et Porcins

**Étude de
l'effet antibactérien de
surfaces traitées
à l'aide de composés
du titane et de leur
applicabilité dans les
industries
agroalimentaires**

**Thèse soutenue à Saint-Brieuc
Le 12 décembre 2017**

devant le jury composé de :

Yves LE LOIR

Directeur de Recherche, Inra Rennes / *président du jury*

Sophie JAN

Maître de conférences, Agrocampus Ouest / *examineur*

Graziella BOURDIN

Directeur Projet Recherche, Anses Laboratoire de
Boulogne sur Mer, / *rapporteur*

Chantal GUILLARD

Directeur de Recherche, IRCELYON / *rapporteur*

Xavier CASTEL

Professeur, IETR, IUT de Saint-Brieuc, / *examineur*

Georges BARBIER

Professeur, Directeur de l'ESIAB, Brest/ *examineur*

Christine PISSAVIN

Maître de conférences, IUT de Saint-Brieuc /
encadrante de thèse

Martine DENIS

Directeur Projet Recherche, Anses Laboratoire de
Ploufragan / *directrice de thèse*



THÈSE / AGROCAMPUS OUEST

*sous le sceau de l'Université Bretagne Loire
pour le grade de*

DOCTEUR DE L'INSTITUT SUPERIEUR DES SCIENCES AGRONOMIQUES, AGRO-ALIMENTAIRES, HORTICOLES ET DU PAYSAGE

Mention : Biologie et Agronomie

Ecole doctorale VIE-AGRO-SANTE

présentée par :

Marion Barthomeuf

Préparée à l'IUT de Saint-Brieuc, Département Génie Biologique/Université de Rennes 1
et à l'Anses de Ploufragan Unité Hygiène et Qualité des Produits Avicoles et Porcins

**Étude de
l'effet antibactérien de
surfaces traitées
à l'aide de composés
du titane et de leur
applicabilité dans les
industries
agroalimentaires**

**Thèse soutenue à Saint-Brieuc
Le 12 décembre 2017**

devant le jury composé de :

Yves LE LOIR

Directeur de Recherche, Inra Rennes /*président du jury*

Sophie JAN

Maître de conférences, Agrocampus Ouest /*examinateur*

Graziella BOURDIN

Directeur Projet Recherche, Anses Laboratoire de
Boulogne sur Mer /*rapporteur*

Chantal GUILLARD

Directeur de Recherche, IRCELYON /*rapporteur*

Xavier CASTEL

Professeur, IETR, IUT de Saint-Brieuc /*examinateur*

Georges BARBIER

Professeur, Directeur de l'ESIAB, Brest /*examinateur*

Christine PISSAVIN

Maître de conférences, IUT de Saint-Brieuc /*encadrante
de thèse*

Martine DENIS

Directeur Projet Recherche, Anses Laboratoire de
Ploufragan /*directrice de thèse*

Résumé :

Les bactéries pathogènes présentes dans les biofilms en industries agroalimentaires (IAA) représentent un problème récurrent ayant un impact économique et des conséquences sur la sécurité sanitaire des aliments. Leur résistance face aux procédures de nettoyage et désinfection fait des biofilms un problème majeur dans les IAA. Le développement de surfaces photoactives avec des propriétés antibactériennes pourrait faciliter l'élimination des biofilms. Une solution serait de déposer un photocatalyseur, le dioxyde de titane (TiO_2) sous forme de couches minces sur des matériaux rencontrés dans les IAA. Les objectifs de cette thèse ont été d'optimiser de couches minces de TiO_2 aux propriétés antibactériennes et d'étudier les mécanismes impliqués dans la photocatalyse. La fonctionnalisation d'un substrat a été possible grâce au dépôt d'une couche mince de TiO_2 par pulvérisation cathodique radio-fréquence. Modifier les conditions de dépôt (température, pression partielle en oxygène, durée) a permis d'obtenir les couches minces les plus photocatalytiques et antibactériennes. La première étape a nécessité l'utilisation d'un matériau inerte et transparent, permettant la caractérisation complète des couches minces. Le second substrat utilisé est l'acier inoxydable 316, matériau rencontré dans les IAA. Ces nouveaux dépôts ont demandé une mise au point des conditions de dépôt. La caractérisation des couches minces par microscopie à balayage (MEB), diffraction des rayons X (DRX), a permis de mettre en évidence des différences notables suite au changement de substrat. Les couches minces de TiO_2 (sur verre ou acier inoxydables) possèdent une activité photocatalytique et des propriétés antibactériennes sur des souches représentatives de la flore retrouvée dans les IAA de la filière « viande » : *Listeria monocytogenes*, *Yersinia enterocolitica* et *Pseudomonas fragi*. Des diminutions de la population bactérienne entre 1,5 Log et 3 Log ont été observées. La compréhension des mécanismes impliqués dans la photocatalyse a été menée. La production d'espèces réactives de l'oxygène (EROs) telles que le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2), les radicaux hydroxyles ($\bullet\text{OH}$) et les anions superoxydes ($\text{O}_2^{\bullet-}$) a été étudiée par des méthodes spectrophotométriques. Une hypothèse est que l' H_2O_2 à la surface de la couche mince est converti en $\bullet\text{OH}$, ERO principale et *a priori* la plus délétère. Enfin, l'étude des mécanismes de réponses de *L. monocytogenes* face à la photocatalyse, a été initiée par une approche transcriptomique en suivant l'expression de gènes impliqués dans la réponse au stress oxydatif (*sod*, *kat*, *recA*, *perR*, *sigB* ou *fri*). Toutefois la méthode utilisée nécessite une nouvelle mise au point afin d'être utilisée sur les bactéries présentes à la surface des couches minces.

MOTS CLEFS : photocatalyse, TiO_2 , industries agroalimentaires, bactéries, biofilm, espèces réactives de l'oxygène.

Abstract:

Pathogenic bacteria in biofilms in food industries represent a recurrent problem with an economic impact and food safety consequences. Their high resistance to cleaning and sanitizing procedures is a major concern in food industries. The development of photoactive surfaces with bactericidal properties could facilitate the elimination of such microbial biofilms and may represent an alternative way to biocides. One solution is to deposit a photocatalyst top-layer (TiO₂) on conventional materials used in food plants. The objectives of this thesis were the optimisation of TiO₂ thin layers with antibacterial properties and the study of mechanisms involved in photocatalysis. Different substrates were coated with TiO₂ thin films by radio-frequency magnetron sputtering. Modifying the deposition conditions (temperature, oxygen partial pressure, and duration) made it possible to optimize the thin layers in order to obtain the most photocatalytic and antibacterial one. The first step required the use of glass substrate, an inert and transparent material, allowing the complete characterization of the thin layers. Then, the second substrate used was 316 stainless steel, a material widely used in food plants. Deposition of this substrate required a finalization of the deposit conditions. Indeed the characterization of all thin layers by scanning electron microscopy (SEM), X-ray diffraction (DRX) showed significant differences in TiO₂ phase. TiO₂ thin layers obtained either on glass or stainless steel showed photocatalytic and antibacterial properties on representative strains of the flora found in the meat industry: *Listeria monocytogenes*, *Yersinia enterocolitica* and *Pseudomonas fragi*. Decreases in the bacterial population between 1.5Log and 3Log were observed. In order to optimize TiO₂ thin films, an exploration of the mechanisms involved in photocatalysis was carried out. The production of reactive oxygen species (ROS) such as hydrogen peroxide (H₂O₂), hydroxyl radicals (•OH) and superoxide anions (O₂•⁻) was studied by spectro-colorimetric methods. It seems that H₂O₂ on the surface is converted in another ROS, •OH. Finally, the study of the bacterial response mechanisms to photocatalysis, especially for *L. monocytogenes*, was initiated by a transcriptomic approach by following the expression of genes involved in the response to oxidative stress (*sod*, *kat*, *recA*, *perR*, *sigB* or *fri*). However, the method used requires some optimizations in order to be used with the bacteria present on TiO₂ thin layers.

KEY WORDS: photocatalysis, TiO₂, food industry, bacteria, biofilm, reactive oxygen species.

. Remerciements

Dans un premier temps je tiens à remercier Graziella Bourdin et Chantal Guillard pour le temps consacré à l'évaluation de ce travail en tant que rapporteur de thèse. Je remercie Sophie Jan, Georges Barbier, Xavier Castel et Yves Le Loir d'avoir accepté de faire partie de mon jury.

Je tiens tout d'abord à remercier ma directrice de thèse, Martine Denis, pour la confiance qu'elle m'a accordée tout au long de ce travail. Je la remercie pour son enthousiasme par rapport à ce projet, tous ses conseils et ses remarques pertinentes pendant ces quatre années, tout en me laissant une grande liberté qui m'a permis de gagner en autonomie et indépendance.

Mes remerciements vont également à Christine Pissavin mon encadrante de thèse au sein de l'IUT de Saint-Brieuc. Une Auvergnate expatriée, tout comme moi, qui m'a permis de mener à bien mon projet de thèse. Toujours disponible, son implication et son aide ont largement contribué au bon déroulement de la thèse. Merci de m'avoir accompagnée dans toutes les étapes de ce projet, d'un point de vue professionnel mais aussi d'un point de vue personnel.

Je tiens ensuite à exprimer ma reconnaissance et à remercier Xavier Castel, membre de l'équipe « Matériaux fonctionnels » de l'Institut d'Electronique et de Télécommunications de Rennes, pour son implication dans ce projet et son soutien. Grâce à sa rigueur scientifique et son encadrement pour la partie matériaux du projet, j'ai pu progresser et découvrir ce domaine qui m'était alors presque inconnu. Merci pour sa disponibilité et ses conseils, à la fois dans le domaine scientifique et dans le domaine de la gastronomie en Bretagne. Grâce à lui j'ai maintenant une maîtrise parfaite des bons restaurants à Dinan.

Merci à Laurent Le Gendre, directeur adjoint de l'IUT de Saint-Brieuc pour ses conseils et les échanges au niveau des sciences des matériaux. L'étude des diagrammes de diffraction de rayons X n'aurait pas été possible sans son aide et ses cours sur le sujet. Un immense merci pour les relectures et corrections des articles nécessaires à cette thèse.

Je les remercie également tous les quatre pour leur relecture, leurs remarques, leurs corrections et suggestions pour mon manuscrit de thèse et les autres documents tout au long de ma thèse.

MERCI à toute l'équipe du département Génie Biologique de l'IUT de Saint-Brieuc, mais aussi à celle du département Science et Génie des Matériaux. Je souhaite remercier tout particulièrement Guylaine Cogrel-Le Contelec, secrétaire du département. Nous n'avons pas simplement partagé le même bureau. Pour moi, nous avons partagé de vrais moments de vie. Ces discussions et instants passés ont rendu les journées bien plus agréables même si parfois l'horoscope a pu nous prédire un manque de « Pep ». Je remercie Marie-Laure, Eve, Aymeric, Florence, Marilyn, Robert, Arnaud, Roland, Eric, Yvon, Jérôme, mais aussi Delphine qui m'ont apporté leur aide au quotidien, que ce soit au laboratoire pour les tests et manipulations mais également lors des moments passés au bureau.

Je remercie chaleureusement Justine, sans qui une partie des manipulations n'aurait pas été possible. Merci pour ton soutien pour la rédaction et les manip. Je remercie également Stéphanie Bougeard qui m'a apporté son aide et son expérience dans le domaine très vaste des statistiques.

Merci à Gérard pour son implication et son aide pour les différentes démarches administratives auxquelles j'ai dû faire face.

Je vous remercie tous pour les moments partagés à papoter sciences ou non, pour m'avoir fait découvrir la Bretagne, une très jolie terre d'accueil pour une Auvergnate qui débarque.

Je remercie les thésards du département Sciences et Génie des Matériaux, Fatou, Chloé, Florent sans qui ces quatre années n'auraient pas été les mêmes. Merci de m'avoir soutenue pour les travaux réalisés dans le domaine des matériaux. Merci pour votre aide, que cela soit au MEB, lors des pulvérisations. J'ai pu découvrir un monde complètement inconnu jusque-là. Un grand merci de m'avoir accueillie dans votre petite équipe !! Je remercie Nyedna, Perrine pour tout ce qu'elles ont su m'apporter pendant leur présence en stage à l'I.U.T.

Mes derniers remerciements vont à ma famille, ma sœur et mes parents. Ils ont su m'épauler, me rassurer et m'ont écoutée lors des moments difficiles. Ils ont

aussi pu profiter des moments de joie. Il n'est pas évident de vivre une telle expérience loin de sa famille. Merci pour toutes ces heures passées au téléphone pour me remotiver, me féliciter et parfois me remettre dans le droit chemin. Je souhaite aussi dire merci à ma belle-famille qui a su être présente pour me soutenir. Sans oublier la meilleure des amies, Claire qui partage tous les moments, bons ou non, avec moi, même à distance, MERCI. Une dernière vague de remerciements pour mes supers voisins !

Enfin et non des moindres, un immense MERCI à celui qui a partagé les bons et les moins bons moments lors de cette thèse. Merci à Micka pour m'avoir supportée pendant ces années de thèse, ces années où il a fallu me porter, me soutenir et me rassurer. Merci de m'avoir permis de vivre le plus bel événement de ma vie qui porte le joli prénom de Mathis, qui aura ponctué cette thèse avec bonheur et un peu de fatigue... Je vous remercie pour toute cette joie et ce nouvel élan dans ma vie. Mes deux amours.

. Table des matières

Introduction Générale	1
Chapitre I : Revue Générale	5
I. Adhésion bactérienne et Biofilms	6
A. Définition du biofilm	6
B. Formation d'un biofilm	7
1. Cycle de formation.....	7
2. Paramètres influençant la formation du biofilm.....	8
C. Biofilms au sein des industries agroalimentaires.....	12
1. Bactéries présentes dans les IAA.....	12
2. Impact de la présence des biofilms dans les IAA	19
II. Moyens de lutte.....	23
A. Procédures de nettoyage et de désinfection	23
B. Nouvelles approches.....	26
1. Limiter l'adhésion initiale et les interactions	26
2. Limiter la communication.....	27
3. Déstructurer le biofilm.....	28
4. Modifications de surfaces	30
III. Les procédés d'oxydation avancée.....	32
A. Principe de la photocatalyse hétérogène	32
B. Dioxyde de titane.....	35
1. Généralités	35
2. Applications du TiO ₂	37
IV. Stress généré par la photocatalyse.....	43
A. Effet de l'exposition aux rayonnements UV.....	43
B. Stress oxydatif généré par la photocatalyse	43
1. Espèces réactives de l'oxygène.....	44
2. Cibles du TiO ₂	47
V. Mécanismes de réponse au stress généré par le TiO ₂	52
A. Mécanisme de réparation de l'ADN.....	52
B. Prévention des EROs	53
1. Gestion du fer	53
2. Superoxyde dismutase	54
3. Catalase.....	55
4. Peroxydase	55
Chapitre II : Matériels et Méthodes	57
I. Introduction.....	58
II. Obtention des couches minces.....	58
A. Pulvérisation cathodique radio-fréquence.....	58
1. Description du bâti de pulvérisation	58
2. Préparation des échantillons	59

3. Conditions de dépôts	60
III. Caractérisation des couches minces	61
A. Caractérisation optique et physique	61
1. Morphologie et épaisseur de la couche mince	61
2. Détermination du band-gap (E_g)	64
3. Phase cristalline du TiO_2	65
B. Test de décoloration du bleu de méthylène	66
C. Effet antibactérien	67
IV. Détection et dosage des EROs	69
A. Peroxyde d'hydrogène H_2O_2	69
B. Anions superoxydes $O_2^{\bullet -}$	70
C. Radicaux hydroxyles $\bullet OH$	70
V. Méthodes d'analyses des réponses bactériennes face au stress de la photocatalyse	70
A. Effet des UV - Microdépôt sur milieu gélosé	70
B. CMI	71
C. Capacité d'adhésion – Test de MATS	72
D. Marquages épifluorescents <i>in situ</i>	74
E. Suivi de l'expression de gènes d'intérêt	74
Chapitre III : Étude de couches minces de TiO_2 déposées sur substrat de verre sodocalcique	79
I. Introduction	80
II. Influence de la température et de la proportion d' O_2 dans le mélange gazeux	82
A. Résumé	82
B. Article	82
C. Conclusion	93
III. Influence de la durée de dépôt sur les performances photocatalytiques et bactéricides de l'échantillon TiO_2 -440-3%	95
A. Résumé	95
B. Article	96
C. Conclusion	115
IV. Conclusion générale	116
Chapitre IV : Étude de couches minces de TiO_2	

Table des figures

- Chapitre I :

Figure 1 : La formation des biofilms sur des surfaces biotiques et abiotiques (d'après Roux et Ghigo, 2006)	6
Figure 2 : Modèle de formation d'un biofilm sur une surface solide	7
Figure 3 : Composition de la paroi chez les bactéries à Gram positif (a) et à Gram négatif (b) (Campbell et Reece, 2004)	10
Figure 4 : Représentation schématique des principales sources de contamination dans les IAA (d'après Guitierrez et al., 2016).	12
Figure 5 : Incidence annuelle de la listériose par million d'habitants en France de 1999 à 2014 (InVS, 2015)	14
Figure 6 : Modèle de la persistance (□) et de la non-persistance (■). Evolution de la quantité de cellules en UFC au niveau d'un site de rétention contaminé une première fois en fonction du nombre de procédures de nettoyage et désinfection des surfaces appliquées (d'après Carpentier et Cerf, 2011).	15
Figure 7 : Description des biotypes et sérogroupes de <i>Yersinia enterocolitica</i> (d'après Bottone et al., 1999)	16
Figure 8 : Observation de <i>Pseudomonas fragi</i> sur acier inoxydable après 24h de culture à 23°C (d'après Zottola et Sasahara, 1994).	18
Figure 9 : Mécanismes développés par le biofilm pour résister à l'action d'agents antimicrobiens (Abdallah et al, 2014)	20
Figure 10 : Etapes des procédures de nettoyage et de désinfection employées dans les IAA (Soumet, 2017)	25
Figure 11 : Approches pour de nouveaux moyens de lutte efficaces contre la formation et la présence de biofilms	26
Figure 12 : Illustration schématique du principe de photocatalyse après activation par rayonnements UV (d'après Nakata et Fujishima, 2012)	33
Figure 13 : Réactions chimiques liées au phénomène d'hydrophilie du TiO ₂ exposé aux UV (Guillard et al., 2011).	39
Figure 14 : Dépôt de couche mince de dioxyde de titane par pulvérisation cathodique radio-fréquence.	41
Figure 15 : Formation des EROs lors de l'illumination du TiO ₂ (Shiraischi et al., 2003)	44
Figure 16 : Rôle des EROs dans la photocatalyse. Représentation schématique de la distance d'action des EROs par rapport à la surface du TiO ₂ (Selon Foster et al., 2011).	46
Figure 17 : Mécanismes de la toxicité des nanoparticules contre les bactéries. La présence de nanoparticules et/ou certains ions entraîne la production de radicaux libres générant un stress oxydatif (d'après Hajipour et al., 2012)	47
Figure 18 : (a-c) Schéma permettant d'illustrer le mécanisme d'effet bactéricide sur <i>E. coli</i> et sa membrane cytoplasmique, (d'après Sunada et al., 2003).	49
Figure 19 : Actions mutagènes et délétères des UV et mécanismes de réparation (www.edu.upmc.fr)	52

-Chapitre II

Figure 20 : 1) Bâti de pulvérisation cathodique RF (Plassys 450S). a. Sas de transfert; b. Enceinte de dépôt; c. Rack de commande. 2) Vue de l'enceinte du bâti de pulvérisation et ses trois cibles, a. Titane; b. Argent; c. Cuivre; d. Bride de pompage.	59
Figure 21 : Bâti de métallisation	62
Figure 22 : Microscope électronique à balayage JEOL JSM 5600 et description de l'appareil	63
Figure 23 : Porte-échantillon pour MEB. A. Observation de surface, B. Mesure de l'épaisseur.	63

Figure 24 : Structure de bande schématique d'un semi-conducteur à gap direct (a) et à gap indirect (b), avec E (énergie), k (vecteur d'ondes), E_g (valeur du band-gap).	64
Figure 25 : Diffraction de rayons X	66
Figure 26 : Schéma des étapes d'un test d'effet antibactérien sur coupons.	68
Figure 27 : Droite d'étalonnage montrant l'absorbance à 505 nm en fonction de la concentration d' H_2O_2 (mg/L).	69
Figure 28 : Méthode de micro-dépôts pour l'étude de l'effet létal des UVA.	71
Figure 29 : Principe de la méthode de CMI utilisée avec le peroxyde d'hydrogène.	72
Figure 30 : Schéma représentant le test de MATS.	73
Figure 31 : Principe de RT-PCRq à partir d'ARN matrice.	75

-Chapitre III

Figure 32 : Paramètres de dépôt intervenant dans l'obtention des couches minces de TiO_2 .	80
Figure 33 : Etapes de caractérisation des couches minces de TiO_2 obtenues par pulvérisation cathodique RF.	81

-Chapitre IV

Figure 34 : Représentation schématique des différentes couches qui composent l'acier inoxydable. (d'après Demilly, 2006)	121
Figure 35 : Schéma représentant le système porte-substrat utilisé pour le dépôt de TiO_2 sur substrat d'acier inoxydable.	123
Figure 36 : Observations de la morphologie de surface par microscopie électronique à balayage (grossissement $\times 1000$ et $\times 20000$).	127
Figure 37 : Observations de la morphologie de surface par microscopie électronique à balayage (grossissement $\times 1000$ et $\times 20000$).	128
Figure 38 : Diagrammes de DRX des couches minces de TiO_2 déposées sur acier inoxydable 316.	130
Figure 39 : Diagrammes de DRX d'un échantillon d'acier inoxydable 316 dans différentes conditions de température (d'après Nascimento et al., 2009).	131
Figure 40 : Diagramme de DRX d'échantillons d'acier inoxydable recouverts ou non d'une sous-couche de titane avec une couche mince de TiO_2 . 1. : Aucun film de Ti – 2. Film de Ti de $0,16\ \mu m$ – 3. Film de Ti de $0,44\ \mu m$ et 4. $0,92\ \mu m$ (Krishna et al., 2011)	132
Figure 41 : Cinétique de décoloration du bleu de méthylène par les couches minces déposées sur acier inoxydable.	Erreur ! Signet non défini.
Figure 42 : Effet bactéricide de la couche mince TiO_2 -377 sur les souches de <i>L. monocytogenes</i> : A. Scott A; B. ECL 136. ■ Obscurité, ■ Illumination sous UVA pendant 20 minutes.	136
Figure 43 : Observations des bactéries adhérentes de <i>L. monocytogenes</i> ScottA sur différentes surfaces : A. Acier inoxydable AISI 316 ; B. Acier inoxydable AISI 316 sous UVA (20 minutes) ; C. TiO_2 -377 ; D. TiO_2 -377 sous UVA (20 minutes)	139

-Chapitre V

Figure 44 : Mesure de décoloration du BM, sous l'effet de la photocatalyse ($\blacktriangle$ TiO_2 -377 ; $\blacklozenge$ TiO_2 -226) ou par action de l'acide ascorbique ($\bullet$). Effet de l'ajout d'iode sur l'absorbance du BM.	144
Figure 45 : Processus de dégradation du BM par photocatalyse (Houas et al., 2001).	145
Figure 46 : Mesure de la production d' H_2O_2 sur des coupons de TiO_2 sous rayonnement UVA - Mesure de l'absorbance à 505 nm.	146
Figure 47 : Mesure de l'absorbance à 505 nm pour le dosage de l' H_2O_2 par les différentes couches minces après exposition sous UVC, excepté pour l'eau conservée à l'obscurité (Eau obs).	147

Figure 48 : Mise en évidence de la conversion de l' H_2O_2 pour la couche mince de TiO_2 déposée sur verre sous UVC pendant 60 minutes. _____	148
Figure 49 : Mise en évidence de la conversion de l' H_2O_2 par la couche mince de TiO_2 sous UVA pendant 20 minutes. A. $[H_2O_2] = 300 \text{ mg.L}^{-1}$, B. $[H_2O_2] = 30 \text{ mg.L}^{-1}$, C. $[H_2O_2] = 7,5 \text{ mg.L}^{-1}$ _____	148
Figure 50 : Détection de la production d'anions superoxydes ($O_2^{\bullet-}$) par dosage spectrophotométrique de la formation de bleu de formazan à partir des couches minces de TiO_2 photoactivées. _____	149
Figure 51 : Evaluation de la production d'anions superoxydes à partir de dépôts secs de TiO_2 Dégussa P25 ® par mesure de l'absorbance à 530 nm. Le témoin négatif est un coupon de verre sans TiO_2 . _____	150
Figure 52 : Spectres d'absorbance des solutions de BM provenant de la surface de différents échantillons après exposition 60 minutes sous UVA. A. Verre sodocalcique, B. TiO_2 -247, C. Acier inoxydable, D. TiO_2 -297. ● BM à 0,002% avec 600 mM de mannitol ; × BM à 0,002% _____	151
Figure 53 : Spectres d'absorbance des solutions de BM provenant de la surface de différents échantillons après exposition 60 minutes sous UVA. A. Verre sodocalcique, B. TiO_2 -226, C. Acier inoxydable, D. TiO_2 -377. ● BM à 0,002% avec 300 mM de mannitol ; × BM à 0,002% _____	152
Figure 54 : Test par micro-dépôts pour <i>Listeria monocytogenes</i> . a. <i>L. monocytogenes</i> ScottA, c. <i>L. monocytogenes</i> ECL 136. _____	154
Figure 55 : Test par micro-dépôts pour les souches de <i>Yersinia enterocolitica</i> . a. <i>Y. enterocolitica</i> IP 134, b. <i>Y. enterocolitica</i> 09 ALY 405. _____	155
Figure 56 : Tests par micro-dépôts pour des souches de <i>Pseudomonas fragi</i> . a. ECF146, b. ECF166, c. ECF 191, d. ECF 196, e. ECF 202, f. ECF 464 et g. CIP55.4T. _____	155
Figure 57 : Pourcentage d'affinité aux solvants des souches de <i>L. monocytogenes</i> , ScottA en bleu et ECL136 en gris. _____	158
Figure 58 : Affinité des souches de <i>Y. enterocolitica</i> pour différents solvants, chloroforme (C), hexadécane (HD), décane (D) et acétate d'éthyle (AE). <i>Y. enterocolitica</i> IP134 en bleu, 09ALY405 en gris. _____	158
Figure 59 : Affinité des souches de <i>P. fragi</i> pour différents solvants, chloroforme (C), hexadécane (HD), décane (D) et acétate d'éthyle (AE). <i>P. fragi</i> CIP 55.4T en bleu, ECF 146 en gris. _____	159
Figure 60 : Modification des propriétés de surface des couches minces de TiO_2 après exposition (60 minutes) aux UVA. _____	159
Figure 61 : Expression relative des différents gènes d'intérêt pour la souche <i>L. monocytogenes</i> ScottA en présence d' H_2O_2 (0,030%) (en bleu) et en présence de MV (10mM) (en orange) _____	162
Figure 62 : Expression relative des différents gènes d'intérêt pour une souche de <i>L. monocytogenes</i> 4b en présence de MV (1mM). (Ssuo et al., 2012) _____	163

-Conclusions et perspectives

Figure 63 : Principe de la photocatalyse et implication des différentes EROs (Shiraishi et al.,2003). _____	165
Figure 64 : Mécanisme de la photocatalyse du TiO_2 . h _____	

. Liste des tableaux :

-Chapitre I

<i>Tableau 1 : Propriétés d'un produit désinfectant pour l'IAA (Allion 2004).</i>	25
<i>Tableau 2 : Caractéristiques du photocatalyseur idéal (selon Kaan et al., 2012).</i>	34
<i>Tableau 3 : Caractéristiques des principales formes cristallines du TiO₂.</i>	36

-Chapitre II

<i>Tableau 4 : Paramètres de prépulvérisation et pulvérisation.</i>	61
<i>Tableau 5 : Souches utilisées au cours de la thèse.</i>	67
<i>Tableau 6 : Mélange réactionnel pour la technique de RT-PCRq. Échantillon RT : Échantillon contenant de la transcriptase inverse. Échantillon NRT : Échantillon ne contenant pas l'enzyme.</i>	76
<i>Tableau 7 : Amorces utilisées dans l'étude.</i>	77

-Chapitre IV

<i>Tableau 8 : Caractéristiques du verre sodocalcique et de l'acier inoxydable 316, (d'après les fiches techniques de fournisseurs).</i>	122
<i>Tableau 9 : Paramètres des dépôts de TiO₂ sur acier inoxydable AISI 316.</i>	125
<i>Tableau 10 : Comparaison de valeurs de réduction de la quantité de bactéries adhérentes après photocatalyse sous UVA pendant 20 minutes pour les couches minces de TiO₂-226 (sur verre) et TiO₂-377 (sur acier inoxydable).</i>	137

-Chapitre V

<i>Tableau 11 : Description des échantillons de couches minces de TiO₂ testés dans le chapitre V. Partie II....</i>	143
<i>Tableau 12 : Résultats des tests de CMI par rapport au peroxyde d'hydrogène pour les souches de L. monocytogenes, Y. enterocolitica et P. fragi.....</i>	157
<i>Tableau 13 : Observations de bactéries adhérentes après marquages fluorescents in situ (LIVE/DEAD® Film Tracer) sur verre sodocalcique et TiO₂ 87. Observations après 60 minutes à l'obscurité ou après 60 minutes d'illumination sous UVA (UVA+). Les cellules vertes sont vivantes et les cellules orange sont mortes</i>	160

. Liste des abréviations

ADN (c) : Acide désoxyribonucléique (complémentaire)

AISI : *American iron and steel institute*

ARN (r) : Acide ribonucléique (ribosomique)

BHI : *Brain Heart Infusion*

BM : Bleu de méthylène

BG : Band gap

CMI : Concentration minimale inhibitrice

CNR : Centre National de Référence

C_t : Cycle seuil

DNase : Désoxyribonucléase

RNase : Ribonucléase

dNTP : Désoxyribonucléotide

DRX : Diffraction de rayons X

ERO : Espèce réactive de l'oxygène

HMDS : Hexaméthylidisilazane

IAA : Industries agro-alimentaire

IP : Iodure de propidium

LB : Luria Bertani

MEB : Microscopie électronique à balayage

MV : Methyl viologen

N&D : Nettoyage et désinfection

NBT : Nitro-bleu de tétrazolium

qPCR : Quantitative polymerase chain reaction

RF : Radio-fréquence

RT : Reverse transcription

sccm : *standard cubic centimeter per minute*

UFC : Unité formant colonie

UV : Ultra-violet

VNC : Viable non-cultivable

Introduction Générale

Les travaux présentés dans cette thèse ont pour objectifs de permettre le développement de surfaces antibactériennes pour des applications dans les industries agroalimentaires et de participer à la compréhension des mécanismes impliqués dans la dégradation des microorganismes par photocatalyse hétérogène, notamment sous forme de surfaces.

Les bactéries sont ubiquitaires dans notre environnement. Leur mode de vie principal est sous forme de biofilm. Les bactéries au sein de ces biofilms, qu'elles soient pathogènes ou non, sont capables de s'adapter et de résister à de nombreux stress. La présence de ces communautés bactériennes, capables de persister sur les surfaces, représente, un problème préoccupant dans certains domaines, notamment dans les environnements médicaux ou ceux des industries agroalimentaires. La présence des biofilms dans les IAA est un problème récurrent qui peut avoir des répercussions d'ordre économique mais également des conséquences sur la sécurité sanitaire des aliments.

Les procédures de nettoyage et de désinfection classiquement utilisées dans les IAA apparaissent parfois insuffisantes pour éliminer les biofilms (mise en œuvre non adaptée, efficacité limitée des produits utilisés face aux biofilms). Il est, par conséquent, nécessaire de trouver de nouveaux moyens de lutte efficaces permettant de limiter la présence de ces flores microbiennes dans les IAA.

De nouvelles stratégies de lutte contre la présence des biofilms sont à développer. Parmi ces stratégies, l'utilisation de la photocatalyse hétérogène apparaît pertinente aussi bien pour la désinfection de l'eau, de l'air mais également pour la mise au point de surfaces et matériaux auto-nettoyants et décontaminants. La photocatalyse hétérogène fait partie des Procédés d'Oxydation Avancée (POA). Il s'agit d'une technique non sélective, capable de dégrader des composés organiques comme des polluants chimiques (pesticides, colorants, composés organiques volatils, ...), mais aussi des microorganismes. La photocatalyse bénéficie d'une mise en œuvre aisée, propre, écologique et peu coûteuse. Ce procédé, fonctionnant à des températures et pressions proches des conditions ambiantes, met en œuvre une activation photochimique pour la synthèse d'espèces réactives de l'oxygène (EROs). Ces EROs sont des composés extrêmement oxydants et réactifs comme le peroxyde d'hydrogène ou les radicaux hydroxyles.

Dans le cadre de cette thèse, financée par l'Agglomération de Saint-Brieuc et le Conseil Général des Côtes d'Armor, l'élaboration de surfaces antibactériennes pour application dans les IAA, a été menée. La fonctionnalisation de surfaces à l'aide de dioxyde de titane, le TiO_2 leur confère une activité bactéricide. De nombreuses applications ont vu le jour, notamment

dans le domaine médical. Les surfaces fonctionnalisées élaborées ont été testées contre des microorganismes qui sont retrouvés, sous forme de biofilms, dans les IAA. Il s'agit de bactéries pathogènes responsables de toxi-infections alimentaires telles que *Listeria monocytogenes*, *Yersinia enterocolitica*. Est également concernée, *Pseudomonas fragi*, qui est une bactérie appartenant à la flore d'altération et responsable de l'implantation de biofilms dans les IAA.

Afin d'élaborer des surfaces antibactériennes, la première étape est le choix et l'optimisation de la méthode d'obtention des surfaces à base de composés du titane, le TiO_2 . La méthode sélectionnée est la pulvérisation cathodique radio-fréquence qui permet de déposer, à l'aide d'un plasma, une couche mince sur un support. Cette couche mince permet de fonctionnaliser ce support en lui apportant la capacité de photocatalyse. Une fois la technique de dépôt validée, les surfaces sont testées vis-à-vis des souches bactériennes sélectionnées pour cette étude et qui sont caractéristiques d'environnements agroalimentaires, et plus particulièrement des IAA de la filière « viande ». Différentes approches sont alors menées afin de mettre en évidence l'effet photocatalytique et antibactérien des couches minces obtenues. La première approche consiste à déterminer les espèces réactives de l'oxygène responsable du stress oxydatif à la surface de la couche mince. La seconde approche a pour objectif l'observation des effets de la photocatalyse sur les bactéries. Enfin, la mise en œuvre de couches minces de dioxyde de titane capable de photocatalyse sur un substrat rencontré dans les IAA est menée en vue de tester leur applicabilité.

Le travail présenté dans ce mémoire est divisé en cinq grands chapitres :

- Le premier chapitre est consacré à une revue bibliographique. Le mode de vie des bactéries sous forme de biofilm sera décrit et les conséquences de la présence de ces structures dans les IAA seront présentées. Les moyens de lutte classiquement utilisés contre ces biofilms seront abordés et les nouvelles stratégies seront décrites. L'accent sera mis sur l'utilisation des modifications de surfaces et notamment l'utilisation de couches minces photoactives à base de TiO_2 permettant la photocatalyse. Les principes de la photocatalyse seront exposés, avec une présentation du photocatalyseur le plus employé de nos jours, le TiO_2 . La formation des espèces réactives de l'oxygène au pouvoir oxydant élevé ainsi que le mode d'action sur les bactéries seront décrits. Enfin, les mécanismes de réponse des bactéries au stress oxydatif seront abordés afin de comprendre les mécanismes impliqués dans la résistance des bactéries à la photocatalyse.
- Le deuxième chapitre permettra de développer le matériel et les méthodes utilisées. Les principales techniques communes aux chapitre III, IV et V seront décrites dans ce chapitre. Certaines approches spécifiques seront cependant détaillées dans les chapitres correspondants. Tout d'abord, la méthode d'obtention des couches minces ainsi que les étapes de la caractérisation seront présentées. Les méthodes utilisées pour

l'étude des mécanismes impliqués dans la photocatalyse et pour les réponses physiologiques de bactéries seront précisées.

- Le troisième chapitre traitera de la méthode d'obtention des couches minces de TiO_2 . Ce chapitre sera divisé en deux grandes sous-parties. La première traitera de l'étude des couches minces sur un substrat de verre, en utilisant la méthode de pulvérisation cathodique radio-fréquence. La couche mince sera dans un premier temps déposée sur un substrat inerte, le verre sodocalcique, afin de permettre la caractérisation complète de ces couches minces. Cette partie se décompose en deux axes. Le premier axe concerne la mise au point de la température et le pourcentage d'oxygène dans l'enceinte lors du dépôt, afin d'obtenir la couche mince la plus photoactive et efficace contre les bactéries. Le second axe d'amélioration des couches minces consistera à optimiser la durée de dépôt des couches minces, à l'origine de la variation de l'épaisseur. Les effets photocatalytique et bactéricide seront étudiés, sur trois modèles bactériens, *Listeria monocytogenes*, *Yersinia enterocolitica* et *Pseudomonas fragi*, afin de mettre en évidence les meilleurs paramètres de dépôts.
- Le quatrième chapitre est consacré à l'optimisation des dépôts des couches minces de TiO_2 sur un substrat classiquement rencontré dans les IAA : l'acier inoxydable AISI 316. Contrairement au verre utilisé dans la première partie des travaux, l'acier inoxydable n'est pas un substrat inerte. Les paramètres de dépôt seront donc adaptés à ce nouveau substrat. Des tests permettront de mettre en évidence un effet photocatalytique des couches minces puis des tests d'effet bactéricide seront menés sur les souches de *Listeria monocytogenes*. Cette partie permettra de mettre en avant le caractère applicable de ces couches minces dans le domaine des industries agroalimentaires.
- Le cinquième chapitre sera dédié à la compréhension des mécanismes d'oxydation consécutifs à la photocatalyse des différentes couches minces et des effets sur les bactéries. Ainsi, une première partie sera consacrée à une étude ayant pour but la détermination des différentes espèces réactives de l'oxygène produites lors de la photocatalyse. Dans une seconde partie, les réponses des souches de *Listeria monocytogenes* face aux stress générés par la photocatalyse seront étudiées. Les effets seront étudiés par des méthodes de microbiologie classique, en culture, mais également, par des méthodes d'observation microscopique. Une approche de biologie moléculaire pour le suivi de l'expression de gènes impliqués dans la réponse aux stress sera mise au point pour les souches de *Listeria monocytogenes*. Les différences entre les souches ainsi que la mise en évidence de l'implication de certaines des espèces réactives de l'oxygène permettront d'améliorer la compréhension des mécanismes dans la photocatalyse.
- Enfin, une conclusion générale permettra de synthétiser les principaux résultats des différents chapitres et de présenter les perspectives de ce travail.

Chapitre I : Revue Générale

Chapitre I : Revue Générale

5

<i>I. Adhésion bactérienne et Biofilms</i>	6
A. Définition du biofilm	6
B. Formation d'un biofilm	7
1. Cycle de formation	7
2. Paramètres influençant la formation du biofilm	8
C. Biofilms au sein des industries agroalimentaires	12
1. Bactéries présentes dans les IAA	12
2. Impact de la présence des biofilms dans les IAA	19
<i>II. Moyens de lutte</i>	23
A. Procédures de nettoyage et de désinfection	23
B. Nouvelles approches	26
1. Limiter l'adhésion initiale et les interactions	26
2. Limiter la communication	27
3. Déstructurer le biofilm	28
4. Modifications de surfaces	30
<i>III. Les procédés d'oxydation avancée</i>	32
A. Principe de la photocatalyse hétérogène	32
B. Dioxyde de titane	35
1. Généralités	35
2. Applications du TiO ₂	37
<i>IV. Stress généré par la photocatalyse</i>	43
A. Effet de l'exposition aux rayonnements UV	43
B. Stress oxydatif généré par la photocatalyse	43
1. Espèces réactives de l'oxygène	44
2. Cibles du TiO ₂	47
<i>v. Mécanismes de réponse au stress généré par le TiO₂</i>	52
A. Mécanisme de réparation de l'ADN	52
B. Prévention des EROs	53
1. Gestion du fer	53
2. Superoxyde dismutase	54
3. Catalase	55
4. Peroxydase	55

I. Adhésion bactérienne et Biofilms

A. Définition du biofilm

Dans l'environnement, les microorganismes sont ubiquitaires et peuvent être trouvés sous deux formes différentes. La première est la forme unicellulaire libre, dite planctonique, où les bactéries sont retrouvées de manière plus ou moins isolée. Pour la seconde forme, les bactéries peuvent se trouver au sein de communauté bactérienne, constituant une structure tridimensionnelle complexe, appelée biofilm. Cette organisation constitue le mode de vie naturel et privilégié pour 90 % des micro-organismes (Briandet, 2013). Dans ces structures, les bactéries planctoniques deviennent sessiles en s'agrégeant entre elles dans une matrice extracellulaire. En effet, les microorganismes ne sont pas capables de coloniser une surface inerte sans la production de polymères organiques qui constituent cette matrice (Carpentier et Cerf, 1993). Cette matrice est composée essentiellement d'eau, de protéines, de polysaccharides et de sels ; elle constitue une protection pour les bactéries du biofilm (Guerrero *et al.*, 2009; Abdallah *et al.*, 2014).

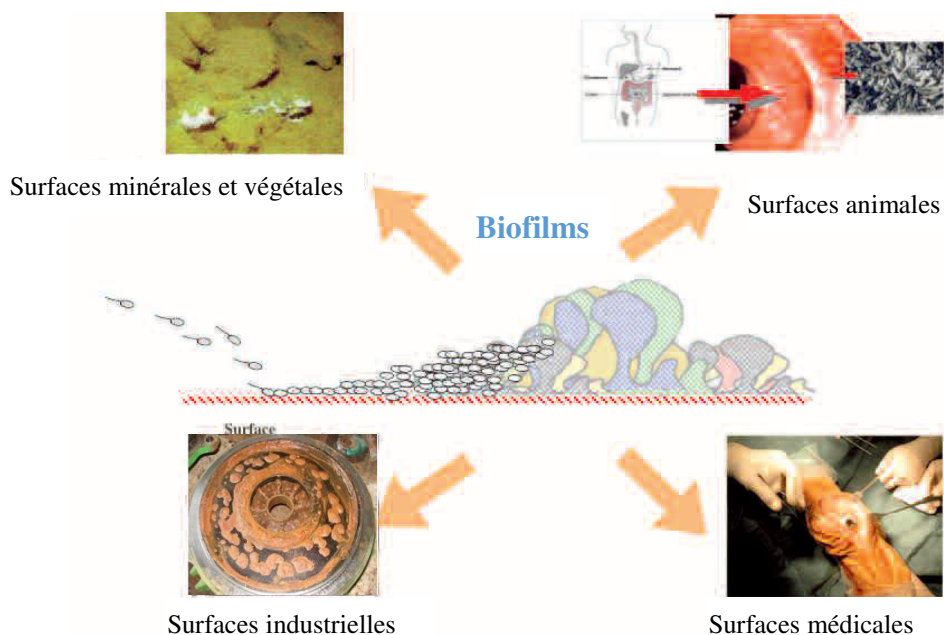


Figure 1 : La formation des biofilms sur des surfaces biotiques et abiotiques (d'après Roux et Ghigo, 2006)

Les biofilms sont définis comme des écosystèmes complexes et dynamiques, constitués de microorganismes vivants et morts, adhérents entre eux et à une surface réceptrice. Cette surface peut être une surface biotique telle que les cellules de la muqueuse intestinale

ou une surface abiotique comme les équipements d'industries alimentaires (Roux et Ghigo, 2006) (Figure 1).

Au sein d'un biofilm, les bactéries sont capables d'avoir une activité collective, coordonnée par des interactions et communications entre les bactéries. Ces différentes interactions jouent un rôle crucial dans la formation et la structure du biofilm ainsi que pour la résistance des cellules face aux différents stress (Kostaki *et al.*, 2012; Giaouris *et al.*, 2014).

B.

bactériens peuvent jouer un grand rôle dans la reconnaissance d'une surface abiotique ainsi que dans l'adhésion.

Lorsque les liaisons chimiques sont maintenues pendant un laps de temps suffisant, de nouveaux mécanismes chimiques et physiques se mettent alors en place et les rendent permanentes et irréversibles. La multiplication bactérienne est également un facteur qui rend l'adhésion permanente grâce à des appendices cellulaires, des pilis, mais surtout grâce à la sécrétion de substances polymériques extracellulaires (EPS, Extracellular Polymeric Substances). Ces EPS sont constituées d'exopolysaccharides, de protéines.

Toutes ces substances possèdent un rôle primordial dans la consolidation et le maintien du biofilm (Carpentier et Cerf, 1993; Donlan, 2002; Karatan et Watnick, 2009; Abee *et al.*, 2011). De ce fait, les liaisons mises en jeu à cette étape nécessitent un accroissement de l'énergie mécanique pour les rompre.

La colonisation du support se fait ensuite par la multiplication bactérienne et agrégation des bactéries. Le biofilm acquiert une structure tridimensionnelle complexe. En outre, selon les signaux environnementaux reçus, comme par exemple la température, l'humidité, le pH, la disponibilité en nutriments ou encore la communication intercellulaire *via* le « quorum sensing », les bactéries peuvent alors moduler la formation du biofilm (Abdallah *et al.*, 2014). Bien que la formation de biofilm reste un phénomène plutôt discret, son épaisseur peut atteindre quelques millimètres en quelques jours (Myszka et Czaczyk, 2011).

Enfin la dernière étape dans le cycle de formation d'un biofilm correspond au vieillissement de ce biofilm. La diminution de la disponibilité en nutriments ou des modifications physico-chimiques de l'environnement peuvent causer des turbulences ce qui peut entraîner l'éclatement du biofilm. Ainsi, une partie de bactéries retournent à l'état planctonique et elles peuvent alors contaminer de nouvelles surfaces. Il s'agit véritablement d'un cycle de croissance et de dispersion cellulaire qui s'établit et qui favorise la dissémination des microorganismes.

2. Paramètres influençant la formation du biofilm

L'adhésion aux surfaces solides constitue l'étape initiale de la formation des biofilms. De nombreux facteurs influencent cette étape. Ils sont liés à la fois aux caractéristiques du support et à celles du milieu environnant ainsi que celles du microorganisme.

a. Facteurs liés au support

Les propriétés de la surface représentent des facteurs qui déterminent l'adhésion des bactéries. Ces propriétés sont la topographie, la rugosité de surface, la nettoyabilité ainsi que la mouillabilité de la surface. Ils jouent un rôle important dans l'adhésion des bactéries. Les propriétés de surface et notamment sa polarité et sa rugosité sont à l'origine de différence dans les phénomènes d'adhésion des bactéries à une surface.

La formation de biofilm est plus répandue sur des surfaces hydrophobes que sur des surfaces hydrophiles (Katsikogianni et Missirlis, 2004; Ploux *et al.*, 2007). Dans le cas des surfaces hydrophiles, des liaisons hydrogènes se forment entre les molécules d'eau du milieu et les groupements fonctionnels du support solide. Il existe alors un phénomène de répulsion hydrophile à la surface de la bactérie si celle-ci est hydrophile. À l'inverse, sur une surface hydrophobe, qui est inerte avec l'eau, il se produit un phénomène d'attraction hydrophobe. Il faut cependant considérer ce facteur par rapport aux propriétés des bactéries elles-mêmes ainsi que celles du milieu environnant (Briandet *et al.*, 1999; Chae et Schraft, 2000; Allion *et al.*, 2007).

L'adhésion bactérienne, *via* l'adhésion des premières bactéries et la production d'EPS, est influencée par la topographie et la structure de la surface (la forme et la taille des éléments de surface) (Díaz *et al.*, 2008; Hsu *et al.*, 2013). La nature même du matériau influence la formation de biofilm. La capacité de formation de biofilm de la souche *Legionella pneumophila* a, par exemple, été testée par Rogers *et al.* (1994) et Meyer (2001). Ils ont montré que la croissance du biofilm était plus importante, dans l'ordre croissant, sur du verre, de l'acier inoxydable, du polypropylène, du PVC chloré, du PVC non plastifié, l'éthylène-propylène jusqu'au maximum sur le latex (Rogers *et al.*, 1994; Meyer, 2003). Cependant, les matériaux classiquement rencontrés dans les industries agro-alimentaires peuvent présenter des structure de type biofilms. Ces matériaux sont les plastiques, le caoutchouc, le verre, le ciment et l'acier inoxydable (Van Houdt et Michiels, 2010).

Toute surface exposée dans un milieu environnant aqueux est contaminée par de la matière organique (protéines, polysaccharides) ou des composés inorganiques (sels, minéraux) qui sont dissous dans le milieu. Il s'agit du « film conditionnant ». Lorsque les cellules du biofilm sont détachées de la surface par une action mécanique, il reste à la surface des composés des cellules (constituants de membranes, de parois) qui peuvent également composer le film conditionnant. La présence de ce film entraîne la modification des caractéristiques physiques et chimiques du support ce qui peut influencer de manière positive ou négative l'adhésion des bactéries au support (Donlan, 2002). L'ancrage microbien semble être favorisé par le film conditionnant qui sert de couche « primaire » à l'adhésion (Dufour *et al.*, 2010).

b. Facteurs liés aux microorganismes

Outre les facteurs liés aux surfaces, il est important de noter que l'adhésion des bactéries est dépendante du genre mais également de l'espèce bactérienne concernée. Il s'agit de l'architecture même et la nature des groupements chimiques présents à la surface des parois microbiennes qui sont directement responsables des propriétés de surfaces du microorganisme et, de ce fait, vont déterminer les interactions avec le support.

Il paraît évident d'observer des différences entre des microorganismes très différents (bactéries et levures ou des virus). Dans des conditions environnementales strictement identiques, deux microorganismes qui ne possèdent pas la même composition de paroi n'auront pas le même comportement vis-à-vis de la surface (Briandet *et al.*, 2012). Des différences peuvent être observées entre des bactéries à Gram positif et à Gram négatif (Figure 3). Les lipopolysaccharides (LPS) qui sont un constituant de la paroi des bactéries à Gram négatif confèrent à la bactérie des propriétés hydrophiles. Au contraire, les fimbriae qui contiennent une forte proportion d'acides aminés hydrophobes permettent l'établissement d'interactions hydrophobes avec les surfaces (Saulou, 2009).

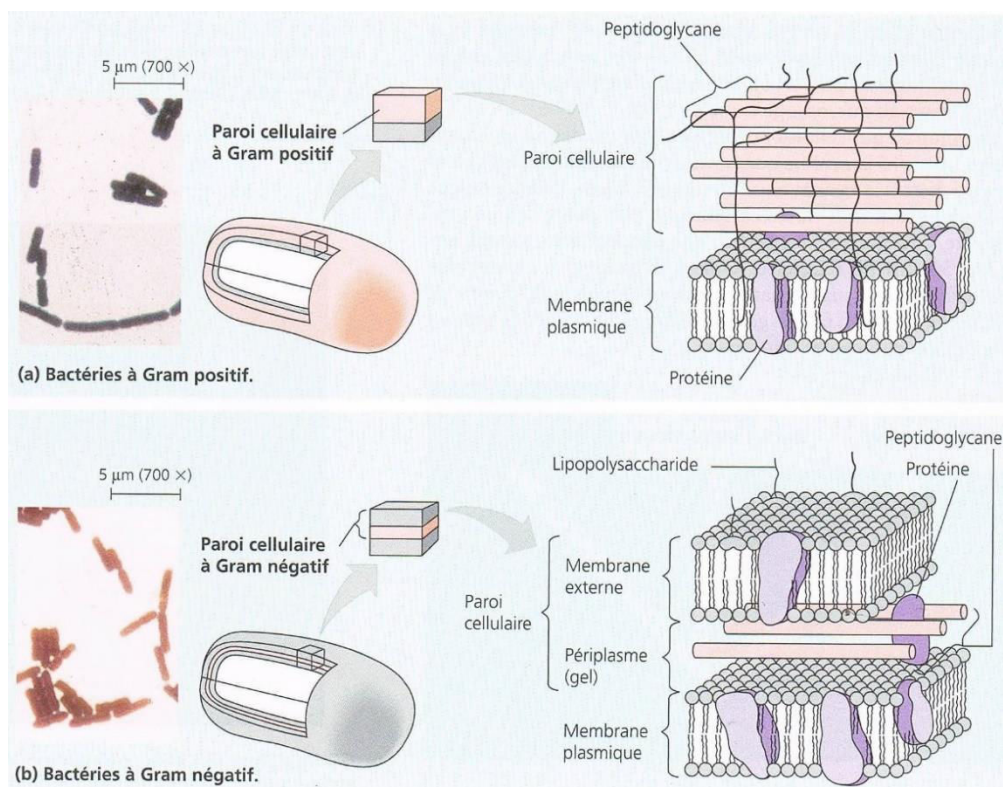


Figure 3 : Composition de la paroi chez les bactéries à Gram positif (a) et à Gram négatif (b) (Campbell et Reece, 2004)

Ce phénomène d'adhésion peut également être différent au sein d'un même genre, par exemple l'adhésion serait plus importante pour les bactéries à Gram négatif que celles à Gram

positif, de par leur différence au niveau de la paroi cellulaire (Myszka et Czaczyk, 2011). Il existe également des différences entre cellules qui appartiennent à une même espèce, comme *Listeria monocytogenes* (Chae et Schraft, 2000; Briandet *et al.*, 2006).

De nombreuses bactéries sont mobiles grâce à leurs flagelles péritriches ou polaires. Cette mobilité fait généralement partie des facteurs de virulence du microorganisme, car cela facilite la colonisation des cellules hôtes par les bactéries pathogènes. La mobilité flagellaire est très importante pour initier le contact avec la cellule. Elle est également primordiale pour la formation d'un biofilm (Van Houdt et Michiels, 2010). C'est le cas de nombreuses bactéries et notamment *Listeria monocytogenes*, *Yersinia enterocolitica* ou *Escherichia coli*. Des études ont montré que pour des mutants de ces espèces pour lesquelles les flagelles sont absents, l'attachement initial est altéré et par conséquent la capacité à former des biofilms (Kim *et al.*, 2008; Haiko et Westerlund-Wikström, 2013).

Les acides téichoïques, composants spécifiques des bactéries à Gram positif, possèdent également un effet sur l'adhésion microbienne. Ils confèrent à la bactérie une charge de surface négative (Gross *et al.*, 2001; Swoboda *et al.*, 2010; Bucher *et al.*, 2015). Chez *Staphylococcus aureus*, des mutants dont les acides téichoïques ont été modifiés par l'absence de D-alanine, ne sont plus capables d'adhérer à une surface. Ces acides téichoïques sont également présents dans les biofilms formés par différentes souches de *Listeria monocytogenes* (Brauge *et al.*, 2016).

La phase de croissance ainsi que l'état physiologique des cellules possèdent également un impact sur la capacité des bactéries à former des biofilms. Les bactéries qui se trouvent en phase stationnaire de croissance semblent être les plus adhérentes car l'énergie d'interactions entre les bactéries et le support est plus faible et favorise leur attraction. Cette diminution d'énergie d'interaction est liée au caractère donneur/accepteur d'électron de la bactérie (Saulou, 2009).

Les bactéries une fois adhérees à une surface sont physiologiquement différentes par rapport aux mêmes bactéries dans leur état planctonique (Zottola et Sasahara, 1994). Tout d'abord, les bactéries organisées sous la forme de biofilm, possèdent un taux de croissance inférieur à celui qui peut être observé pour les cellules planctoniques (Ditta *et al.*, 2008). De plus, le mode de vie sous forme de biofilms sur les surfaces favorise les interactions physiologiques et les échanges de gènes entre les microorganismes. Ainsi, il a été montré qu'au sein de biofilms modèles, le taux de transfert conjugatif était élevé (Van Meervenne *et al.*, 2014).

C. Biofilms au sein des industries agroalimentaires

1. Bactéries présentes dans les IAA

Dans les IAA, les phénomènes de contamination croisée des aliments au contact des surfaces ont des conséquences à la fois économiques mais également sur le plan de la santé publique, en cas de présence de germes pathogènes. Dans les différentes filières d'IAA, les bactéries présentes peuvent être nombreuses, persistantes et se peuvent se présenter sous forme de biofilm (Figure 4).

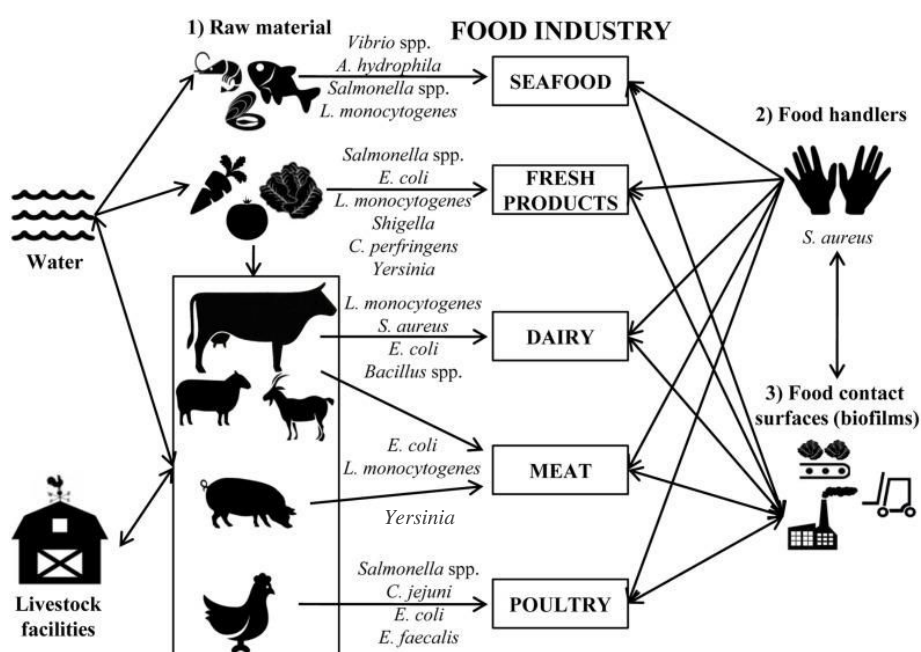


Figure 4 : Représentation schématique des principales sources de contamination dans les IAA (d'après Guitiérrez et al., 2016).

Dans les environnements de la filière carnée, les bactéries psychrotrophes sont particulièrement retrouvées, dont le pathogène *Listeria monocytogenes*. Ces bactéries possèdent la capacité de résister et de croître dans des conditions de « stress froid » avec de température de croissance qui peuvent être autour de +4°C. Il est possible de classer ces bactéries en trois groupes : les bactéries pathogènes, les bactéries responsables d'altération des produits mais également les bactéries appartenant à la flore technologique. Les travaux dans cette thèse portent sur les deux premiers groupes et par conséquent, ce sont ces groupes qui seront décrits dans ce chapitre. *Listeria monocytogenes* tient une place prépondérante au sein des bactéries psychrotrophes pathogènes pour l'Homme. D'autres espèces, comme *Yersinia enterocolitica*, *Bacillus cereus* sont également impliquées dans des toxi-infections alimentaires (Bornert, 2000).

Parmi les bactéries responsables de l'altération des denrées alimentaires, le genre *Pseudomonas* est le plus représenté de par sa grande capacité à se développer dans les environnements froids. De plus, il a été montré pour certaines espèces qu'elles étaient retrouvées en présence de bactéries pathogènes dans des biofilms et qu'elles pourraient être des colonisateurs primaires des surfaces en IAA (Chasseignaux, 1999).

c. *Listeria monocytogenes*

En 2015, dix-huit espèces de *Listeria* ont été recensées, dont l'espèce *Listeria monocytogenes*. *L. monocytogenes* est présente dans de nombreuses niches écologiques, notamment au niveau des sols, dans l'eau mais également dans les ateliers agro-alimentaires. Cette espèce est pathogène pour l'Homme et les animaux. Elle est responsable de la listériose. La listériose est une infection grave, d'origine alimentaire, dans 99% des cas. Il existe deux formes : non invasive ou invasive. Dans le premier cas, la forme se caractérise par des gastroentérites fébriles. Dans le second cas, elle peut entraîner aussi bien des infections locales que des septicémies ou de infections du système nerveux central comme des méningo-encéphalites. Chez la femme enceinte, elle peut provoquer un avortement, un accouchement prématuré ou une infection néonatale grave. Bien que cette maladie reste rare, en France, elle est mortelle dans 20 à 30% des cas survenant en dehors de la grossesse (Carpentier et Cerf, 1993; Anses, 2011). D'après les dernières données épidémiologiques de l'InVS (2015), l'incidence annuelle de la listériose en France est plutôt stable depuis 2007 avec 5 cas par million d'habitants (Figure 5).

Listeria monocytogenes est un petit bacille (2 µm x 0,5 µm), à Gram positif, souvent isolé ou en chaînette, mobile à 20-25°C grâce à des flagelles péritriches, non sporulé, non capsulé. *L. monocytogenes* est aéro-anaérobie facultative, catalase positive, oxydase négative. Cette espèce tout d'abord divisée en 13 sérovars selon leurs antigènes somatiques et flagellaires, est dorénavant divisée en 5 géosérogroupe déterminés par PCR (Kérouanton *et al.*, 2010): IIa (sérovars 1/2a et 3a), IIb (sérovars 1/2b et 3b), IIc (1/2c et 3c), IVb (sérovars 4b, 4d et 4^e) et L (les autres sérovars). Le géosérogroupe IVb est le groupe le plus relié aux cas humains (Kérouanton *et al.*, 2010).

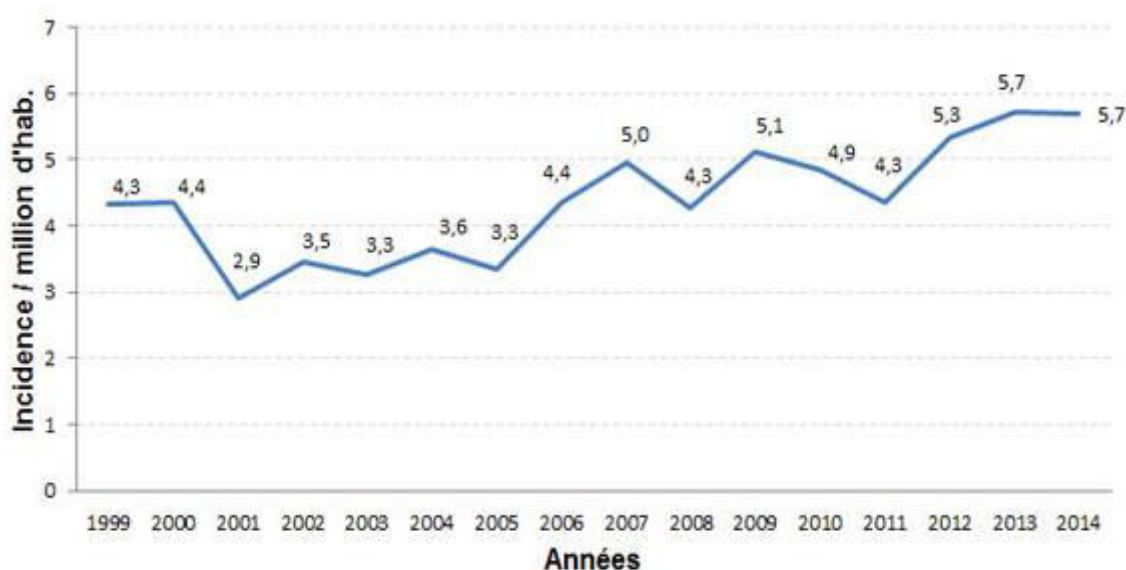


Figure 5 : Incidence annuelle de la listériose par million d'habitants en France de 1999 à 2014 (InVS, 2015)

Cette bactérie, psychrotrophe a la capacité de croître dans un environnement d'IAA. En effet, elle est capable de se développer dans des conditions de température allant de -2 à 45°C avec un optimum de croissance entre 30 et 37°C. De plus, elle est également capable de se multiplier sur une large gamme de pH de 4,0 à 9,6 (Carpentier et Cerf, 2011). Cette bactérie peut croître sur des surfaces, telles que les sols, les équipements dans les locaux des IAA, dans le froid et une atmosphère humide, là où certaines bactéries non psychrotrophes ne peuvent survivre.

La contamination des produits alimentaires par *L. monocytogenes* peut intervenir à tous les stades de la chaîne alimentaire (Anses, 2011). Cependant, de bonnes pratiques de fabrication, une hygiène appropriée, avec un contrôle des températures de conservation des produits sont nécessaires pour limiter la présence et le développement de *L. monocytogenes* dans les aliments. Malgré ces opérations d'hygiène et les contrôles, il a pu être observé que certaines souches de *L. monocytogenes* peuvent être retrouvées au sein des IAA et peuvent s'établir et rester pendant plusieurs mois voire des années (Carpentier et Cerf, 2011; Overney, 2016).

Différentes hypothèses existent afin d'expliquer cette capacité à persister. Une des hypothèses met en avant les différences génétiques des souches persistantes, ainsi elles possèderaient une capacité accrue d'adhésion mais aussi une résistance plus importante aux agents nettoyants et désinfectants. Une autre hypothèse est qu'il n'existe pas de souche ayant des gènes spécifiques de la persistance mais que les micro-organismes ont des gènes qui leur confèrent la capacité de s'adapter aux conditions environnementales et donc de persister (Carpentier et Cerf, 2011). Il est possible qu'il existe des niches qui protégeraient et pourraient

favoriser la rétention des bactéries sur les surfaces. Ainsi, ces niches protectrices sont des zones idéales pour la croissance de bactéries malgré les procédures de nettoyage et désinfection appliquées dans les IAA (Figure 6).

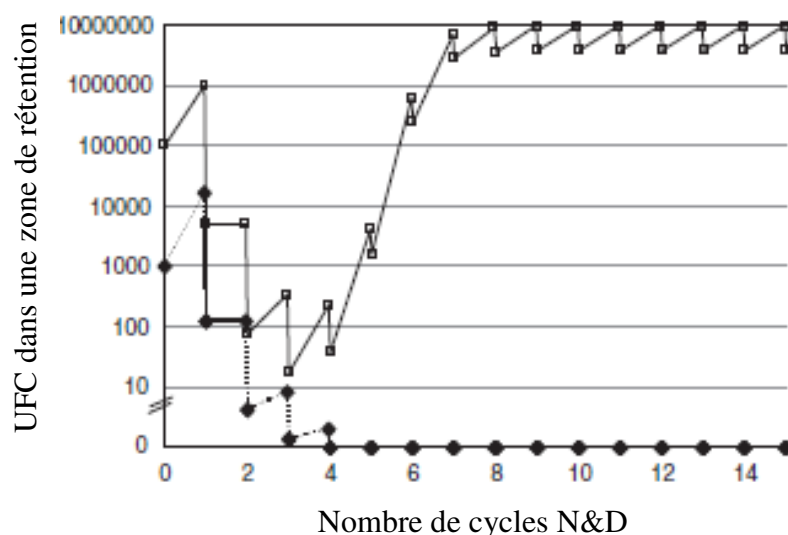


Figure 6 : Modèle de la persistance (□) et de la non-persistance (■). Evolution de la quantité de cellules en UFC au niveau d'un site de rétention contaminé une première fois en fonction du nombre de de procédures de nettoyage et désinfection des surfaces appliquées (d'après Carpentier et Cerf, 2011).

La présence et la persistance de certaines souches ont un impact sur la sécurité sanitaire des aliments, mais sont également à l'origine de pertes économiques (destruction, retrait de produits et marchandises). Il est par conséquent nécessaire de mettre en place de nouvelles méthodes permettant de lutter contre ces bactéries.

d. *Yersinia enterocolitica*

Yersinia enterocolitica, est un bacille à coloration de Gram négatif qui se présente souvent sous forme coccobacillaire. Cette bactérie appartient, au genre *Yersinia* parmi les Enterobacteria. *Y. enterocolitica* est une bactérie psychrotrophe, responsable d'une maladie zoonotique, la yersiniose. Cette infection est plus courante chez les jeunes enfants et cause des symptômes de diarrhées, parfois même sanglantes. Il existe 60 sérogroupes pour *Y. enterocolitica*, les plus couramment rencontrés et impliqués dans les cas cliniques humains sont les sérotypes O:3, O:5,27, O:8 et O:9 (Tan *et al.*, 2014; Mazzette *et al.*, 2015).

Y. enterocolitica est reconnu comme le troisième plus important pathogène d'origine alimentaire en Europe, après *Campylobacter* et *Salmonella*. Le nombre de cas confirmés de yersiniose en Europe en 2011 est de 7017 avec 98,4% des cas dus à *Y. enterocolitica* et 0,9%

des cas dus à *Y. pseudotuberculosis* (Tan *et al.*, 2014). Récemment, Van Cauteren (2016) a estimé à plus de 26 000 cas le nombre de cas annuel en France. Cette bactérie est ubiquitaire dans la nature et peut être isolée d'animaux, de produits alimentaires et de différents environnements. Les porcs sont considérés comme un des réservoirs majeurs de *Y. enterocolitica*. Cette bactérie est également présente et transportée par les ruminants et leurs produits, les volailles mais aussi les légumes et les produits laitiers et le lait (Esnault et Denis, 2015).

La taxonomie de *Y. enterocolitica* est basée sur le pouvoir pathogénique des souches. Six biotypes ont été définis en fonction de réactions biochimiques comme la possibilité de réduire les nitrates ou la production de lipase. Au sein de ces biotypes, différents sérovars peuvent être regroupés (Figure 7). Les souches de *Y. enterocolitica* se déterminent ainsi par leur biosérotype (Bottone, 1999). En France, parmi les souches isolées d'infection humaine, le biosérotype 4/O:3 est le plus fréquent (71,1% des souches) suivi du biosérotype 2/O:9 (25,4%) et du biosérotype 3/O :5,27 (1,8%) (Le Guern *et al.*, 2016) .

<i>Associated with human infections?</i>	<i>Biogroup</i>	<i>Serogroup(s)</i>	<i>Ecologic/geographic distribution</i>
Yes	1B	O:8; O:4; O:13a,13b; O:18; O:20; O:21	Environment, pig (O:8), United States, Japan, Europe, The Netherlands (O:8-like)
	2	O:9; O:5,27	Pig, Europe (O:9), United States (O:5,27), Japan (O:5,27), Sweden, The Netherlands
	3	O:1,2,3; O:5,27	Chinchilla (O:1,2,3), pig (O:5,27)
	4	O:3	Pig, Europe, United States, Japan, South Africa, Scandinavia, Canada, The Netherlands
	5	O:2,3	Hare, Europe
No ^a	1A	O:5; O:6,30; O:7,8; O:18; O:46, nontypeable	Environment, pig, food, water, animal and human feces, global

^a May be opportunist pathogens in patients with underlying disorders.

Figure 7 : Description des biotypes et sérogroupes de *Yersinia enterocolitica* (d'après Bottone *et al.*, 1999)

Les études menées sur la formation de biofilm par les bactéries du genre *Yersinia* ont porté principalement sur l'espèce *Y. pestis* (Fratamico *et al.*, 2009). Cependant une étude menée en 1985, par Camper et ses collaborateurs a montré que *Y. enterocolitica* était capable de former des biofilms sur la surface de filtres utilisant du charbon actif pour le traitement d'eau (Camper *et al.*, 1985).

Il a été montré, plus récemment, que *Y. enterocolitica* ainsi que *Y. pseudotuberculosis* sont capables de former des biofilms sur des surfaces inertes (Ioannidis *et al.*, 2014). Ioannidis et ses collaborateurs ont montré que les 60 isolats cliniques de *Y. enterocolitica* testés dans leur étude étaient capables de former un biofilm sur une surface inerte, le silicone, et que les bactéries sous forme de biofilm étaient plus résistantes à différents antimicrobiens que les bactéries sous forme planctoniques.

Cependant, il existe peu d'études sur la capacité de formation de biofilm par *Y. enterocolitica*, notamment dans les ateliers agro-alimentaires.

e. *Pseudomonas fragi*

Le genre *Pseudomonas* est l'un des genres les plus diversifiés qui existent. Sa taxonomie a subi de nombreux changements depuis les premières descriptions du genre dans les années 1980, conduisant notamment à une augmentation du nombre d'espèces chaque année de près d'une centaine (Mulet *et al.*, 2010). Les besoins nutritionnels de ces bactéries sont très simples. Elles peuvent de ce fait être retrouvées dans de nombreux endroits et produits comme les sols, l'eau, ou les environnements marins mais également des produits médicaux, cosmétiques ou alimentaires (Franzetti et Scarpellini, 2007).

Pseudomonas fragi est une bactérie à Gram négatif, appartenant à la flore d'altération représentée par des bacilles mobiles avec un flagelle polaire, de taille plus ou moins variable. Cette bactérie est aérobic stricte et possède une catalase et une oxydase. Il s'agit d'un organisme psychrophile, avec une croissance entre 10 et 30°C, qui est impliqué dans l'altération de produits alimentaires comme la viande ou les produits à base de lait (notamment lorsqu'ils sont produits à partir de lait non pasteurisé) (Lebert *et al.*, 1998). En effet, *P. fragi* possède une activité protéolytique et lipolytique, grâce à la production de protéases et lipases extracellulaires. *P. fragi* est une bactérie présente de manière dominante, dans les produits à base de viande, comme la viande de volaille, le bœuf et le porc. Widders et ses collaborateurs, ont montré qu'en moyenne, les carcasses de porcs, même à 4°C, sont contaminées avec environ 4 log UFC/cm², ce qui est à l'origine de l'altération de la viande (Widders *et al.*, 1995). *P. fragi* est capable d'entraîner la production d'odeurs putrides sur les produits carnés par la dégradation d'acides aminés ainsi que de rendre les produits de couleur verdâtre.

Bien que *P. fragi* soit responsable de l'altération des produits frais, elle n'est pas une bactérie pathogène pour l'Homme. Elle n'est pas capable de croître à 37°C, étant donné qu'elle est plutôt sensible à la chaleur. De ce fait, la pasteurisation est un procédé efficace pour lutter contre cette espèce, ce qui protège les produits d'une recontamination. Toutefois, Chasseignaux et ses collaborateurs ont montré que *L. monocytogenes* était associé à la présence de *P. fragi*, sur des surfaces dans des ateliers de découpe de porcs et de volailles (Chasseignaux *et al.*, 2002).

P. fragi est capable de former des biofilms notamment dans des atmosphères réfrigérées. Zottola et Sasahara ont étudié la formation de biofilm de *L. monocytogenes* associé à *P. fragi*. Lorsque *L. monocytogenes* est en monoculture, les bactéries s'attachent de manière éparse à la surface. En co-culture, avec *P. fragi*, l'adhésion de *L. monocytogenes* est

plus importante. En effet, il semble que les bactéries de *P. fragi* adhèrent dans un premier temps. Ensuite, des microcolonies se forment autour de ces premières cellules (Zottola et Sasahara, 1994). L'hypothèse de ce phénomène est que la souche de *P. fragi* est capable de produire des EPS dont *L. monocytogenes* a besoin pour coloniser la surface. Ces EPS attirent et encerclent les cellules de *L. monocytogenes*. Il a été en effet observé que *P. fragi* est capable de produire une substance fibreuse avec de nombreuses projections ressemblant à des bâtons. Ceux-ci s'étendent entre les cellules et les surfaces en verre ou en acier inoxydable après 6h de contact (Figure 8). Le phénomène est plus important après 12h et 24h de contact. L'adhésion irréversible de *P. fragi* est possible grâce à la formation d'EPS et notamment des fibres polysaccharidiques composées d'une séquence répétée de 3 sucres : lactylglucose-N-actéylmannosamide-glucose. Le lactylglucose n'est cependant pas un sucre retrouvé habituellement dans les polysaccharides bactériens (Parolis *et al.*, 1992; Chasseignaux, 1999).

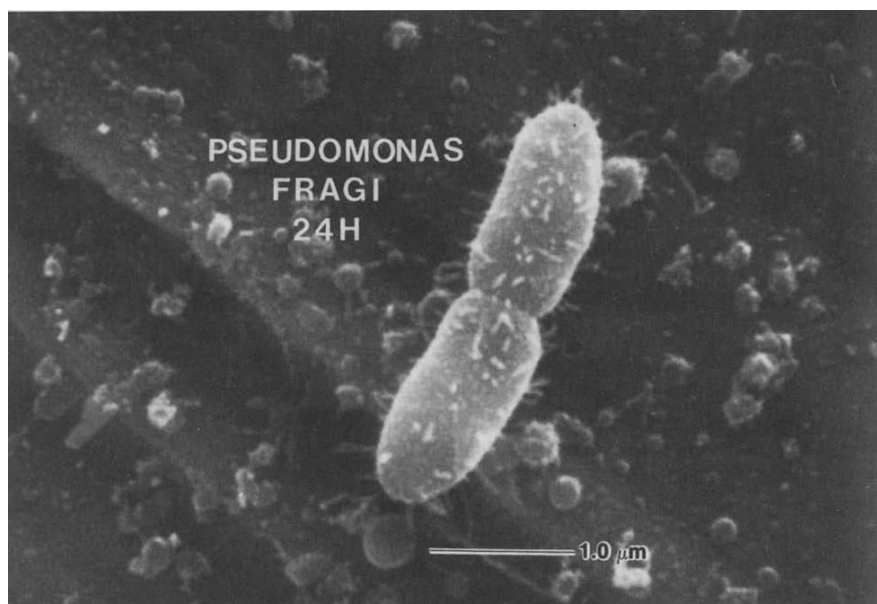


Figure 8 : Observation de *Pseudomonas fragi* sur acier inoxydable après 24h de culture à 23°C (d'après Zottola et Sasahara, 1994).

P. fragi est une bactérie qui peut être retrouvée à différents stades de production. Dans les industries de transformation de produits carnés, cette bactérie peut être présente au niveau des lignes de découpe, du stockage mais également au cours de la distribution (Lebert *et al.*, 1998). Cette espèce peut ainsi représenter près de 75% de la flore totale des viandes réfrigérées (Chasseignaux, 1999). En plus d'être un facteur de pertes économiques éventuelles, *via* l'altération de nombreux produits alimentaires, la présence de *P. fragi* dans les IAA peut représenter une flore appelée, colonisateur primaire. Ces colonisateurs primaires permettent la présence d'autres bactéries, parfois pathogènes, qui auraient pu avoir des difficultés à s'implanter mais qui trouvent par la présence de cette première flore un environnement propice pour leur développement et leur persistance.

2. Impact de la présence des biofilms dans les IAA

De nombreuses surfaces abiotiques, comme le verre, l'acier inoxydable ou bien encore des plastiques, le caoutchouc, le titane, l'aluminium ou les céramiques sont rencontrées dans les industries agroalimentaires (Abdallah *et al.*, 2014). De nombreux facteurs peuvent influencer les phénomènes d'adhésion et donc de formation de biofilm, comme il a été décrit précédemment. Il est généralement difficile d'éliminer les biofilms une fois qu'ils se sont formés, puisqu'ils peuvent atteindre des épaisseurs variables allant jusqu'à plusieurs centimètres (Trachoo, 2003; Shi et Zhu, 2009).

La contamination des surfaces, notamment *via* la présence de biofilm dans les industries agro-alimentaires représente un problème d'hygiène et joue un rôle dans la persistance des bactéries pathogènes dans les IAA. Chaque année en France, des toxi-infections alimentaires touchent près de 250 000 personnes. Sur l'ensemble de ces infections, 400 sont responsables de décès (Bridier *et al.*, 2015). Un rapport de l'organisme Santé Publique France, en 2011, a montré que 60% des infections étaient le résultat d'un transfert de bactéries de la surface contaminée à la denrée alimentaire. La contamination des aliments due à l'environnement des ateliers de transformation, a par exemple été mise en cause lors d'épidémie de listérioses (Reij et Den Aantrekker, 2004). Parmi les bactéries retrouvées au sein des biofilms, celles appartenant à la flore d'altération peuvent conduire à des pertes économiques pour les industriels en cas d'altération des produits alimentaires (Simões, 2010). L'altération des produits alimentaires se traduit par la modification des qualités organoleptiques du produit, texture, odeur, goût, ainsi que la présence de manière visible des microorganismes (Bai et Rai, 2011).

Les environnements des IAA plutôt humides constituent un environnement propice à la formation et au développement de biofilms. En effet, ces surfaces peuvent être recouvertes de matières organiques comme les protéines de lait ou de viande, parfois du sang, ce qui peut favoriser l'adhésion des bactéries. Les microorganismes sont retrouvés dans les industries agroalimentaires dans les différentes étapes de transformation, les bactéries faisant partie intégrante des matières premières. Les biofilms se forment là où le nettoyage n'est pas approprié, c'est-à-dire, au niveau des courbures ou des jointures. Les joints d'étanchéité sont par exemple des surfaces où s'accumulent les saletés constituant un lieu propice au développement de biofilm (Shi et Zhu, 2009; Giaouris *et al.*, 2014).

De nombreuses espèces bactériennes ont été retrouvées au sein de biofilms présents en environnement agro-alimentaire, *Escherichia coli*, *Shigella* spp., *Staphylococcus* spp., *Listeria monocytogenes*, ou encore *Yersinia enterocolitica* (Trachoo, 2003; Shi et Zhu, 2009; Chorianopoulos *et al.*, 2011; Bridier *et al.*, 2015). Les biofilms présents sur des surfaces,

ouvertes ou fermées, peuvent être à l'origine d'importants problèmes d'hygiène s'ils comportent des bactéries pathogènes.

Les bactéries au sein d'un biofilm sont entourées d'une matrice extracellulaire. Cette structure offre aux bactéries la capacité d'être moins sensibles à l'utilisation de biocides. La résistance des cellules d'un biofilm aux antimicrobiens est beaucoup plus importante que pour les mêmes cellules à l'état planctonique (Giaouris *et al.*, 2014). En effet, les biocides ne sont pas capables de pénétrer au sein des couches de bactéries et de composés de la matrice, limitant ainsi l'efficacité de la substance chimique. En plus de la faible pénétration des biocides au sein du biofilm, il est possible que les agents désinfectants réagissent de manière importante avec les composés de la matrice (protéine, polysaccharides) plutôt qu'avec les bactéries présentes (Bridier *et al.*, 2011). Il existe un gradient de concentration de biocides qui se crée à l'intérieur du biofilm (Figure 9).

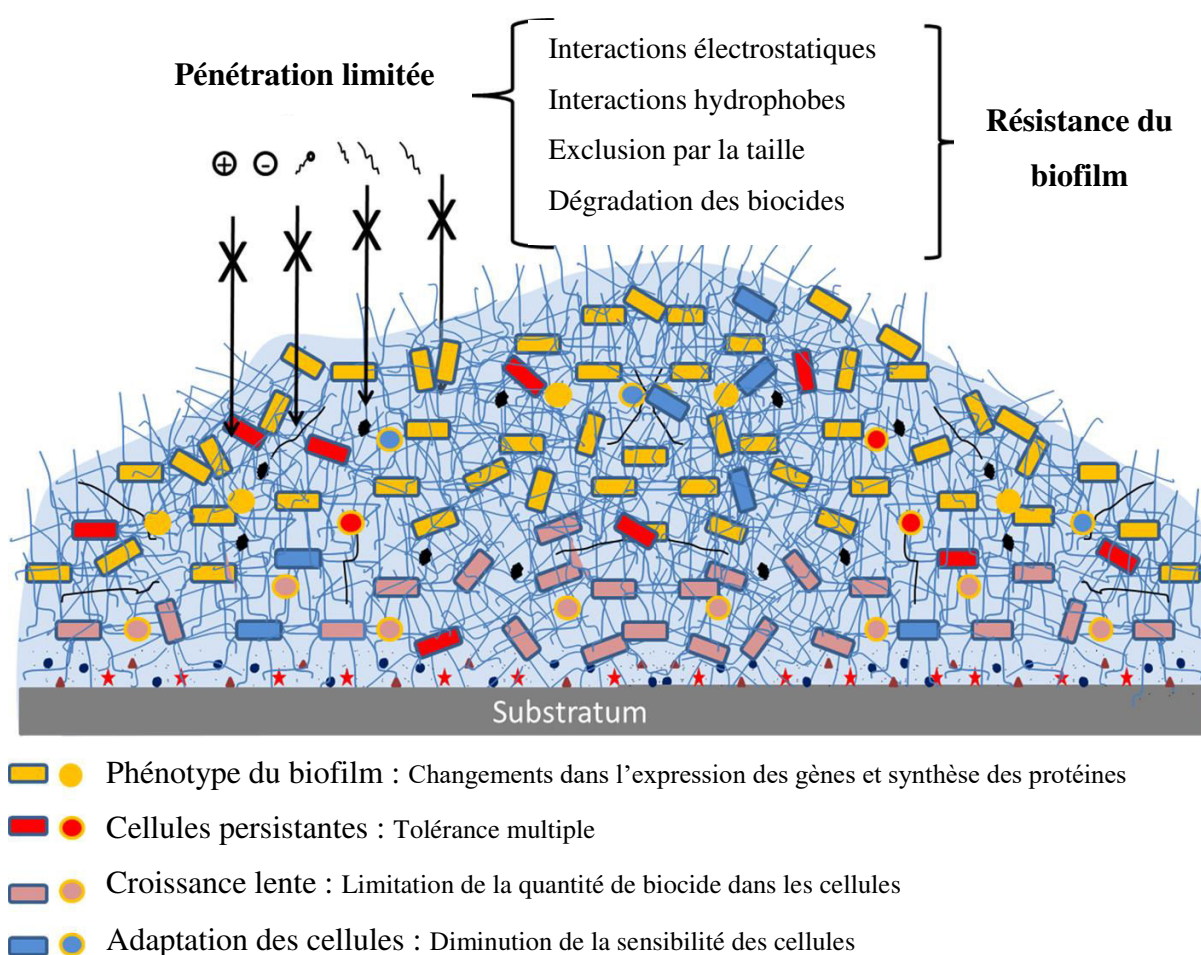


Figure 9 : Mécanismes développés par le biofilm pour résister à l'action d'agents antimicrobiens (Abdallah *et al.*, 2014)

Certaines bactéries, plutôt au cœur du biofilm, sont exposées à des concentrations subléthales en désinfectant. Ces bactéries sont capables de s'adapter suite à cette exposition. L'exposition répétée à des concentrations subléthales de biocides mène à l'apparition de

résistance ou d'une diminution de la sensibilité des bactéries à d'autres agents antimicrobiens. Les bactéries sont capables de répondre de différentes manières face aux biocides, comme en réduisant la perméabilité des cellules, en augmentant les flux avec le milieu extérieur grâce à des pompes à efflux ou encore par l'inactivation enzymatique des biocides. Ces mécanismes sont impliqués dans l'apparition des résistances croisées aux biocides et aux antibiotiques, rendant ces bactéries très difficiles à éliminer (Soumet *et al.*, 2016; Rodríguez-López et Cabo, 2017).

L'utilisation intensive d'antibiotiques a favorisé l'acquisition de gènes de résistance chez les bactéries. De même l'utilisation massive et parfois inappropriée des biocides dans les industries agro-alimentaires pourrait conduire à la sélection de bactéries moins sensibles à ces biocides voire à des antibiotiques. Ces bactéries sont capables de s'adapter, particulièrement lorsque les bactéries sont en contact avec des concentrations sublétales (Meyer, 2006).

Il est important de noter que la majorité des biofilms naturels sont constitués de différents microorganismes et ne sont que très rarement mono-espèce. Les biofilms plurimicrobiens sont très souvent plus stables, peuvent être plus épais et bien plus résistants aux attaques extérieures. Les cellules de biofilm, qu'il soit mono ou pluri-espèces, doivent adopter un comportement collectif afin que le biofilm puisse se développer (Davey et O'toole, 2000; Abee *et al.*, 2011; van der Veen et Abee, 2011). Les bactéries sont capables de répondre de manière collective ou compétitive face à des agressions extérieures ou la lutte pour les nutriments et exploitent les interactions et la communication entre cellules (de même espèce ou non) afin d'apporter de la cohésion au biofilm.

Parmi ces interactions et moyens de communications, le *quorum sensing* est utilisé par les bactéries. Il consiste en la production, la sécrétion de molécules signal. Ces molécules signal, appelées auto-inducteur, sont synthétisées grâce à des enzymes. La quantité de molécules signal est directement liée à la densité cellulaire. Les bactéries présentes détectent ces signaux et en réponse à ces signaux, les bactéries régulent l'expression de certains gènes (Li et Tian, 2012). Un grand nombre de bactéries possèdent plusieurs voies de *quorum sensing* qui sont souvent interconnectées. Le *quorum sensing* permet de coordonner et moduler les activités collectives de l'ensemble des bactéries. En dehors de la formation de biofilm, ce système de communication peut également être utilisé par les bactéries pour l'émission de bioluminescence, la production de facteur de virulence, la mobilité, le transfert d'ADN ou encore la synthèse de produits extracellulaires (Bai et Rai, 2011; Doberva, 2016). De cette façon les bactéries sont capables d'avoir une activité collective et sont capables de résister aux différentes stratégies employées pour lutter contre leur présence.

Biofilms : Mode de vie naturel et privilégié des bactéries

- **Communautés complexes et organisées capables de coordination *via* la communication cellulaire**

-

II. Moyens de lutte

La présence de biofilms représente un véritable problème spécialement dans le secteur de l'industrie agro-alimentaire (Simões *et al.*, 2007). C'est pourquoi le contrôle du développement microbien est primordial pour ce type d'industrie. Différentes approches peuvent être employées pour lutter contre les biofilms : prévenir l'adhésion initiale des bactéries, prévenir la croissance des micro-organismes, limiter voire empêcher la communication intercellulaire, ou inhiber la synthèse de la matrice du biofilm (Tremblay *et al.*, 2014).

A. Procédures de nettoyage et de désinfection

Les industries agro-alimentaires, comme les entreprises de transformations alimentaires emploient de manière très régulière des procédures de nettoyage et désinfection afin d'assurer la sécurité sanitaire de leurs produits. Ces procédures ont pour objectif de réduire le risque de contaminations croisées des produits, notamment par des bactéries pathogènes responsables de toxi-infections alimentaires. Une des stratégies afin de prévenir de la formation de biofilm est de désinfecter régulièrement les surfaces avant que le biofilm ne puisse se former (Meyer, 2003). Au sein des IAA, les moyens de lutte classiquement utilisés sont employés à la fin de cycle de production, là où certains biofilms ont déjà pu se former.

L'hygiène des surfaces ouvertes, dans les IAA, constitue un enjeu majeur de par la diversité du type de surfaces, les salissures présentes suite à la production. Ces surfaces sont de manière générale accessibles aux interventions humaines afin d'appliquer des actions mécaniques supplémentaires lors du nettoyage. Pour les surfaces fermées, quant à elles non accessibles, le Nettoyage En Place (NEP) est utilisé. Cela permet de conserver les équipements, sans avoir à les démonter, et le nettoyage et la désinfection sont assurés par un circuit d'eau et de produits selon des cycles déterminés. Les petits équipements comme les couteaux sont nettoyés et désinfectés par immersion (Guillaumin, 2002; Overney, 2016).

Entre deux phases de production, les équipements et les sols doivent être nettoyés et désinfectés. L'efficacité des procédures employées repose sur la bonne utilisation du matériel et des produits. De plus, afin d'éliminer les biofilms, les produits employés, biocides, doivent pouvoir pénétrer la matrice pour atteindre les cellules au sein du biofilm. L'hygiène des surfaces passe par la propreté physique, microbiologique mais aussi chimique.

Trois ensembles de facteurs sont à prendre en compte par rapport à l'efficacité de ces procédures. Les conditions environnementales des surfaces avec la présence de film

conditionnant, de résidus alimentaires, de bactéries ou biofilms ainsi que la conception hygiénique des ateliers agro-alimentaires sont des points majeurs pour que les procédures de nettoyage et désinfection soient efficaces. Il est également primordial de prendre en compte les procédures elles-mêmes, c'est-à-dire, le choix des produits, des temps d'application, les actions mécaniques liées aux écoulements de fluides nettoyants (Gibson *et al.*, 1999; Beauclair, 2011).

Dans un premier temps, il est nécessaire d'éliminer les souillures adhérentes ou non aux surfaces. C'est la phase de nettoyage et les produits alors employés sont des détergents. Ces détergents sont différents en fonction des souillures présentes et donc plus généralement différents en fonction du type de secteur d'activité. Par exemple, dans le cadre de la filière carnée, les différentes souillures retrouvées peuvent être du sang, de la gélatine, mais aussi des protéines, parfois de la saumure des sels de calcium. Dans le secteur laitier, d'autres types de souillures peuvent être présentes comme de la caséine ou des sucres. Dans cette catégorie de produit, il est possible de retrouver à la fois des produits alcalins, des acides. Le nettoyage, bien que cela ne soit pas sa fonction première peut également permettre d'éliminer certaines bactéries présentes sur les surfaces. Cependant, cette étape n'est pas suffisante pour éliminer toutes les bactéries et notamment si elles sont présentes sous forme de biofilm (Gibson *et al.*, 1999).

De ce fait, une fois le nettoyage effectué, vient la phase de désinfection afin d'éliminer les microorganismes présents sur les surfaces. Pour cette étape, les produits employés sont des biocides. Selon le règlement sur les biocides 528/2012/UE, quatre grandes familles de biocides existent : Les désinfectants, les produits de protection, les antiparasitaires et les autres biocides. Les produits destinés aux traitements des matériaux au contact des aliments sont partis de la catégorie désinfectants. Ces produits peuvent être des ammoniums quaternaires, des composés chlorés, des peracides organiques, des aldéhydes ou encore des alcools. Enfin pour assurer une surface « propre », toutes traces de produits chimiques doivent être éliminées grâce à un rinçage à l'eau. Pour les surfaces ouvertes, l'acide peracétique possède une activité bactéricide et permet de lutter contre les biofilms notamment ceux de *Listeria* ou *Pseudomonas* sur de l'acier inoxydable (Meyer, 2003).

Pour assurer une bonne désinfection, le choix du produit est essentiel et le principe actif doit répondre à différentes exigences (Allion, 2004) (Tableau 1).

Tableau 1 : Propriétés d'un produit désinfectant pour l'IAA (Allion 2004).

Exigences produit désinfectant

B. Nouvelles approches

Il est couramment admis que les méthodes classiques de nettoyage et désinfection possèdent des inconvénients comme la possible présence de résidus toxiques après la désinfection. Outre le problème lié au sous-dosage des biocides dans les IAA, la présence de résidus liés à de mauvais rinçages est non sans impact. En effet, ceci peut sélectionner des bactéries résistantes mais ces résidus peuvent également se retrouver dans les aliments. Aujourd'hui il convient de vérifier l'absence de ces traces de résidus (Zottola et Sasahara, 1994; Trachoo, 2003; Lavilla Lerma *et al.*, 2013; Giaouris *et al.*, 2014). De nouvelles stratégies sont nécessaires afin de permettre de garantir des produits alimentaires sûrs pour la consommation. La figure 11 présente les différentes approches alternatives qui peuvent être employées pour lutter contre la présence des biofilms dans les IAA

1.

neutres, des acides gras ou des lipopolysaccharides. Des homologues de ces molécules peuvent être obtenus par synthèse chimique (Meylheuc *et al.*, 2001).

b. Biofilms positifs

Peu d'études existent à l'heure actuelle sur l'existence de biofilms positifs. Dans certains ateliers, il est rare, voire exceptionnel, d'isoler des bactéries pathogènes. Ces ateliers sont cependant colonisés par des flores microbiennes implantées depuis de nombreuses années. En cas de présence de bactéries contaminantes, elles sont incapables de s'introduire dans le biofilm déjà présent. Leriche et Carpentier, en 2000, ont montré que des souches de *Staphylococcus sciuri* étaient capable d'inhiber la croissance et l'adhésion de souches de *Listeria monocytogenes* (Leriche *et al.*, 1999; Leriche et Carpentier, 2000).

L'entreprise Filavie a également développé un produit le « Filafilm Liquid ». Ce produit peut être utilisé au niveau de l'élevage et l'environnement des animaux. Il permet de créer une barrière efficace contre l'entrée de bactéries indésirables dans l'élevage. Il s'agit d'un produit à mettre en solution afin de pouvoir le pulvériser sur toutes les parois et équipements. Ce produit contient un mélange de douze souches appartenant aux bactéries lactiques (Protection bâtiment d'élevage, biofilm FILAFILM liquid - FILAVIE). D'autres produits sous le nom de COBIOTEX® sont commercialisés, pour permettre l'implantation de flore de barrière. Dans ces produits, il s'agit également de mélange de souches, notamment des bactéries lactiques et certaines souches de *Bacillus subtilis* (Bactéries positives pour la bioprotection des animaux.). L'implantation de ces mélanges de souches, permet de contrôler l'environnement *via* la colonisation préventive des surfaces, la compétition nutritive. Cela génère des phénomènes d'exclusion compétitive et certaines des souches utilisées peuvent produire des substances inhibitrices.

2. Limiter la communication

a. Biosurfactants

Au sein des communautés bactériennes telles que les biofilms, de nombreuses interactions intra ou inter-espèces ont lieu pour la formation du biofilm ou au cours de son développement (Carpentier et Chassaing, 2004). Certains auteurs ont pu mettre en évidence, par exemple dans le domaine des produits laitiers, que la présence de certaines bactéries, capables de former des biofilms, pouvait interférer avec les bactéries pathogènes. En effet de nombreuses bactéries sont capables de synthétiser et d'excréter des molécules qu'il est possible de qualifier de biosurfactants, possédant des propriétés anti-adhésives, c'est par exemple le cas de certaines souches de *Lactococcus lactis* (Rodrigues *et al.*, 2004; Charlier *et al.*, 2008; Sharma et Saharan, 2016).

b. Bactériocines

Certaines molécules bactériennes, des bactériocines sont utilisées comme biopréserveurs. C'est le cas de la nisine ou de la lauricidine (Dufour *et al.*, 2003). La nisine est actuellement reconnue comme un additif alimentaire. Il ne possède pas d'effet secondaire en dessous de la Dose Journalière Accordée. Cette molécule synthétisée par des bactéries est un petit peptide avec une action antibactérienne qui est listée comme un conservateur, le E234, pouvant être utilisée dans les fromages ou produits laitiers, mais aussi dans le domaine des produits cosmétiques (de Arauz *et al.*, 2009). La nisine, peptides de 34 acides aminés possède un double mode d'action. Elle est capable de se lier à certains lipides et inhibe la synthèse de la paroi cellulaire et forme des pores au niveau de la membrane cytoplasmique.

c. Molécules inhibitrices

La mise en évidence de l'implication du *quorum sensing* dans la formation et le développement de biofilm, a fait de ce mode de communication un point essentiel dans la lutte contre la présence de biofilm dans les IAA. L'inhibition du *quorum sensing* pourrait être un moyen naturel et efficace pour le contrôle des biofilms. Cependant, afin de pouvoir mettre en application une telle méthode, il est indispensable d'étudier les phénomènes de communication et les signaux entre bactéries. Ces études permettent de mettre en évidence des molécules et produits capables d'agir comme des inhibiteurs des signaux du *quorum sensing* (Swem *et al.*, 2009). Par exemple, la furanone, une molécule extraite d'une algue marine, et des molécules analogues, ont montré la capacité à inhiber ce mode de communication entre bactéries interférant ainsi avec le cycle de formation du biofilm (Tremblay *et al.*, 2014).

3. Déstructurer le biofilm

a.

Il est cependant nécessaire d'employer un mélange d'enzymes afin d'obtenir une bonne efficacité contre les biofilms qui présentent une grande hétérogénéité de substances, notamment au niveau des EPS. Ces mélanges d'enzymes ont montré une activité contre des bactéries présentes dans des ateliers de transformation du lait comme *Lactobacillus lactis* ou encore contre *E. coli*. Certaines études ont également montré l'action en synergie de détergents classiques couplés avec des enzymes, ce qui permet d'améliorer l'efficacité des produits.

Il s'agit d'une méthode plutôt complexe faisant intervenir des enzymes qui nécessite une formulation adaptée, en couplant par exemple des protéases ainsi que des enzymes hydrolysant les polysaccharides (Meyer, 2003). Le coût de ces détergents « verts » reste cependant plus élevé que le coût de détergents classiques ce qui limite l'utilisation de tels produits (Simões, 2010).

b. Phages

Les bactériophages sont présents naturellement dans l'environnement. Il s'agit de virus capables d'infecter les bactéries de manière très spécifique, non-toxiques pour d'autres organismes. Cette technologie est difficile à mettre en place du fait de l'utilisation des phages. En effet, l'implantation puis l'action des phages au sein d'un biofilm dépend de la composition chimique du biofilm mais également de nombreux facteurs environnementaux tels que la température, la phase de croissance des cellules au sein du biofilm mais aussi la concentration en phages. Le phage peut également posséder des enzymes dégradant les polysaccharides de la matrice du biofilm et provoquer ainsi la dispersion (Donlan, 2009). La présence d'eau libre semble nécessaire pour que le phage puisse s'orienter et atteindre sa cible. L'état physiologique de la bactérie est également un facteur clé. L'utilisation de phage P100 spécifique de *Listeria* (Listex) a été étudiée. Son application dans les denrées alimentaires semble possible mais son efficacité dans les environnements n'a pas été démontrée (Gutiérrez *et al.*, 2016).

c. Bactéries « nageuses »

Houry et ses collaborateurs (2012) ont découvert l'existence de bactéries flagellées très mobiles capables d'infiltrer les biofilms. Elles sont capables de créer un réseau de galeries transitoire dans la matrice. La perforation de cette matrice peut faciliter la pénétration et l'activité des substances désinfectantes. Cette stratégie biologique nouvelle pourrait être employée pour la maîtrise microbiologique des surfaces (Houry *et al.*, 2012).

4. Modifications de surfaces

Parmi les modifications de surface, l'utilisation de revêtements ou « coatings » est très répandue. Le design de revêtements possédant une activité antibactérienne peut reposer sur différentes techniques : la fixation par greffage de molécules connues comme ayant une activité bactéricide reconnues, par exemple le triclosan, la chlorhexidine ou le chlorure de benzalkonium ; l'utilisation de polymères avec un revêtement portant des groupes fonctionnels avec activité antibactérienne, comme les amines tertiaires ou les N-alamines ; l'utilisation de polymères qui libèrent des oxydes nitriques ; des couches minces libérant des molécules antibactériennes comme du triclosan ou de la nisine ; une autre méthode est la synthèse de surfaces nanostructurées ou des revêtements composés par exemple de nanoparticules d'argent ou d'oxyde de zinc (Barnes *et al.*, 2013; Campoccia *et al.*, 2013; Dizaj *et al.*, 2014).

Une dernière catégorie de revêtements existe : il s'agit de revêtements possédant une activité bactéricide photo-induite. Le composé le plus étudié pour cette catégorie est le dioxyde de titane et ces capacités photocatalytiques (Campoccia *et al.*, 2013; Gu et Ren, 2014). La photocatalyse est une réaction faisant partie d'une grande famille de procédés : Les procédés d'Oxydation Avancée.

Moyens de lutte contre les biofilms dans les IAA

- **Procédures de nettoyage et désinfection (N&D)**

III.

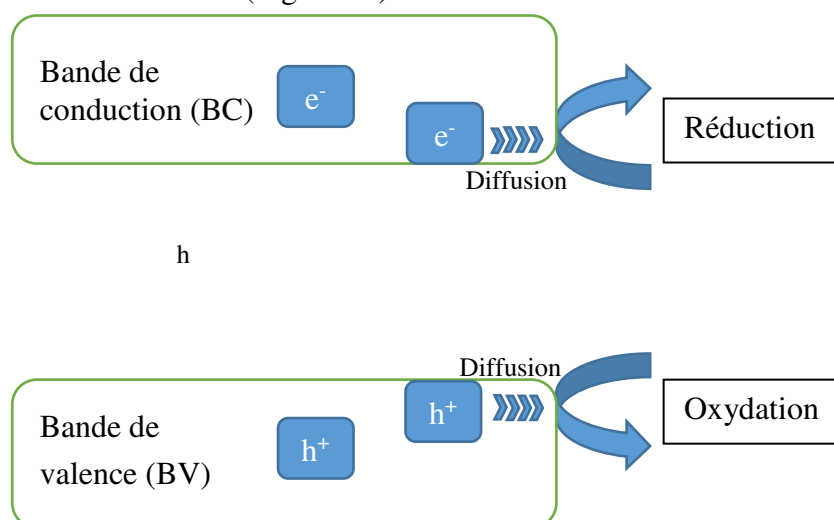
recherches ces dernières années. Ce procédé est utilisé dans de nombreux domaines tels que l'environnement ou la production d'énergie.

Les propriétés de certains matériaux, catalyseurs, sont utilisées pour convertir l'énergie solaire en énergie chimique. Ainsi l'oxydation ou la réduction de matériaux permet d'obtenir des composés utiles comme l'hydrogène et les hydrocarbures et permet l'élimination de polluants ou bactéries sur des surfaces ou dans l'eau et l'air (Nakata et Fujishima, 2012).

La photocatalyse hétérogène est un procédé assez complexe qui peut être divisé en 5 grandes étapes : (1) le transfert des réactifs à la surface du photo-catalyseur ; (2) l'adsorption de ces réactifs ; (3) les réactions des composés dans la phase dans laquelle ils sont adsorbés ; (4) la désorption des produits générés et (5) la diffusion des produits (Kaan *et al.*, 2012).

La photocatalyse hétérogène repose sur l'absorption par un semi-conducteur et non par une molécule ou un complexe métallique, d'une radiation lumineuse d'énergie supérieure à l'énergie de la bande interdite du semi-conducteur (Peruchon, 2007).

Le photocatalyseur est donc un matériau (solide ou moléculaire) capable d'absorber un photon puis de transférer cette quantité d'énergie à une réaction chimique. Lorsque le photocatalyseur absorbe une irradiation lumineuse d'énergie supérieure ou égale à l'énergie (E_g) de sa bande interdite (band gap), les électrons présents dans la bande de valence (BV) reçoivent une énergie suffisante pour être excités et passer dans la bande de conduction (BC) (Guillard *et al.*, 2011). La bande de valence peut être définie comme étant la dernière bande totalement ou partiellement occupée par des électrons dans la théorie des bandes. La bande de conduction est quant à elle, définie comme étant la première bande non occupée par des électrons. L'absorption d'énergie entraîne alors le passage d'électrons de la bande de valence à la bande de conduction (Figure 12).



À la suite de cette absorption, la photocatalyse peut être décomposé en différentes étapes : la création des paires électrons-trous (e^-/h^+) dans le semi-conducteur (Eq. 1). Ces paires peuvent se recombiner en partie, soit directement, soit indirectement (*via* les défauts de surface). Cette recombinaison peut avoir lieu dans le volume ou en surface du semi-conducteur et s'accompagne alors d'un dégagement de chaleur (Eq. 2). En présence d'une phase fluide (gaz ou liquide), une adsorption se produit et en fonction du potentiel redox de l'absorbat. Un transfert d'électron peut alors s'opérer vers les molécules (A) de caractère accepteur d'électrons (Eq. 3). Simultanément, les trous chargés positivement sont transférés vers les molécules (D) possédant un caractère donneur d'électrons (Eq. 4).

h

La photocatalyse présente différents avantages qui permettent d'envisager des applications à l'échelle industrielle. Le catalyseur utilisé n'est pas consommé pendant la réaction, de nombreux composés organiques et inorganiques peuvent être décomposés ou transformés par les réactions d'oxydo-réduction, la photocatalyse fonctionne à température ambiante.

B. Dioxyde de titane

1. Généralités

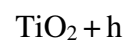
Dans notre cas, le semi-conducteur est le dioxyde de titane, TiO_2 . Il s'agit du semi-conducteur le plus utilisé en photocatalyse et il est reconnu comme étant un excellent photocatalyseur. Il a été mis en évidence pour la première fois en 1972 par A. Fujishima et K. Honda (Fujishima et Honda, 1972). En effet, le TiO_2 est chimiquement et biologiquement inerte et possède des performances photocatalytiques importantes. De plus il est attractif également en raison de sa disponibilité, le titane étant le cinquième élément le plus abondant sur terre. Les autres photocatalyseurs présentent pour la majorité d'entre eux au moins un inconvénient qui limite leur utilisation. CdS et ZnS sont instables dans l'eau, sujets à l'oxydation en sulfate et ZnO est moins stable que le TiO_2 .

Le TiO_2 se présente sous forme cristalline, dont trois structures différentes existent : anatase (quadratique), rutile (quadratique) et brookite (orthorhombique) (Tableau 3) (Sirimahachai *et al.*, 2009; Nair *et al.*, 2014). L'activité photocatalytique du TiO_2 dépend de cette structure cristalline. Seuls les deux principaux polymorphes du TiO_2 , les phases anatase et rutile, sont utilisés pour la photocatalyse. En effet, la structure brookite n'est pas assez stable pour être employée. L'anatase est la forme la plus active. Cependant à ce jour, la poudre commerciale Degussa P25®, qui est un mélange à 80% d'anatase et 20 % de rutile, possède la meilleure activité photocatalytique (Gogniat *et al.*, 2006; Helali, 2012).

L'anatase présente une énergie de bande interdite E_g de 3,2 eV, ce qui correspond à une activation par des photons de longueur d'onde

Tableau 3 : Caractéristiques des principales formes cristallines du TiO₂

Le procédé d'activation photocatalytique du TiO₂ par la lumière peut être défini par les équations suivantes :



Les mécanismes impliqués dans l'utilisation du TiO_2 peuvent être à la fois : l'oxydation direct par les trous formés ; la réduction par les électrons libres de la bande de conduction ; l'oxydation par les espèces radicalaires qui sont formées à la surface du catalyseur.

2. Applications du TiO_2

Le TiO_2 peut être utilisé sous plusieurs formes : sous forme de poudre (en suspension), incorporé dans une matrice polymérique (une peinture ou un vernis), en film épais (imprégnation en surface), en couche mince (dépôt chimique ou physique). Il faut toutefois préciser que, comme pour l'ensemble des matériaux, il subsiste des doutes sur ce qui concernent l'aspect non toxique du TiO_2 notamment lorsqu'il est sous forme de poudre de dimensions nanométriques (Kassir, 2013).

d. TiO_2 micrométrique

i. TiO_2 pigmentaire

Le dioxyde de titane fin est principalement utilisé comme pigment blanc. Les deux phases pigmentaires sont l'anatase et le rutil. Ce pigment blanc peut être retrouvé dans des peintures, des laques vernis et enduits ; des encres d'imprimerie ; dans l'industrie papetière ; des plastiques, cuir ou caoutchouc.

Le TiO_2 est également employé sous forme de colorant alimentaire et est utilisé dans certains produits pharmaceutiques et produits alimentaires ou cosmétiques sous le code E171 (Shi *et al.*, 2013). Le TiO_2 est aussi employé comme un biomatériau pour certains implants osseux comme les prothèses de hanche, du fait de sa grande dureté et résistance (Tsuang *et al.*, 2008).

ii. Autres applications

Le TiO_2 est utilisé dans la fabrication de certains composants électroniques (semi-conducteurs, résistances, condensateurs). De plus, dans certains médicaments, comme les vaccins, le dioxyde de titane peut être utilisé comme excipient ou support de principes actifs.

e. TiO_2 nanométrique

Également appelé dioxyde de titane « ultra-fin », le TiO_2 nanométrique est sous forme de particules de taille inférieure à 100 nm et en général ces particules n'excèdent pas quelques dizaines de nanomètres. De par leur taille, les nanomatériaux présentent des caractéristiques différentes des matériaux à l'échelle macroscopique.

Le dioxyde de titane ultra-fin possède de nombreuses applications, notamment dans l'industrie cosmétique, l'architecture, l'industrie agroalimentaire et l'épuration de l'eau et de l'air. Le TiO_2 entre dans la composition des produits de protection solaire comme les crèmes solaires du fait de sa propriété à absorber la lumière UV et agit donc comme un filtre. Grâce à ses propriétés photocatalytiques, le TiO_2 est employé dans la fabrication de ciments ou de verre. En effet, sous l'action des rayonnements UV, le TiO_2 est capable de décomposer une large variété de matières organiques, inorganiques mais aussi des micro-organismes.

Les propriétés photocatalytiques peuvent être employées pour la dépollution et/ou décontamination de l'air ou l'eau.

iii. Traitement des eaux

Le TiO_2 sous forme de nanoparticules a été testé dans de nombreuses études notamment pour le traitement d'eaux usées. A l'heure actuelle, au niveau industriel, les eaux subissent des étapes de filtrations successives se terminant par une étape ultime de décontamination principalement par chloration. Cependant, cette dernière étape peut être à l'origine de la formation de sous-produits ayant une toxicité chronique (Guillard *et al.*, 2011). La photocatalyse permet à la fois de dégrader des composés inorganiques mais également des polluants organiques en les minéralisant complètement. En ce qui concerne la désinfection de l'eau, l'utilisation de la photocatalyse est un procédé de plus en plus étudié en vue de l'amélioration de la qualité de l'eau (Bhatkhande *et al.*, 2002; Rawat *et al.*, 2007a; Guillard *et al.*, 2011; Kaan *et al.*, 2012; Rizzo *et al.*, 2014). Le principal inconvénient d'utiliser le TiO_2 sous forme de nanoparticule est de pouvoir récupérer ces particules après traitement, bien que des méthodes d'obtention de particules magnétiques permettrait de les récupérer grâce à un champ magnétique (Rana *et al.*, 2005; Rawat *et al.*, 2007b).

iv.

fines (nanométriques) peuvent alors entraîner des problèmes respiratoires graves (Sarantopoulos et Gleizes, 2008).

f. Applications de TiO_2 fixé

Le TiO_2 peut être employé dans la fabrication de surfaces photocatalytiques. Ces surfaces après illumination par des rayonnements UV présente un caractère superhydrophile. Quelques oxydes semi-conducteurs tels que le ZnO ou le TiO_2 possèdent une photohydrophilie. En ce qui concerne le TiO_2 , il s'agit de super-hydrophilie après une exposition aux UV suffisamment longue. Le mécanisme impliqué est assez complexe et n'est pas complètement défini. La génération de paires électron/trou facilite l'adsorption d'eau à la surface et donne au semi-conducteur ses propriétés hydrophiles.

Le TiO_2 est à la fois un photocatalyseur et photophile. Ces propriétés sont distinctes. Lorsque la surface de TiO_2 est exposée aux UV, une paire électron-trou est créée, ce qui génère des lacunes d'oxygène à la surface du photo-catalyseur. L'eau, présente dans l'air ou dans l'environnement, s'adsorbe à la surface. Il y a alors formation de groupements hydroxyles (Ti-OH), ce qui augmente l'hydrophilie de la surface. Lorsque la surface est à l'obscurité, les groupements Ti-OH sont alors oxydés et la super-hydrophilie disparaît (Figure 13).

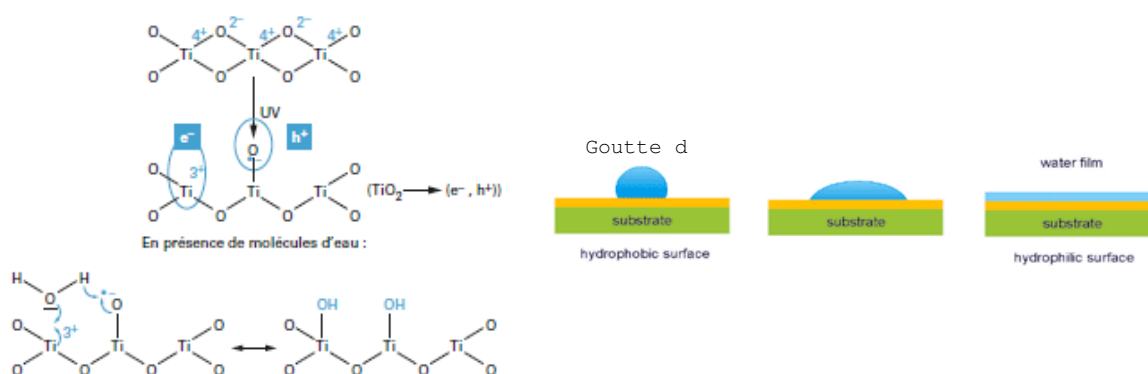


Figure 13 : Réactions chimiques liées au phénomène d'hydrophilie du TiO_2 exposé aux UV (Guillard *et al.*, 2011).

De part cette propriété de super-hydrophilie, le TiO_2 est employé pour la confection de vitrages auto-nettoyants, mais également pour des verres antibuée ou encore le verre des lampadaires, notamment dans les tunnels afin d'éviter leur encrassement (Guillard *et al.*, 2011).

v. Applications pour surfaces bactéricides

Le mode d'action de la photocatalyse pour des applications de surfaces bactéricides sera traité dans la partie IV.

Le développement de catalyseurs supportés permet de s'affranchir du problème de post-traitement de séparation pour la récupération du catalyseur sous forme de poudre. Cependant, l'utilisation d'un support peut limiter l'efficacité du dioxyde de titane (Bonetta *et al.*,

2013; Navabpour *et al.*, 2017). Les performances des surfaces peuvent être améliorées en prenant en considération trois facteurs : le recouvrement de la surface par le catalyseur, la géométrie du support, et les propriétés physico-chimiques du dépôt.

vi. Conception de surfaces bactéricides

La conception de surfaces bactéricides photoactives peut être réalisée de différentes méthodes : le dépôt et la fixation du dioxyde de titane sous forme nanoparticulaire, l'utilisation de couches minces photoactives. La fixation du TiO_2 sous forme de nanoparticules a déjà été utilisée à des fins industrielles par la société Ahlstrom. Une poudre de TiO_2 a été fixée de manière mécanique par un gel de silice sur une matrice cellulosique inerte. D'autres supports peuvent être utilisés, comme du verre (Peruchon, 2007) ou des mousses (Masson, 2012) ou encore de l'acier inoxydable (Chorianopoulos *et al.*, 2011).

D'autres méthodes consistent à déposer une couche mince de TiO_2 . Les dépôts peuvent être réalisés par des voies chimiques, CVD (chemical vapor deposition), technique sol-gel. La technique classiquement utilisée est la méthode sol-gel, car elle est simple de mise en œuvre et peu coûteuse (Raulio *et al.*, 2006; Gohin, 2009). Le procédé consiste à élaborer un film, souvent de silice, contenant des nanoparticules de TiO_2 . Les couches minces de TiO_2 peuvent également être obtenues par des voies physiques et notamment par des méthodes de dépôts sous vide, comme le dépôt physique en phase vapeur ou PVD (physical vapor deposition). La méthode PVD est reconnue car elle permet d'obtenir des couches minces compactes et homogènes avec une bonne adhérence de la couche au substrat. Il est également possible de faire varier de nombreux paramètres lors du dépôt ce qui permet d'optimiser et de faire varier la composition de la couche mince désirée ainsi que son épaisseur (Henkel *et al.*, 2016).

vii. La pulvérisation cathodique radio-fréquence

La méthode de dépôt par pulvérisation cathodique radio-fréquence a été choisie pour ces travaux de thèse. Cette méthode consiste à pulvériser une cible, constituée du matériau à déposer sur un support, à l'aide des atomes ionisés d'un gaz inerte dans une enceinte. Un plasma est obtenu à l'aide d'une décharge électrique radio-fréquence appliquée sur la cathode (matériau cible à pulvériser) à travers un circuit d'adaptation d'impédance comportant une capacité série. L'anode (porte-substrat), qui est en vis-à-vis de la cathode, est reliée à la masse. L'application d'une différence de potentiel suffisante entre deux électrodes dans un gaz raréfié entraîne sa luminescence du fait de son ionisation. Les ions ainsi formés sont à leur tour accélérés vers la cathode et génèrent de nouveaux électrons par émission secondaire lorsqu'ils entrent en collision avec cette dernière. Le gaz le plus couramment employé en pulvérisation est l'argon. Les ions parviennent sur la cathode avec une énergie considérable qui leur permet de provoquer l'expulsion des atomes de la surface de la cible. Le mécanisme d'éjection des atomes de la cible est dû à un transfert de la quantité de mouvement des ions incidents à ces atomes. Il y a ensuite un transport des particules pulvérisées dans le milieu ambiant vers les surfaces environnantes et donc sur le substrat (Figure 14)

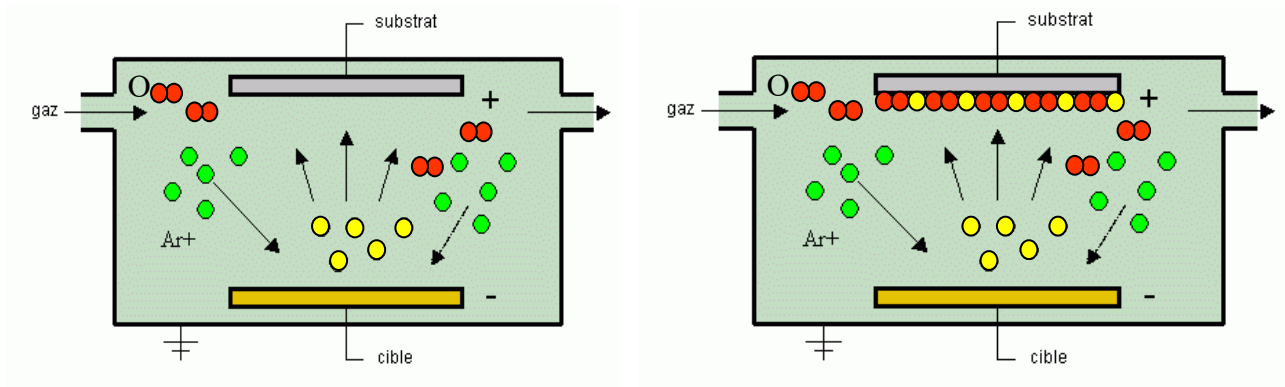


Figure 14 : Dépôt de couche mince de dioxyde de titane par pulvérisation cathodique radio-fréquence.

Les couches minces une fois obtenues peuvent être caractérisées par différentes techniques, notamment pour l'observation de la morphologie de surface, la mesure de l'épaisseur de la couche mince, et l'analyse de la composition de la couche mince. Du point de vue photocatalytique, les couches minces sont testées par rapport à un test de décoloration d'un composé coloré et dans notre cas, il s'agit du bleu de méthylène, une méthode classiquement utilisée (Wu et Chern, 2006; Barnes *et al.*, 2013).



IV. Stress généré par la photocatalyse

Depuis plusieurs années, le TiO_2 est utilisé dans la construction et l'aménagement urbain. De par leur activité auto-nettoyante, les surfaces permettent l'entraînement des salissures et permettent ainsi une meilleure nettoyabilité. En plus de ces propriétés auto-nettoyantes, les surfaces à base de TiO_2 possèdent également un pouvoir antibactérien qui permet d'envisager l'utilisation du TiO_2 dans différents domaines, notamment celui des industries agroalimentaires ou le domaine médical.

La première étude sur l'effet bactéricide du TiO_2 a été menée par Matsunga *et al.*, en 1985. Ils ont démontré la destruction de bactéries dans l'eau en utilisant du TiO_2 -Pt sous UV proches (315 nm à 400 nm). Cette étude a été le point de départ de nombreuses études sur l'effet de la photocatalyse au TiO_2 sur les bactéries mais aussi les virus, les champignons et levures (Thabet *et al.*, 2013).

A.

L'effet bactéricide des surfaces de TiO_2 repose sur leurs propriétés photocatalytiques, les composants organiques étant dans ce cas des cellules biologiques. C'est grâce à la formation des EROs, qui correspondent à de petites molécules issues de la réduction monovalente de l'oxygène que le TiO_2 possède un effet bactéricide. Ces molécules sont très réactives, les principales sont le radical hydroxyle, l'anion superoxyde et le peroxyde d'hydrogène. Ces EROs possèdent comme première cible la membrane cellulaire (Gogniat *et al.*, 2006; Kim *et al.*, 2013; Carré *et al.*, 2014).

1.

n'est pas dû à la présence d'une seule espèce réactive mais plutôt à l'action des plusieurs EROs de manière simultanée. Yan et collaborateurs, en 2009, ont montré grâce à la technique de la spectroscopie par résonance électronique de spin, que la présence de radicaux hydroxyles était étroitement associée à la présence de peroxyde d'hydrogène, car les radicaux hydroxyles sont obtenus par la réduction de l' H_2O_2 et en partie, en beaucoup plus faible quantité, également *via* la photolyse directe de l' H_2O_2 . Ces deux espèces réactives sont nécessaires pour obtenir un effet bactéricide complet sur les souches testées dans l'étude (Yan *et al.*, 2009).

Le stress oxydatif provient d'un déséquilibre entre la production d'EROs et les défenses cellulaires contre ces espèces. Des EROs font également partie du métabolisme des cellules. Elles sont produites par différents mécanismes physiologiques. La respiration aérobie, mais également le système de défense contre d'autres entités biologiques, sont à l'origine de la formation d'EROs.

De plus, au sein d'un biofilm, les cellules adhérentes subissent toute sorte de stress, comme la diminution de la disponibilité en nutriments, le stress osmotique mais aussi le stress oxydatif (Abdallah *et al.*, 2014). Ainsi, la présence d'espèces réactives, avec des radicaux libres, va avoir des effets délétères sur les bactéries en cas de déséquilibre. Ces espèces réactives sont capables d'induire une oxydation des lipides membranaires et des protéines, mais aussi une altération des acides nucléiques ADN et ARN (Carré *et al.*, 2014).

Les bactéries sont capables de répondre à la présence de ces espèces réactives grâce à des moyens de défense que la cellule peut moduler en fonction de la nature et de la quantité des espèces. Il faut un équilibre entre moyens de défense et espèces oxydantes pour que la cellule puisse survivre et poursuivre son métabolisme (Gennaris *et al.*, 2015).

a.

Ces anions superoxydes présentent une certaine toxicité mais sont peu réactifs par rapport à une grande majorité des molécules bioorganiques (acides nucléiques, protéines, lipides) bien qu'ils possèdent un potentiel d'oxydation plus faible que le radical hydroxyle. Cette espèce réactive possède une durée de vie relativement longue de l'ordre de la dizaine de secondes. Cela lui permet d'être diffusée au-delà de son lieu de production. Cependant, la charge électrique de ce radical ne lui permet pas de traverser les membranes biologiques. La toxicité des anions superoxydes se joue de manière indirecte. Ces radicaux réagissent avec l'eau oxygénée pour produire des radicaux hydroxyles.

b. Le peroxyde

Ce radical peut être formé de différentes manières : par la scission de liaison -O-O- du peroxyde d'hydrogène grâce au trou, ou par la réaction de Fenton, ou par la réaction du peroxyde d'hydrogène avec l'électron. La durée de vie des radicaux hydroxyles est extrêmement faible (inférieure à la nanoseconde), de ce fait, les distances qu'ils sont capables de parcourir sont très faibles. Ces radicaux hydroxyles sont les espèces les plus agressives. Ils sont capables d'oxyder pratiquement toutes les macromolécules telles que les protéines, les acides nucléiques, les acides gras polyinsaturés et les glucides.

2. Cibles du TiO₂

L'étude du mécanisme d'action de l'effet bactéricide du TiO₂ est fondamentale pour améliorer son activité et passe notamment par l'étude des cibles du TiO₂ au niveau bactérien.

De nombreuses études ont été menées sur le TiO₂ sous forme de nanoparticules sur différents modèles, bactérien avec *E. coli* (Pigeot-Rémy *et al.*, 2011) ou eucaryote *S. cerevisiae* (Thabet *et al.*, 2013).

L'impact des nanoparticules sur les bactéries peut être résumé par la Figure 17. Les nanoparticules, métaux (argent, zinc ou cuivre) ou bien oxydes métalliques (TiO₂), sont

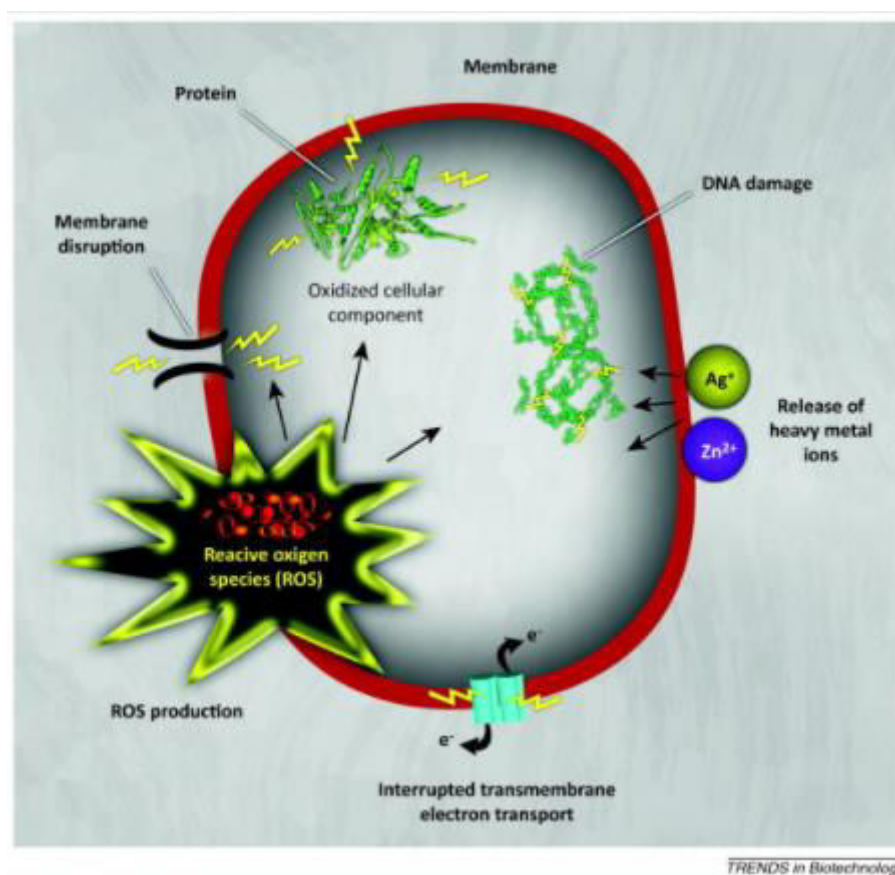


Figure 17 : Mécanismes de la toxicité des nanoparticules contre les bactéries. La présence de nanoparticules et/ou certains ions entraîne la production de radicaux libres générant un stress oxydatif (d'après Hajipour *et al.*, 2012)

capables de générer des espèces réactives de l'oxygène (Hajipour *et al.*, 2012). Les premières cibles de ces EROs se situent au niveau de la paroi et/ou la membrane cytoplasmique. Cependant, aucun radical, du fait de leur réactivité élevée, n'est capable de traverser la membrane cytoplasmique lorsqu'elle est intacte.

a. Peroxydation lipidique

Les cibles biologiques des EROs sont les lipides, les protéines mais aussi les acides nucléiques. La dégradation de la membrane plasmique se fait par la peroxydation lipidique qui entraîne des dommages irréversibles sur la membrane cytoplasmique composée par des phospholipides, que les bactéries soient à Gram positif ou négatif.

L'impact du TiO₂ Degussa P25 sur *E. coli* a été étudié par Pigeot-Rémy en 2011. Ils ont montré que l'un des facteurs de l'activité du TiO₂ est le contact entre les particules de TiO₂ et les bactéries. Cette conclusion a également pu être mise en évidence par d'autres études (Gogniat *et al.*, 2006; Carré *et al.*, 2014; Yemmireddy *et al.*, 2015). Sous rayonnement UV-A, les dommages de la membrane d'*E. coli*, ont été observés par microscopie électronique par transmission. Ces dommages sont à l'origine de la perte de cultivabilité de la souche. Les attaques répétitives des EROs mènent ensuite à la perte des fonctions de la membrane ce qui conduit à la lyse de la cellule et donc sa mort.

Sunada et ses collaborateurs ont utilisé le modèle bactérien *E. coli* et des sphéroplastes, des cellules d'*E. coli* sans paroi afin de mettre en évidence les mécanismes de l'action de la photocatalyse au TiO₂ (Figure 18). Sur les cellules intactes, le mécanisme d'effet bactéricide est composé de deux phases, la première avec un faible taux de mortalité et la seconde avec un taux de mortalité bien plus important. Grâce aux tests effectués, les auteurs mettent en évidence un taux de mortalité constant et plus important qu'avec les cellules intactes pendant l'illumination. Cette étude permet de souligner que la première étape dans l'effet bactéricide du TiO₂ photoactivé est l'attaque de la membrane externe. Lorsque cette dernière est endommagée alors le processus s'accélère et la mort cellulaire intervient, comme l'illustre la figure 16 (Sunada *et al.*, 2003). Cette désorganisation de la membrane plasmique serait à l'origine d'une perte de l'activité respiratoire qui conduit à la mort cellulaire (Maness *et al.*, 1999).

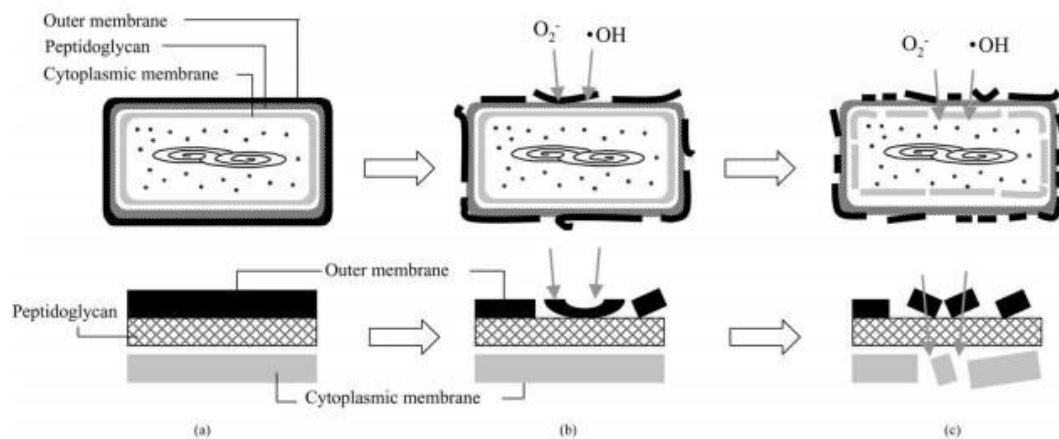


Figure 18 : (a-c) Schéma permettant d'illustrer le mécanisme d'effet bactéricide sur *E. coli* et sa membrane cytoplasmique, (d'après Sunada et al., 2003).

Ces mêmes conclusions ont été observées sur le modèle eucaryote *S. cerevisiae*. Cependant, les auteurs indiquent que cette levure avec une membrane, même endommagée, possède une activité métabolique. Cela suggère que les dommages de la membrane n'entraînent pas immédiatement la perte de l'activité enzymatique de la cellule et donc la mort cellulaire. Les cellules eucaryotes, contrairement aux bactéries, possèdent une fonction respiratoire compartimentée au sein de leurs mitochondries. Ces organites cellulaires sont eux-mêmes protégés par une double membrane composée de lipides et de protéines. Alors que la chaîne respiratoire membranaire des bactéries est impactée directement par l'action des EROs, la fonction respiratoire des cellules eucaryotes peut être conservée pour certaines cellules qui sont dans un état transitoire avant la mort cellulaire (Thabet *et al.*, 2013).

Le stress oxydatif et la présence d'EROs entraînent la peroxydation des lipides et perturbent la membrane des bactéries. Les produits de la peroxydation lipidique sont capables d'inactiver de nombreuses protéines par la modification de leur structure (Cabiscot, 2000).

b. Dommages aux protéines

Lorsque les protéines sont exposées à des EROs, leur structure est altérée par des modifications de la chaîne des acides aminés. Il en résulte une oxydation du squelette carboné des protéines et la structure en est altérée. Ces modifications perturbent le métabolisme cellulaire. En effet, les protéines ont un rôle primordial dans le métabolisme cellulaire que cela soit au niveau structurel de la bactérie ou au niveau fonctionnel.

Les principales modifications des protéines entraînent la perte de l'activité catalytique, des modifications au niveau des acides aminés, la diminution de la stabilité thermique, des

changements dans la viscosité, la fluorescence, la fragmentation et la formation de ponts disulfures. Tous ces phénomènes amènent à une augmentation de la protéolyse.

G. Carré, dans ses travaux de thèse, a montré que chez *E. coli*, les protéines modifiées par la présence du TiO_2 , sont de nature très hétérogène et possèdent des fonctions diverses. Les modifications touchent à la fois des protéines membranaires comme des porines, mais également des protéines chaperonnes. D'autres protéines modifiées sont liées au métabolisme et au transport de différentes molécules (ions, lipides, sucres ou acides aminés). Les altérations ne sont donc pas spécifiques. Cependant, il est possible que les cibles des EROs sont des protéines impliquées dans la réponse au stress en général et plus particulièrement au stress oxydatif (Carre, 2013).

Les acides aminés soufrés semblent être les plus touchés, la cystéine et la méthionine particulièrement. Il y a alors formation d'acides sulfiniques et sulfoxides de méthionine respectivement (Cabisco, 2000; Arts *et al.*, 2015). Il semble également que des ponts disulfures soient générés dans les protéines présentes dans le cytoplasme lors du stress oxydatif. Il est possible de parler de « stress disulfure » (Cabisco, 2000).

L'accumulation des protéines oxydées représente un danger pour la cellule. Il est nécessaire que la cellule puisse éliminer les molécules altérées. La cellule effectue des réparations si les modifications sont réversibles, ou des dégradations si elles sont irréversibles.

c. Dommages aux acides nucléiques

Les EROs générés par la photocatalyse sont capables d'oxyder les composants membranaires et cytoplasmiques comme les lipides et les protéines, mais aussi les acides nucléiques, ADN ou ARN (Gogniat et Dukan, 2007; Pigeot-Rémy *et al.*, 2011; Carré, 2013).

Différentes modifications des acides nucléiques existent. Elles impliquent la dégradation des bases, des cassures des brins d'ADN, la modification de bases par l'apparition de dimères (Birben *et al.*, 2012). Gogniat et Dukan ont montré que suite au stress oxydatif, généré par le TiO_2 photoactivé, les acides nucléiques, ADN ou ARN sont endommagés par l'apparition de dimères de pyrimidines. Ces dimères provoquent des altérations de la structure tridimensionnelle des molécules d'ADN. Les radicaux hydroxyles sont impliqués dans les dommages de l'ADN *via* la photocatalyse. Ainsi les mécanismes de réplication cellulaire vont subir des dysfonctionnements entraînant la mort cellulaire (Gogniat et Dukan, 2007). Les régions promotrices des gènes possèdent des séquences reconnues par des facteurs de transcription. Ces séquences de reconnaissance sont riches en GC. Ces bases sont susceptibles au stress oxydant. Cela implique des changements dans l'expression de certains gènes liés à la région promotrice.

La conséquence de ces dommages est la lyse cellulaire. Cette lyse, due à la modification de la membrane cellulaire et le relargage de différents composés, est suivie de la minéralisation complète des composés cellulaires restants. Dans ce cas, il ne reste que du CO₂, de l'eau et des minéraux.

L'activité photocatalytique est également à l'origine du relargage de certaines molécules, et notamment des ions potassium mais aussi des protéines et des acides nucléiques dans le milieu extracellulaire. Ces éléments relargués hors de la cellule représentent une source de nutriments pour les microorganismes qui survivent au stress de la photocatalyse.

Stress généré par la photocatalyse

-

V. Mécanismes de réponse au stress généré par le TiO₂

Les cellules bactériennes disposent de différentes stratégies, notamment antioxydantes afin de contrer l'action de la photocatalyse et de prévenir des dommages du stress oxydant.

Parmi ces stratégies, les cellules possèdent des gènes codants pour des enzymes de détoxification des EROs comme la superoxyde dismutase, la catalase, la peroxydase, ou de gènes impliqués dans la réparation de l'ADN (Suo *et al.*, 2014).

A.

der Veen et Abee, 2011). L'exposition aux UV semble également protéger les bactéries face à un stress dû au peroxyde d'hydrogène, aux acides, à l'éthanol ou encore aux traitements thermiques. L'un des stress responsable de l'altération des acides nucléiques, autre que les rayonnements UV, est l'exposition à des agents oxydants comme le peroxyde d'hydrogène.

Le système SOS regroupe un ensemble de gènes (environ une trentaine). Ils sont impliqués dans la réplication de l'ADN, dans sa réparation et dans la division cellulaire. Son expression est contrôlée par une altération de l'ADN. Les différents gènes qui participent au système SOS forment un régulon. Ce système fait intervenir les protéines RecA et LexA ainsi que les gènes codants pour ces protéines, *recA* et *lexA* respectivement. Lorsque les lésions sur l'ADN sont importantes et nombreuses, la synthèse de l'ADN est stoppée. Des zones monocaténares apparaissent. Ce sont ces zones qui sont reconnues par l'enzyme de réparation et de recombinaison RecA. RecA est capable d'hydrolyser la protéine LexA, represseur des gènes SOS. Le déclenchement du système SOS permet la reprise de la réplication. Cependant, la réplication perd sa fidélité. La cellule, de manière temporaire, suspend la réplication fidèle au profit de la viabilité (Van der Veen et Abee, 2011).

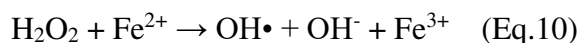
Le système SOS est induit dans la réponse à différents stress, notamment le stress oxydatif. Goerlich et ses collaborateurs ont montré grâce à des mutants de *E. coli* pour différents gènes impliqués dans le système SOS que ce système était induit par le stress du peroxyde d'hydrogène. Les UV sont également responsables de dommages conséquents sur les acides nucléiques ce qui entraîne l'induction du système SOS (Goerlich *et al.*, 1989; Van der Veen et Abee, 2011).

B. Prévention des EROs

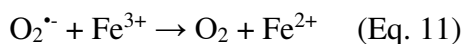
1. Gestion du fer

Les bactéries ont besoin de fer afin de maintenir leur métabolisme. Il est essentiel dans la défense contre le stress oxydant. Les enzymes antioxydantes requièrent un cofacteur pour maintenir leur activité catalytique. Cependant lorsque le fer est présent en forte concentration, sous forme réduite, il possède une action pro-oxydante *via* différentes réactions. Il s'agit du « paradoxe du fer », entre son rôle vital et sa forte toxicité. L'homéostasie du fer est primordiale. Les bactéries utilisent différentes stratégies pour assurer cette homéostasie. Il existe des transporteurs à haute affinité pour le fer, des systèmes pour le stocker lorsqu'il est absent, la bactérie est également capable de diminuer sa consommation du fer.

Le fer est impliqué dans la réaction de Fenton (Imlay, 2013). Selon cette réaction, l' H_2O_2 se décompose, en présence d'ions ferreux (Fe^{2+}), en un ion OH^- et un radical hydroxyle (Eq. 10).



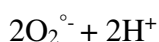
Lorsque les ions ferreux ne sont plus disponibles, la réaction s'interrompt. Cependant, si des anions superoxydes sont présents alors le Fe^{3+} est régénéré en Fe^{2+} selon la réaction d'Haber-Weiss (Eq. 11). La présence simultanée de peroxyde d'hydrogène, d'anion superoxyde et de fer permet la production de radical hydroxyle.



La bactérie doit être capable de gérer la quantité de fer et son stockage dans le cytoplasme. Bien que le fer extracellulaire représente une source de fer, de nombreuses bactéries possèdent des réserves intracellulaires. Elles utilisent des protéines capables de stocker le fer et protègent également les bactéries de la toxicité du fer en forte concentration. Ces protéines sont les ferritines, les bactérioferritines et les protéines DP (Calhoun et Kwon, 2011; Karas *et al.*, 2015). C'est grâce à l'architecture de ces protéines, qu'elles sont capables de stocker le fer. Les protéines DP sont capables de lier le fer. Elles possèdent un rôle plus large que celui du stockage. Elles semblent jouer un rôle essentiel dans la survie des cellules face à différents stress (Dumas, 2007). Chez *E. coli*, le régulon OxyR induit la formation de protéines DP ainsi que de la formation de MntH permettant d'apporter du manganèse à la cellule nécessaire pour l'activité d'enzyme de détoxification (Imlay, 2013). Contrairement à *E. coli*, *L. monocytogenes* ne possède pas de bactérioferritines ni de ferritine. Elle possède cependant le gène *fri* codant pour une protéine du type DP (Suo *et al.*, 2014).

2. Superoxyde dismutase

La superoxyde dismutase (SOD) est une enzyme clé permettant la défense de la bactérie face au stress oxydatif à la fois chez les bactéries et les cellules eucaryotes. Elle est capable de catalyser la dismutation des anions superoxydes. Il a également été montré que la SOD pouvait réduire l'effet bactéricide de la photocatalyse du TiO_2 (Chorianopoulos *et al.*, 2011). La dismutation des anions superoxydes génère du peroxyde d'hydrogène et du dioxygène (Eq.12).

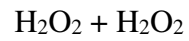


conditions de stress oxydatif. Cependant, leur capacité à croître et former des biofilm est diminuée.

Les bactéries anaérobies strictes ne possèdent pas cette enzyme.

3. Catalase

La catalase est une enzyme présente en forte concentration dans les cellules. Cette enzyme permet la dismutation du peroxyde d'hydrogène en eau et en dioxygène (Eq. 13).



Mécanismes de réponse à la photocatalyse

- **Réparation des acides nucléiques**

Chapitre II :

Matériels et Méthodes

I.	Introduction	58
II.	Obtention des couches minces	58
A.	<i>Pulvérisation cathodique radio-fréquence</i>	58
1.	Description du bâti de pulvérisation	58
2.	Préparation des échantillons	59
3.	Conditions de dépôts.....	60
III.	Caractérisation des couches minces	61
A.	<i>Caractérisation optique et physique</i>	61
1.	Morphologie et épaisseur de la couche mince	61
2.	Détermination du band-gap (E_g).....	64
3.	Phase cristalline du TiO_2	65
B.	<i>Test de décoloration du bleu de méthylène</i>	66
C.	<i>Effet antibactérien</i>	67
IV.	Détection et dosage des EROs	69
A.	<i>Peroxyde d'hydrogène H_2O_2</i>	69
B.	<i>Anions superoxydes $O_2^{\bullet -}$</i>	70
C.	<i>Radicaux hydroxyles $\bullet OH$</i>	70
V.		

I. Introduction

Ce chapitre a pour but de décrire la méthodologie mise en place pour la réalisation des expériences et les différentes techniques employées au cours de cette thèse. Il se décline en trois grands axes :

- le premier porte sur la méthode utilisée pour l'obtention des couches minces, c'est-à-dire la pulvérisation cathodique radio-fréquence.
- Le deuxième porte sur la méthode utilisée pour caractériser des différentes couches minces déposées.
- Enfin, le troisième concerne les techniques d'analyse du stress généré par les couches minces, y sont décrits les protocoles développés pour la détection et le dosage des espèces réactives de l'oxygène.

II. Obtention des couches minces

Dans cette première partie, la méthode d'obtention des couches minces sera décrite dans le but de préciser les différents paramètres sur lesquels il est possible d'intervenir pour optimiser les couches minces. La méthode est la pulvérisation cathodique radio-fréquence. Cette méthode permet de déposer une fine couche appelée couche mince à la surface d'un substrat.

A. Pulvérisation cathodique radio-fréquence

L'appareil utilisé pour le dépôt des couches minces est un bâti de pulvérisation. Dans le cadre de cette thèse, c'est le bâti de pulvérisation cathodique RF (Plassys MP 450S) fabriqué par la société Plassys, qui a servi au dépôt des couches minces.

1. Description du bâti de pulvérisation

Il est constitué d'un sas de transfert qui permet de maintenir la pression dans l'enceinte. Ce sas contient également le dispositif qui permet d'insérer le substrat. Ce système est en inconel, afin de supporter la température et la pression dans l'enceinte. L'enceinte de pulvérisation et un rack de commande permettent les dépôts (Figure 20).

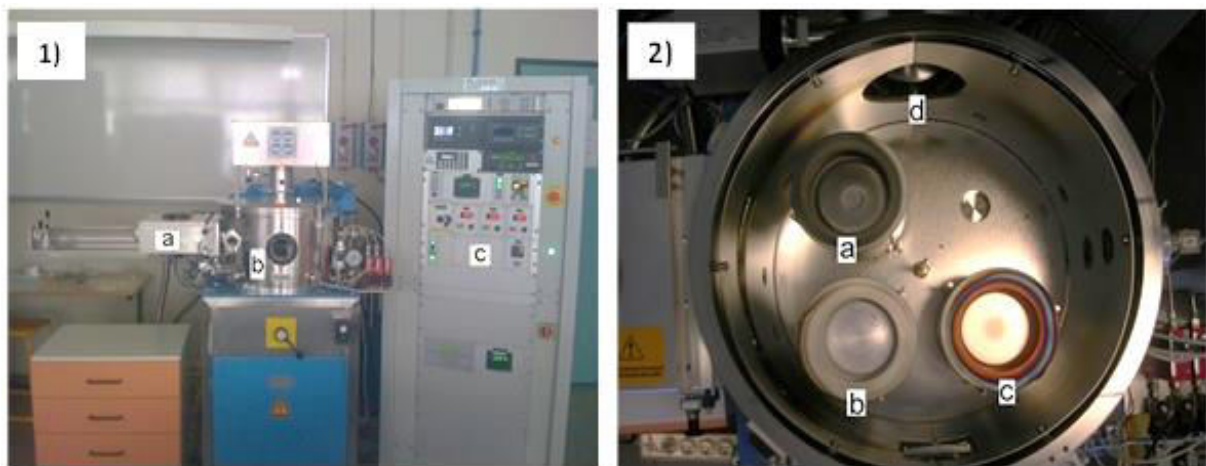


Figure 20 : 1) Bât de pulvérisation cathodique RF (Plassys 450S). a. Sas de transfert; b. Enceinte de dépôt; c. Rack de commande. 2) Vue de l'enceinte du bâti de pulvérisation et ses trois cibles, a. Titane; b. Argent; c. Cuivre; d. Bride de pompage.

À l'intérieur de l'enceinte de pulvérisation se trouvent trois cibles qui permettent de réaliser des dépôts de couches minces de différentes compositions. Ces trois cibles sont : une cible de titane (99,995% de pureté), une cible d'argent (99,999% de pureté) et une cible de cuivre (99,995% de pureté). Trois lignes de gaz sont également reliées à l'enceinte de pulvérisation. La première est liée à une bouteille d'argon (99,9999% de pureté), la deuxième est liée à l'oxygène (99,9995% de pureté), la dernière est liée à une bouteille qui contient un mélange d'argon et d'oxygène (0,5% en moles d'oxygène et 99,9995% de pureté).

2. Préparation des échantillons

a. Verre de type sodocalcique

Le premier substrat testé est un verre de type sodocalcique (Verre Industrie, France). Les substrats de verre ont pour dimensions 50,8 mm * 50,8 mm * 0,7 mm. Afin d'obtenir des dépôts de couches minces de qualité, la surface du substrat doit être propre. La présence d'impuretés peut être à l'origine du développement de défauts lors du dépôt. La méthode de nettoyage est la suivante :

- Un prénettoyage permet la suppression des défauts les plus grossiers. Un papier imbibé d'acétone est passé à la surface du substrat afin d'éliminer les traces de doigt ou les éclats de verre.
- Le nettoyage permet ensuite d'éliminer les traces plus fines. Pour cela, les échantillons sont placés sur un porte substrat et plongés dans une solution alcaline à 60°C contenant du RBS 25 pendant 15 minutes. Les substrats sont rincés à l'eau

déminéralisée, sous un flux à débordement, pendant 10 minutes. Enfin, les substrats sont rincés à l'eau ultrapure 5 fois.

- Le séchage est réalisé sous flux d'azote sec afin de rendre les échantillons prêts pour le dépôt.

b. Acier inoxydable AISI 316

Les substrats d'acier inoxydable AISI 316 de dimensions 50 mm*50 mm*0,5 mm, sont découpés dans des feuilles d'acier de dimensions 300 mm*300 mm (GoodFellow, Angleterre). La taille des substrats doit être adaptée aux dimensions du porte substrat du bâti de pulvérisation. Une fois les échantillons découpés, ils sont préparés avant de déposer les couches minces de TiO₂. Une fois encore, la propreté et l'absence d'impureté de la surface du substrat représentent un facteur clé dans l'obtention d'une couche mince de qualité.

Les échantillons d'acier inoxydable subissent également un processus de nettoyage. Une première étape de dégraissage est réalisée afin d'éliminer les traces de doigt déposées sur les substrats. Pour cela, les substrats sont plongés directement dans un bain d'acétone. Cet ensemble substrat/acétone présenté dans un bécher est déposé dans un bain à ultrasons pendant 10 minutes. Les échantillons sont ensuite rincés sous un flux à débordement d'isopropanol, puis placés dans un bécher contenant de l'isopropanol. Ce bécher est placé dans le bain à ultrasons pour deux cycles de 10 minutes. Cette étape permet à la fois d'éliminer les traces d'acétone mais aussi les derniers résidus pouvant se trouver à la surface du substrat. Enfin les échantillons sont séchés sous un flux d'azote sec. Ils peuvent ensuite être utilisés pour les dépôts. Les autres échantillons sont conservés, isolés les uns des autres, dans un dessiccateur afin de limiter la présence d'humidité.

3. Conditions de dépôts

Le tableau 4 regroupe les différents paramètres d'utilisation du bâti de pulvérisation. Dans un premier temps, l'échantillon doit être thermalisé. Pour cela, l'échantillon chauffé est maintenu à la température cible pendant 30 minutes afin de rendre la surface du substrat homogène en température. Ensuite, une étape est nécessaire pour nettoyer la cible de titane et permettre un dépôt sans impureté. Il s'agit de l'étape de prépulvérisation.

Pour le dépôt de la couche mince, une forte différence de potentiel est appliquée entre une anode (le substrat) et une cathode (la cible). Le gaz alors présent dans l'enceinte (Argon) est ionisée car un électron est arraché de l'atome. Ainsi, le plasma est créé. Les ions argons Ar⁺ sont accélérés par la différence de potentiel et pulvérisent la cible. Ainsi, des atomes de titane sont expulsés de la cible et peuvent être oxydés par la présence de dioxygène dans

l'enceinte. La cible est alimentée par un générateur électrique, dont il est possible de modifier la puissance (Puissance RF), auquel est attribuée une radio-fréquence à 13,56Mhz.

Tableau 4 : Paramètres de prépulvérisation et pulvérisation.

	PRÉPULVÉRISATION	PULVÉRISATION
Paramètres	Valeurs	Valeurs
Puissance RF	50 W	200 W
Débit de dioxygène (d _{O2})	0 sccm	Variable

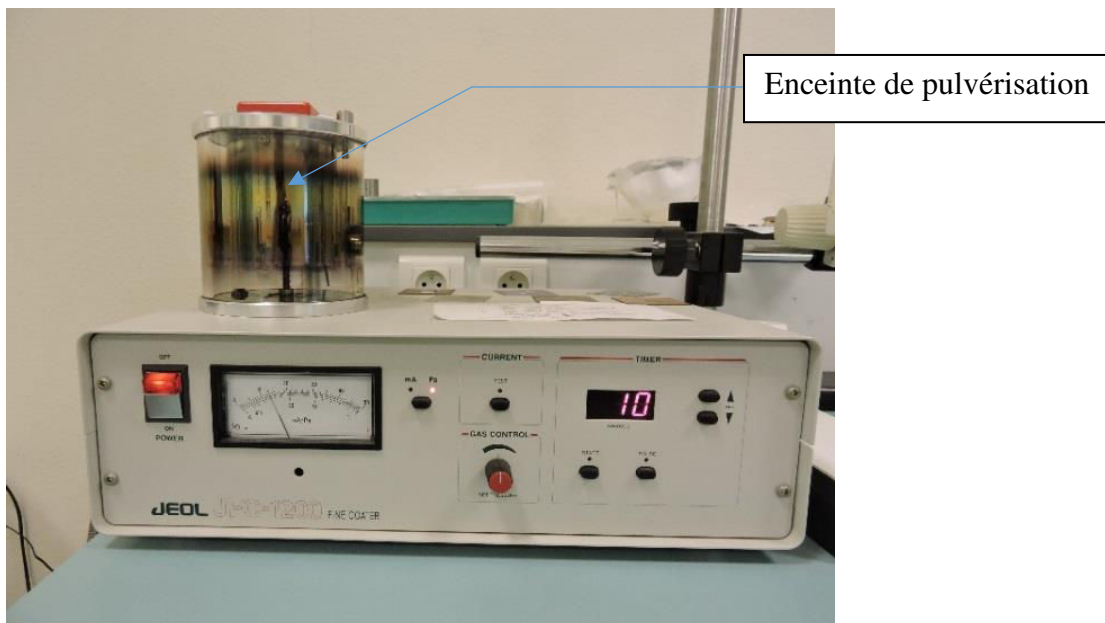


Figure 21 : Bâti de métallisation

Pour la métallisation, les coupons sont placés dans une enceinte sous vide. Grâce à un plasma, des ions Ar^+ pulvérisent une cible d'or, ce qui permet le transfert d'or sur la surface des coupons pour y former une couche très fine. Cette fine couche mince d'or permet d'éviter l'accumulation de charges à la surface et ainsi les observations sont rendues possibles. Une fois le vide installé, la durée de métallisation est fixée à 10 secondes.

b. Microscope électronique à balayage

Le microscope électronique à balayage JEOL JSM 5600 permet de visualiser la morphologie de surface des différents coupons. Les paramètres d'utilisation du MEB sont fixés afin de rendre comparables les observations effectuées.

Au niveau du microscope, un faisceau d'électron est généré par un canon à électrons sous haute tension (Figure 22). Un système de diaphragmes et de lentilles magnétiques permet de traiter ce faisceau afin qu'il balaye le coupon à observer. L'image obtenue se crée par la somme de petites images de la taille du spotsize. Ce spotsize correspond à la surface véritablement éclairé par le faisceau d'électrons. Les électrons incidents pénètrent dans l'échantillon et entrent en interaction avec la matière. Les échantillons sont placés dans une enceinte sous vide. Cela permet d'éviter les interactions entre les particules gazeuses dans l'enceinte et les électrons. De cette manière, la présence de signaux parasites est limitée.

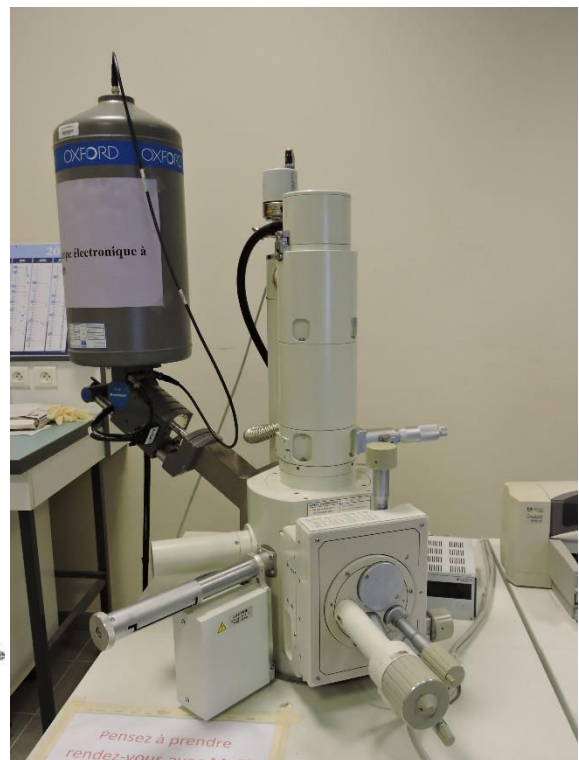
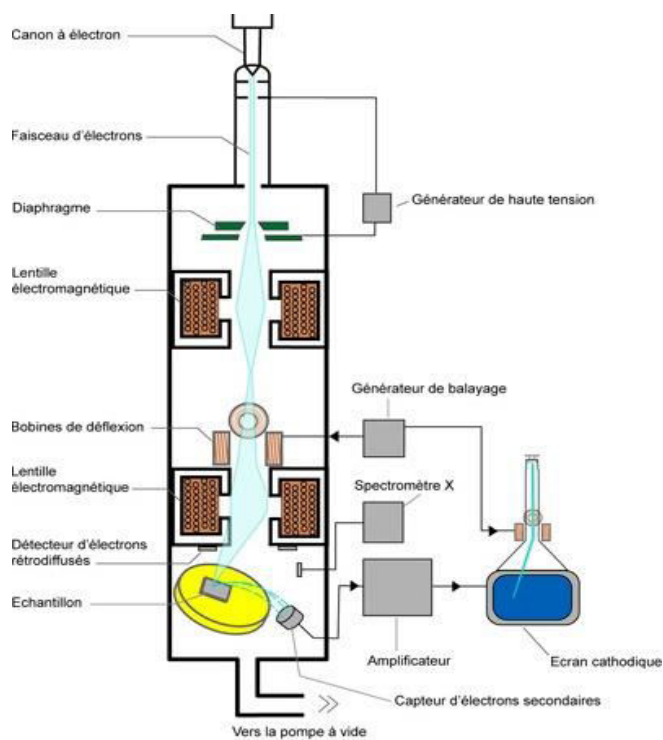


Figure 22 : Microscopie électronique à balayage JEOL JSM 5600 et description de l'appareil

Lorsque les observations portent sur la morphologie de surface de la couche mince, les échantillons sont déposés, face active sur le dessus, sur un porte-échantillon (Figure 23A.). Lorsque les observations concernent l'évaluation de l'épaisseur, les coupons sont placés sur la tranche (Figure 23B).

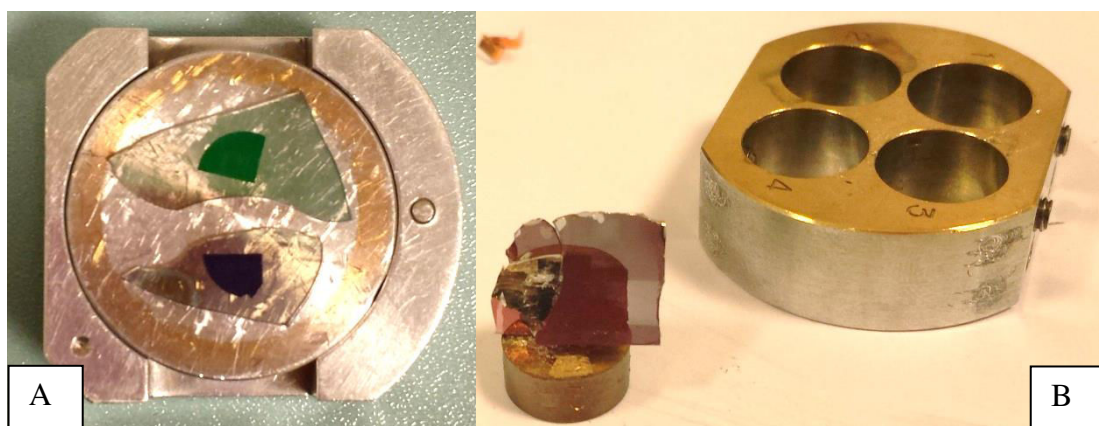


Figure 23 : Porte-échantillon pour MEB. A. Observation de surface, B. Mesure de l'épaisseur.

Les paramètres d'observation sur le MEB qui ont été utilisés pour l'ensemble des couches minces synthétisées sont :

- une tension haute de 10 kV
- un spotsize de 20
- une distance d'observation maintenue à 10 mm.

2. Détermination du band-gap (E_g)

Le spectrophotomètre, Perkin Elmer Lambda 20, a été utilisé afin de caractériser la transparence optique des couches minces déposées. L'obtention d'un spectre de transmittance, de 200 nm à 1100 nm est nécessaire pour le calcul de la largeur du band-gap (E_g). L'analyse du bord d'absorption dans les UV proches, autour de 360-370 nm, permet la mesure de ce band-gap.

La méthode de calcul diffère en fonction de la nature du band-gap, direct ou indirect (Figure 24). Dans le cas du TiO_2 , le gap est indirect. Il est strictement indirect pour la forme anatase du TiO_2 . Pour les formes brookite et rutile, certains auteurs ont montré que le gap pouvait être direct et indirect (Valencia *et al.*, 2009; Zhang *et al.*, 2014).

Figure 24 : Structure de bande schématisée d'un semi-conducteur à gap direct (a) et à gap indirect (b), avec E (énergie), k (vecteur d'ondes), E_g (valeur du band-gap).

Dans notre cas où le gap est indirect, le calcul est basé sur la transmittance de l'échantillon de TiO_2 :

Le coefficient d'absorption (

plans sont séparés par une distance caractéristique ou distance réticulaire. Les interférences peuvent être alors constructives ou destructives (Serna, 2014).

Les directions dans lesquelles les interférences sont constructives, appelées pics de diffraction, peuvent être déterminées par la loi de Bragg où d est la distance interréticulaire,

mesurée à 650 nm (Biomate). Les valeurs mesurées permettent alors de calculer le ratio

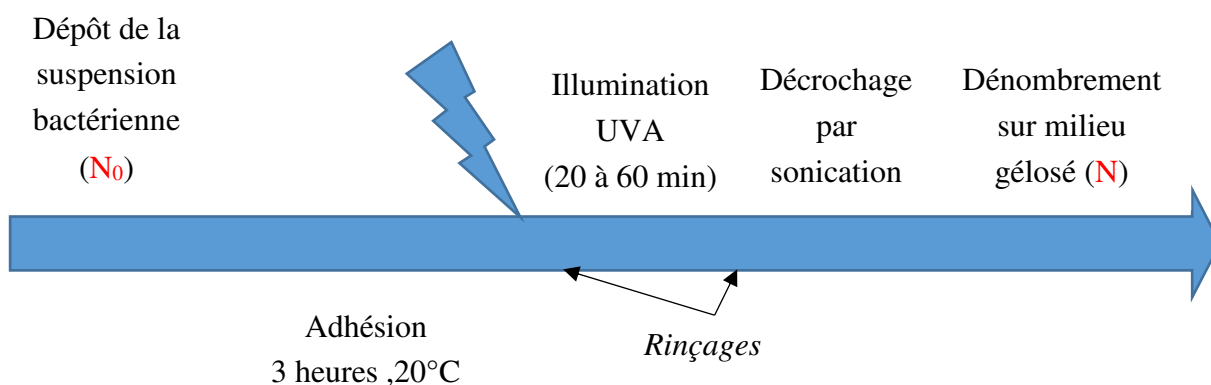


Figure 26 : Schéma des étapes d'un test d'effet antibactérien sur coupons.

Les différents coupons doivent être stérilisés avant d'être utilisés pour les tests d'effet antibactérien. Pour cela, les coupons sont placés dans un bain de détergent, le TFD4 dilué à 5% dans de l'eau stérile. L'ensemble est déposé dans un bain à ultrasons (Branson Ultrasonic Cleaner 3210-fréquence 47 kHz, BRANSON) durant 60 minutes. Après cela, les coupons sont rincés 4 fois dans des bains successifs d'eau ultrapure stérile. Les coupons sont placés dans un dernier bain d'eau ultrapure stérile et à nouveau déposés dans le bain à ultrasons pendant 60 minutes. Les coupons sont ensuite séchés sous le flux d'une hotte à flux laminaire avant de pouvoir être utilisés.

La suspension bactérienne est calibrée à une concentration de 10^8 UFC/mL *via* la mesure de l'absorbance à 600 nm. 50 μ L de cette suspension sont déposés à la surface des coupons. Cela représente N_0 avec une quantité de cellules égale à $5 \cdot 10^6$ UFC. Les bactéries peuvent ensuite adhérer au coupon durant 3 heures à 20°C. Cette étape est réalisée dans une enceinte humide afin d'éviter les phénomènes de déshydratation. À la fin de cette étape d'adhésion, les coupons sont rincés avec de l'eau physiologique pour permettre d'éliminer les bactéries non adhérentes. Une partie des coupons est ensuite conservée à l'obscurité (Témoins). L'autre partie des coupons est placée sous illumination UVA pendant 20 à 60 minutes en fonction des tests. Après de nouveaux rinçages en eau physiologique, les bactéries encore adhérentes au coupon sont décrochées par sonication (20 minutes). Pour cela, chaque coupon est placé dans un tube contenant de l'eau physiologique. Les tubes sont ensuite déposés dans un bain à ultrasons (Branson Ultrasonic Cleaner 3210-fréquence 47 kHz, BRANSON). Une fois la sonication effectuée, les coupons sont retirés des tubes et les suspensions sont alors déposées sur milieu gélosé adapté à la souche testée afin de les dénombrer.

Le résultat du dénombrement permet d'obtenir le nombre N, c'est-à-dire la quantité de cellules adhérentes. Afin de visualiser l'effet antibactérien des couches minces, des graphiques représentant le logarithme du rapport entre N et N_0 sont tracés. Ainsi, il est

possible de lire directement sur le graphique la diminution en log de la population bactérienne adhérente.

IV. Détection et dosage des EROs

L'activité photocatalytique est due en partie à la production d'EROs après illumination sous les UV du TiO_2 . L'objectif, ici, est de décrire les méthodes utilisées pour la détection et/ou le dosage des différentes EROs.

A.

B. Anions superoxydes O_2^-

rapide de la suspension bactérienne. Après séchage des gouttelettes sur le milieu à température ambiante, les géloses inoculées sont exposées sous UVA pendant 15 minutes (Figure 28). Ces géloses sont incubées à la température adéquate pendant 24 heures. La lecture après incubation consiste à vérifier la pousse de la bactérie au point des dépôts. Le nombre de pousse par série de dilution permet de classer les souches en fonction de leur niveau de sensibilité aux UVA.

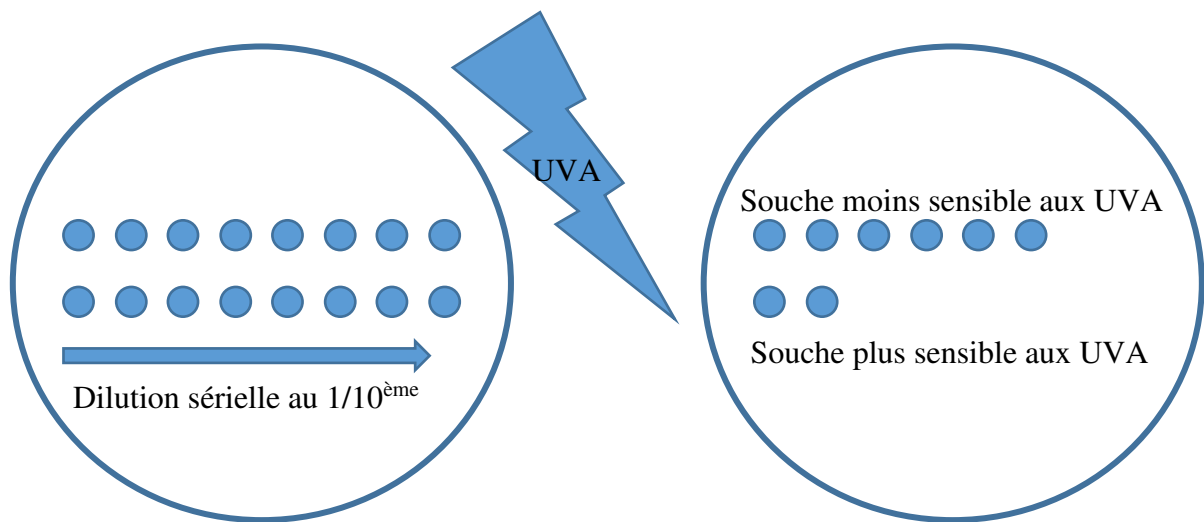


Figure 28 : Méthode de micro-dépôts pour l'étude de l'effet létal des UVA.

B. CMI

L'objectif est de reproduire l'effet du stress oxydatif sur les bactéries dans les conditions de laboratoire. La technique employée repose sur le test de CMI, concentration minimale inhibitrice, et consiste à mettre en contact la bactérie en série de dilution au $\frac{1}{2}$ avec une solution de peroxyde d'hydrogène à 3% (Figure 29).

La série de dilutions de la bactérie est réalisée dans un milieu deux fois concentré pour qu'une fois mise en contact avec la solution de peroxyde d'hydrogène le milieu de culture soit à la concentration adéquate. Le milieu de culture des CMI est celui qui est adapté à la souche bactérienne testée. Le test CMI est réalisé en microplaques où les puits contiennent la suspension bactérienne en série $\frac{1}{2}$ et la solution de peroxyde d'hydrogène à la concentration souhaitée. Les microplaques sont ensuite placées en incubation pendant 24h et lecture de l'absorbance de la microplaque est réalisée à 600nm. Un puit contient le milieu de culture et le peroxyde sans bactérie ; ce témoin est primordial. En effet le peroxyde d'hydrogène a pour effet de décolorer le milieu de culture si celui-ci est coloré, ce qui peut avoir un impact sur la mesure d'absorbance.

La valeur d'absorbance à 600 nm des échantillons inoculés est comparée avec un témoin positif de culture dans le milieu de culture ne contenant pas d'H₂O₂. La CMI correspond à la plus petite concentration en H₂O₂ nécessaire pour inhiber la croissance de la bactérie. Ce test a été réalisée sur les mêmes souches que celles dans la partie A.

C.

la phase aqueuse avant le mélange et cela permet d'accéder au pourcentage d'adhésion des bactéries à l'hydrocarbure.

Le test de MATS comme son nom l'indique n'utilise pas d'hydrocarbures mais bien des solvants. Il a pour but de mesurer les propriétés acido-basiques des interfaces microbiennes en comparant l'affinité des bactéries pour différents solvants. Il est réalisé en présence de solvants monopolaires (accepteur ou donneur d'électrons), et de solvants apolaires. Dans ce test, l'adhésion des bactéries est considérée comme le résultat des interactions électrostatiques, de van der Waals et des caractéristiques donneur-accepteur d'électrons. Ainsi il est possible de déterminer les propriétés hydrophobes/hydrophiles et acide/base de Lewis, de parois bactériennes. Cette technique ne nécessite pas de matériel spécifique.

Pour la méthode utilisée, quatre solvants sont nécessaires :

- Le chloroforme (C), solvant accepteur d'électrons au sens de Lewis,
- L'acétate d'éthyle (AE), solvant donneur d'électrons au sens de Lewis,
- L'hexadécane (HD), solvant hydrophobe et apolaire
- Le décane (D), solvant hydrophobe et apolaire.

En parallèle, il est nécessaire d'avoir la culture bactérienne à tester sous forme de suspension liquide, calibrée à 0,8 unité d'absorbance à 400 nm. Trois répliques par solvant sont nécessaires. Dans un tube sont ajoutés 2,4 mL de suspension bactérienne à 0,4 mL de solvant. Le tube est ensuite bouché et vortexé pendant 2 minutes. Après un temps de repos de 15 minutes, sans aucune vibration, la phase aqueuse est récupérée grâce à une pipette Pasteur. Il est primordial de ne pas remélanger les phases. L'absorbance de la phase récupérée est mesurée à 400 nm (Figure 30).

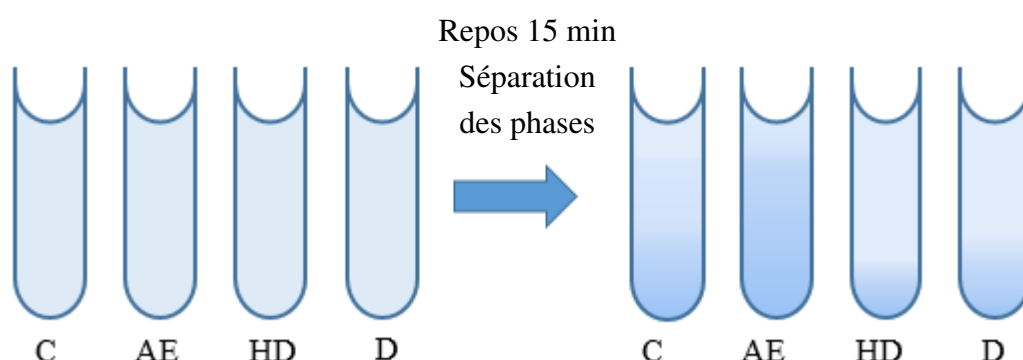


Figure 30 : Schéma représentant le test de MATS.

Les valeurs sont notées A_i pour la valeur d'absorbance du témoin sans solvant et A pour l'absorbance de la phase aqueuse prélevée dans les tubes avec solvant. Le résultat est exprimé par le pourcentage d'adhésion des bactéries aux solvants selon l'équation :

% d'adhésion

expérimentale, car toutes les réactions se produisent dans le même tube. Les ARN sont moins susceptibles d'être dégradés car les étapes sont réduites. Le faible nombre de pipetage limite également la contamination des échantillons.

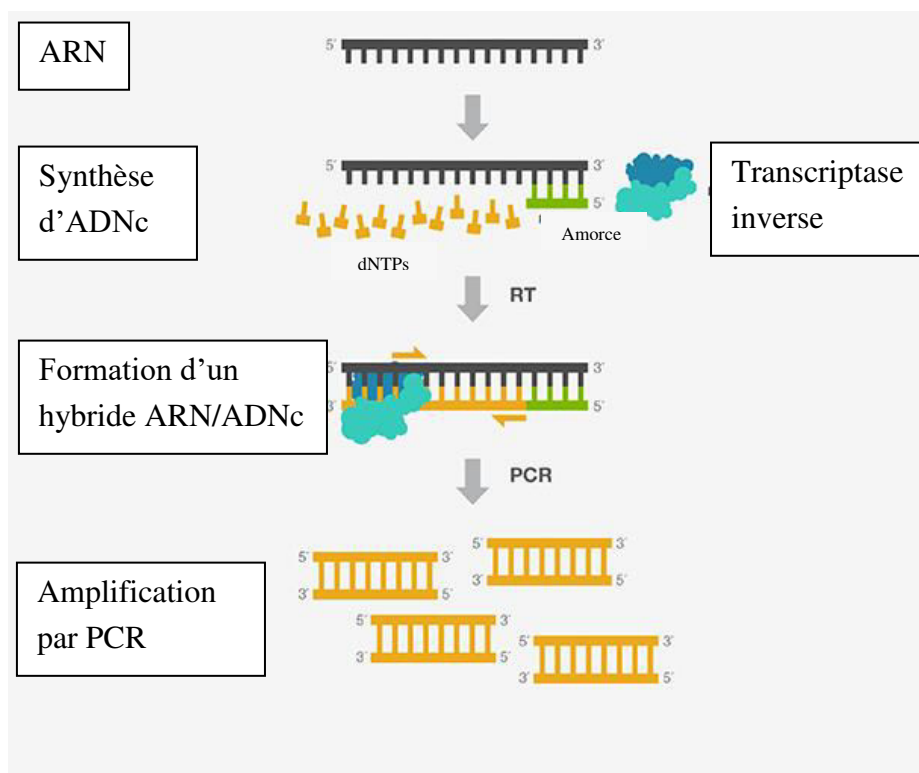


Figure 31 : Principe de RT-PCR à partir d'ARN matrice.

La première étape est d'obtenir un extrait d'ARN de qualité. Pour cela, le kit utilisé est le MasterPure RNA Purification Kit (Epicentre®). Les premiers tests ont été réalisés à partir de culture de nuit (18h) en milieu liquide de bactéries.

De cette culture sont prélevés 500 µL et une centrifugation de 8000 g pendant 10 min permet de culoter la culture. Selon le protocole du fournisseur, le culot bactérien est repris dans 300 µL de solution de lyse (Tissue and Cell Lysis Solution) contenant 50µg de protéinase K. Cette enzyme est activée par une incubation à 65°C pendant 15 minutes, ce qui permet la lyse des cellules. L'étape suivante consiste à faire précipiter tous les acides nucléiques. Pour cela, 175µL de la solution de précipitation des protéines (MPC Protein Precipitation Reagent) sont ajoutés au lysat, et le mélange est vortexé. Une centrifugation de 10 minutes à 4°C à une vitesse supérieure à 10 000g permet d'éliminer les débris cellulaires. Le surnageant est repris dans un tube propre (garanti sans RNase). Puis, 500µL d'isopropanol sont ajoutés et mélangés par inversion au surnageant. Les acides nucléiques (ARN et ADN) sont récupérés par centrifugation toujours dans les mêmes conditions. L'isopropanol est éliminé avec précaution.

Afin de ne récupérer que les ARNs, l'ADN est éliminé en utilisant de la DNase. L'enzyme est de la DNase I 5µg/µL fournie directement dans le kit avec son tampon de réaction. La réaction a lieu à 37°C pendant 30 minutes. Après cette incubation, l'activité de la DNase est stoppée en ajoutant 200µL de solution de lyse et 200µL de solution de précipitation des protéines (MPC 2X). Après vortex pendant 10 secondes, le mélange est centrifugé (10 min – 4°C). Le surnageant contenant les ARNs est repris et 500µL d'isopropanol sont ajoutés et mélangés par inversion. Après centrifugation (10 min – 4°C), l'isopropanol est retiré. Le culot d'ARN est ensuite rincé avec de l'éthanol à 70%, deux fois avec 200 µL. Les ARNs sont ensuite suspendus dans 35 µL de tampon TE (Tris-EDTA, à x µM, pH y) contenant l'inhibiteur de RNase, le RiboGuard™. Les solutions d'ARN sont directement utilisées pour les RT-PCRq ou bien conservées à -74°C.

Les réactions de RT-PCRq sont réalisées avec le kit One-Step SYBR® Green Quantitative RT-qPCR fourni par Sigma Aldrich. Ainsi, il permet de réaliser en un seul tube la réaction de transcription inverse et la PCR. Le mélange réactionnel d'une réaction de RT-PCRq est donné dans le tableau 6.

Tableau 6 : Mélange réactionnel pour la technique de RT-PCRq. Échantillon RT : Échantillon contenant de la transcriptase inverse. Échantillon NRT : Échantillon ne contenant pas l'enzyme.

Produit	Concentration initiale	Volume (µL)	
		Échantillon RT	Échantillon NRT
Mix SYBR® Green Quantitative Buffer	2X	12,5	12,5
Amorce R	10 µM	1,0	1,0
Amorce F	10 µM	1,0	1,0
Eau RNase-free	/	9,375	9,5
MLV Reverse Transcriptase	200 unités/µL	0,125	0

Le mélange réactionnel contient du SYBR®, un agent intercalant permettant de visualiser en temps réel la quantité d'ADN amplifié. Les conditions de RT-PCRq sont les suivantes : 30 minutes à 42°C permettant la synthèse de l'ADNc, puis 2 minutes à 95°C pour l'inactivation de l'enzyme de transcription inverse et faire la dénaturation initiale, puis 40 cycles de 15 secondes à 94°C suivie de 1 minute à 61°C. La présence d'un seul type de produit amplifié est vérifiée par une courbe de fusion. Le nom des amorces et leur séquence est précisée dans le tableau 3. Les amorces ont été sélectionnées d'après l'étude de Suo *et al.* (2012), travaillant sur une souche de *Listeria monocytogenes* 4b.

Tableau 7 : Amorces utilisées dans l'étude.

Nom	Séquence
ER10	5'-GGCGGACGGTGAGTAA-3'
ER111	5'-CTGCCTCCCGTAGGAGT-3'
sodR	5'- GCGCTGTCCGTAACCAC -3'
sodF	5'- AAGCCCAGCCAGAACCA -3'
katR	5'- GGAATAGTGAACCTTTTCG -3'
katF	5'- AAGCGTCATTGTTCTTAC -3'
friR	5'- TCGCCTTCTTTGTCAGTAAGC -3'
friF	5'- ACTAGCAATCGGCGGAAGC -3'
sigB_R	5'- CGCTCATCTAAAACAGGGAGAAC -3'
sigB_F	5'- GATGATGGATTTGAACGTGTGAA -3'
perR_R	5'- GTGCTGCGAAATGTTCTA -3'
perR_F	5'- GAAGGAAACTTCCCTAAC -3'
recA_R	5'- GTGGTACAAGTGCTGCAACG -3'
recA_F	5'- TGCGGAAGTACAAGCACAAG -3'

Afin d'étudier l'expression des gènes *sod*, *kat*, *perR*, *fri*, *sigB*, *recA*, il est important de posséder un contrôle interne. Ce contrôle interne est la résultante de l'expression des gènes codant pour l'ARN ribosomique 16S. L'expression des régions codantes de l'ARN ribosomique 16S reste constante même en cas de stress subi par les bactéries, contrairement aux gènes d'intérêt. En comparant l'expression des gènes codant l'ARNr 16S et les gènes d'intérêt, il est possible d'effectuer une quantification relative de l'expression des gènes d'intérêt. Dans cette étude, le couple d'amorces ER10-ER111 spécifique des régions codantes de l'ARN ribosomique 16S est utilisé. Les couples d'amorces utilisés ainsi que leur séquence sont présentés dans le tableau 7.

L'efficacité, la reproductibilité et la sensibilité des réactions de PCRq doivent être évaluées pour chaque couple d'amorces afin de pouvoir accéder à l'expression différentielle des gènes d'intérêt. En effet, si ces 2 efficacités sont trop éloignées, le résultat obtenu pour l'expression différentielle sera approximatif. Pour se faire, une gamme étalon d'ADN est nécessaire. Une solution d'ADN extrait à partir de la souche *L. monocytogenes* ScottA est utilisée. La concentration de la solution est calculée à partir d'un dosage spectrophotométrique à une longueur d'onde de 260 nm.

L'efficacité des PCRq, dans les conditions indiquées, est supérieure à 95% pour tous les couples d'amorces testés. Il est important de noter que la cible du couple d'amorce ER10-ER111, l'opéron *rrn*, codant les ARNr existe en 6 exemplaire chez *L. monocytogenes* alors que les autres gènes testés sont mono-copie. Quant à la sensibilité de la PCRq, elle est comparable pour les différents couples d'amorces, en détectant au moins 10³ copies de

chromosomes. Afin d'accéder à la valeur du facteur d'expression différentielle, la méthode de calcul employée est celle décrite par (Livak et Schmittgen, 2001). La formule utilisée est

Chapitre III :

Étude de couches minces de TiO_2

déposées sur substrat de verre

sodocalcique

I.	Introduction	80
II.	Influence de la température et de la pression partielle en O_2	82
A.	<i>Résumé</i>	82
B.	<i>Article</i>	82
C.	<i>Conclusion</i>	93
III.	Influence de la durée de dépôt sur les performances photocatalytiques et bactéricides de	

I. Introduction

La méthode de pulvérisation cathodique radio-fréquence permet le dépôt de couches minces sur un substrat dans le but de lui apporter de nouvelles propriétés. Le choix du substrat est important afin de mettre au point les paramètres de dépôt. Dans ce chapitre, le substrat utilisé est le verre sodocalcique. Il s'agit d'un matériau inerte, non conducteur et transparent. Le caractère transparent du verre permet d'effectuer la caractérisation complète de la couche mince.

Il est possible de modifier des paramètres lors du dépôt afin d'obtenir des couches minces différentes. La température, la pression partielle en oxygène dans l'enceinte du bâti de pulvérisation et la durée du dépôt sont les paramètres principaux sur lesquels il est possible d'intervenir dans notre cas (Figure 32).

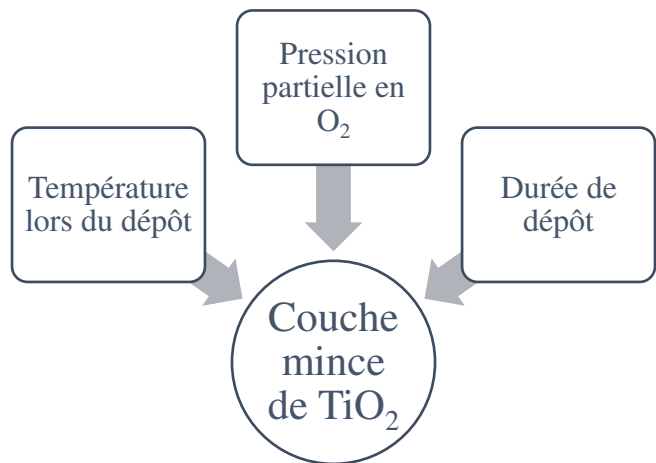


Figure 32 : Paramètres de dépôt intervenant dans l'obtention des couches minces de TiO_2 .

L'objectif est d'obtenir des couches minces de TiO_2 photocatalytiques et aux propriétés bactéricides. Elles doivent pouvoir agir sur des bactéries susceptibles d'être rencontrées dans les industries agro-alimentaires (IAA), telles que *Listeria monocytogenes*, *Yersinia enterocolitica* et *Pseudomonas fragi*.

Ce chapitre sera divisé en deux grandes parties.

Premièrement, sera étudiée l'influence de la température et de la proportion de dioxygène dans le mélange gazeux sur la structure et les propriétés des couches minces de TiO_2 . La caractérisation des différentes couches minces obtenues est réalisée par différentes méthodes : microscope électronique à balayage, diffraction aux rayons X, spectroscopie UV/visible, mesure de band-gap. L'activité photocatalytique sera évaluée par un test de décoloration d'un colorant, le bleu de méthylène (BM). L'effet antibactérien des couches minces de TiO_2 photocatalytiques sera évalué sur six souches bactériennes pour les couches minces ayant des propriétés photocatalytiques, et mesuré par dénombrement sur milieu gélosé (Figure 33).

Deuxièmement, sera évaluée l'impact de l'épaisseur sur la structure et les performances des couches minces de TiO_2 . La caractérisation complète des différents échantillons permettra de mettre en évidence les conditions optimales de dépôts. L'effet antibactérien sera testé sur deux souches de *L. monocytogenes*.

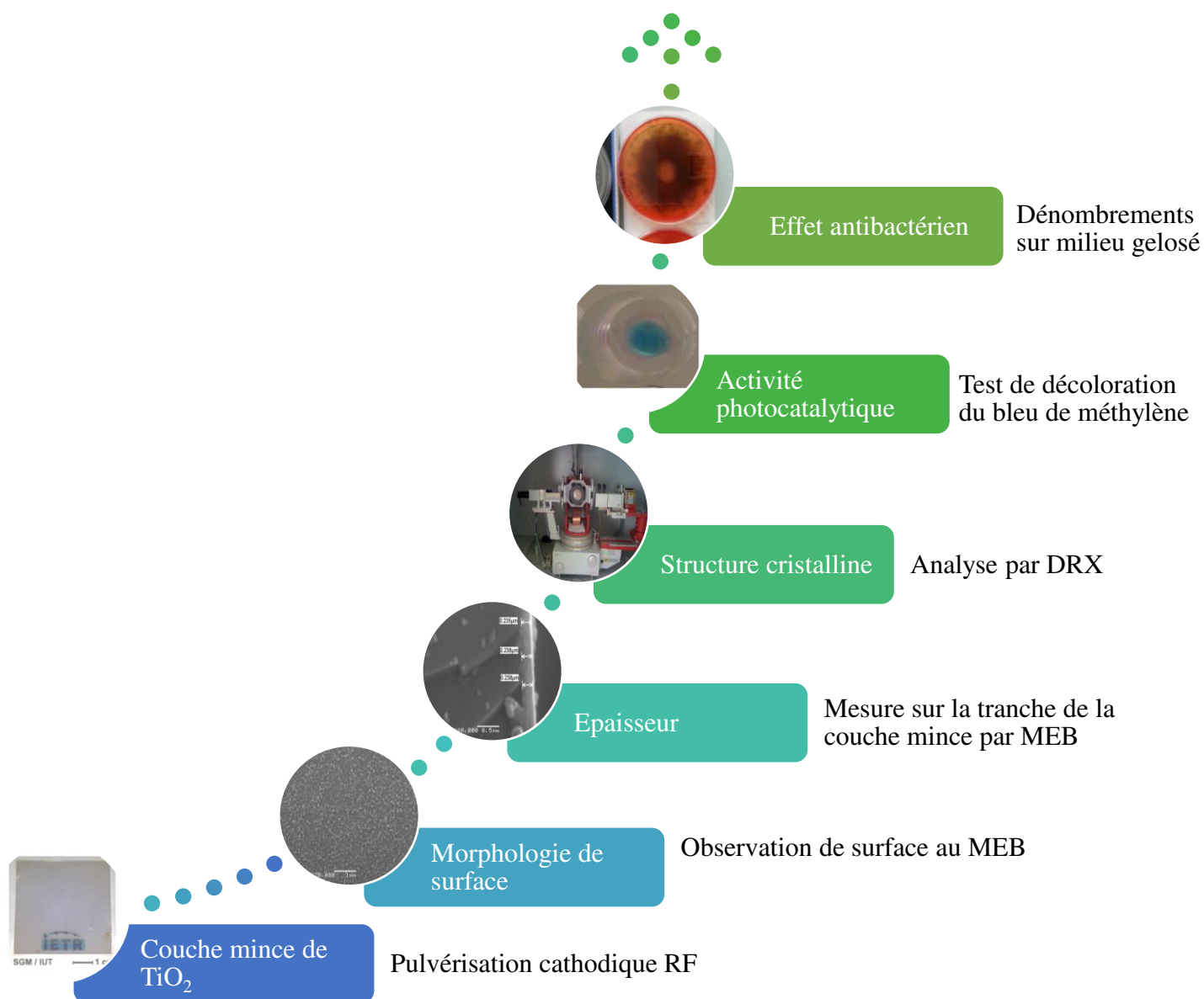


Figure 33 : Etapes de caractérisation des couches minces de TiO_2 obtenues par pulvérisation cathodique RF.

II. Influence de la température et de la



Bactericidal efficiency of UVA-active titanium dioxide thin layers on bacteria from food industry environments

Marion Bartheuf^a, Perrine Raymond^a, Nyedna Policarpo^b, Xavier Castel^b, Laurent Le Gendre^b, Martine Denis^c and Christine Pissavin^a

^aDépartement Génie Biologique, IUT de Saint-Brieuc – Université de Rennes 1, Saint-Brieuc, France; ^bInstitut d'Electronique et de Télécommunications de Rennes, IETR UMR-CNRS 6164, IUT de Saint-Brieuc – Université de Rennes 1, Saint-Brieuc, France; ^cAnses – Laboratoire de Ploufragan-Plouzané / Unité Hygiène et Qualité des Produits Avicoles et Porcins, Université de Bretagne Loire, Ploufragan, France

ABSTRACT

Titanium dioxide (TiO₂) thin layers have been deposited on glass substrates using radio frequency magnetron sputtering technique. The photocatalytic activity of the TiO₂ thin layers has been investigated by a methylene blue discolouration test and reveals that films with an anatase structure present the highest performance. Bactericidal activity of the anatase-phase TiO₂ layer against food-borne bacteria has then been tested by enumeration of the adherent cells, after adhesion and a subsequent UVA illumination. A decrease of the adherent bacteria number equal to –1.2, –2.6 and –2.3 log is reached for *Y. enterocolitica*, *L. monocytogenes* and *P. fragi*, respectively. SEM observations exhibit bacterial cells with damaged walls for all bacteria. Applied on materials present in the food plants, these TiO₂ thin layers may be an effective way for the hygienic conception of the equipment to reduce the biofilm formation and thus, to ensure food safety.

ARTICLE HISTORY

Received 11 May 2017
Accepted 30 July 2017

KEYWORDS

TiO₂; photocatalysis;
bactericidal activity; food
industry; food safety

Introduction

Biofilms containing pathogenic bacteria represent a recurrent economic and safety problem in food industries, due to their high resistance to cleaning and sanitising procedures. Microbial transfer from equipment surfaces to processed foods is responsible for 60% food-borne infections [1]. Microbial biofilms on surfaces result also in equipment damage, product contamination and food-borne infections [2,3]. Once a biofilm is formed, it appears difficult to remove it as its structure protects bacteria from traditional cleaning and sanitising procedures [4,5]. Some bacteria, such as *Listeria monocytogenes*, have the ability to persist in various food-producing environments [1,6]. Moreover strains can persist from months to several years in food plants and processing facilities [7]. The attachment of food-borne bacteria onto open surfaces and biofilm formation in food-processing environments are recurrent source of cross contamination [1].

Different strategies are emerging in order to fight against biofilm presence in food plants, such as antibacterial surfaces. The application of a surface coating containing silver or other metal ions, or the modification of the substrate surface chemistry are generally considered to be new approaches for antibacterial surface design [8–10]. Photocatalysis, as an advanced oxidation

process (AOP), is an interesting route to fight against microbial biofilm contamination in food industries. Heterogeneous photocatalysis is based on photoactivated wide band gap semiconductor material to produce reactive oxygen species (ROS). Titanium dioxide (TiO₂) material is one of the most used photocatalysts as it combines strong oxidising ability at room temperature and pressure, low cost, general lack of toxicity and photostability [11–13].

The TiO₂ antibacterial action comes from a photocatalytic generation of ROS under UVA light illumination at wavelengths shorter than 385 nm [14]. ROS, including superoxide radicals (O₂^{•−}), hydroxyl radicals (•OH) and hydrogen peroxide (H₂O₂), are very strong oxidants. They damage cell membrane of bacteria as well as DNA, inhibit growth of bacteria, leading to bacteria death and biofilm destabilisation [12,15–20].

The aim of the study is to test the antimicrobial effect of photoactivated radio frequency (RF) sputtered TiO₂ thin layers deposited on glass substrates to limit contamination and improve cleanability of the open surfaces used in the food factories. Glass substrates have been used here to extract the intrinsic characteristics of the thin layers. Indeed, such transparent substrates are essential to extract the UV–visible light absorbance of the thin films by optical transmittance measurement.

CONTACT Marion Bartheuf  marion.bartheuf@gmail.com

© 2017 Informa UK Limited, trading as Taylor & Francis Group

The elaborated samples have been tested against relevant food-borne bacteria with pathogenic ones *Listeria monocytogenes* and *Yersinia enterocolitica* and a spoilage bacterium *Pseudomonas fragi*. Only limited information is available in literature relating to the effect of TiO₂ on *Y. enterocolitica* and *P. fragi*. Indeed *Y. enterocolitica* is recently known to form biofilms in food plants and is responsible for food safety problems [21,22]. It is also relevant to test spoilage bacteria because these bacteria are frequently found to be first colonisers and provide biofilms formation. Thus, the photocatalytic activity of our TiO₂ layers has been measured and their bactericidal effect studied by testing adhesion and subsequent viability of the food-borne bacteria.

Material and methods

Strains and bacterial suspension preparation

The strains of *L. monocytogenes*, *Y. enterocolitica* and *P. fragi* considered in the present study are listed in Table 1. Each strain was stored at -70 °C in Brain Heart Infusion (BHI) broth (Biokar, France) containing 40% of glycerol. After culture of the strains on Plate Count Agar (PCA) for 18 hours at 37 °C, one colony was placed into BHI broth for *L. monocytogenes*, or in Luria Bertani broth (LB) for *Y. enterocolitica* and *P. fragi*, for 7 h, as pre-culture at 37, 30 and 25 °C, respectively. Using the pre-culture, the appropriate broth was inoculated for an overnight culture.

After the overnight sub-culture, concentration of the bacterial suspension was adjusted to 10⁸ CFU/mL by measuring the optical density of the bacterial suspension at 600 nm, and confirmed by enumeration on PCA. Then, 50 µL of these suspensions have been used to test the bactericidal activity of the coupons and to test the sensitivity of the strains to UVA radiations.

TiO₂ thin layer deposition

Thin layers of TiO₂ have been deposited on soda-lime glass substrates by RF magnetron sputtering technique [23,24]. The deposition chamber (Plassys MP 450S) that contained a titanium target (100.4 mm diameter, 99.995% purity) was pumped down to 8 × 10⁻⁶ Pa by a turbomolecular rotary pump system. The distance between target and substrate was 8.0 cm. Glass substrates were first cleaned in alkaline lye at 60 °C during 15 min, rinsed copiously with deionised water (10 min)

and dried under a steam of dry nitrogen. The glass substrate (50 mm × 50 mm × 0.7 mm), clamped on a sample holder, was then introduced in the deposition chamber via a loadlock chamber. The titanium target was supplied with RF power through an automatic matching network. Before each deposition, the target was pre-sputtered in argon (Ar) atmosphere (2.75 Pa) under 50 W RF power for 10 min to remove the target surface contaminates. Then a mixture of argon and oxygen (O₂) gas was bled into the sputtering chamber and adjusted by mass flow controllers. Various parameters during TiO₂ deposition were set as follows: RF power 200 W, sputtering time 60 min, working pressure 2.75 Pa. Five deposition temperatures (360, 400, 440, 460 and 480 °C) and three O₂/Ar ratios (3, 6 and 12 vol.%) have been studied. The elaborated films are denoted as TiO₂-deposition temperature - O₂/Ar such as TiO₂-400-3% ($T_{\text{substrate}} = 400$ °C; O₂/Ar ratio = 3 vol.%). After deposition, each sample was cleaved into 25 coupons of 1 × 1 cm each.

Physical characterisations of TiO₂ layers

A standard four-point probe configuration, with a 225 Keithley current source and a 7050 Schlumberger microvoltmeter, provides the sheet resistance R_s at room temperature.

Optical transmittance was recorded by a UV-visible spectrophotometer (Perkin Elmer Lambda 20 (Waltham, MA, USA), scanning speed 240 nm/min, 2 nm width slit) in the 200–1100 nm spectral range at normal incidence. The UV-visible spectrophotometer was previously calibrated with air (blank). In region of strong absorption, the transmittance of the layer T is expressed in terms of absorption coefficient α and film thickness d , as follows:

$$\ln(T) = -\alpha \times d \quad (1)$$

Taking into account the indirect-allowed transition in the TiO₂ band structure [25], the absorption coefficient is expressed by:

$$(\alpha h\nu)^{1/2} = A (h\nu - E_g) \quad (2)$$

where $h\nu$ is the photon energy, A is a constant independent of photon energy and E_g is the optical band gap of TiO₂. By extrapolating the linear part of $(\alpha h\nu)^{1/2}$ vs. energy, the E_g value is determined for $(\alpha h\nu)^{1/2} = 0$ [26] with an accuracy of 0.05°.

X-Ray Diffraction (XRD) analyses were performed on a Seifert 3003 PTS diffractometer in θ - 2θ mode.

Table 1. Bacterial strains considered in the present work.

Strain	Origin	Growth temperature (°C)	Reference
<i>Listeria monocytogenes</i> ScottA	Human clinical isolate	37	[66]
<i>Listeria monocytogenes</i> ECL136	Slaughterhouse surface	37	[67]
<i>Yersinia enterocolitica</i> IP134	Human clinical isolate	30	National Reference Center of <i>Yersinia</i> (Pasteur Institute, France)
<i>Yersinia enterocolitica</i> 09ALY405	Pig in slaughterhouse	30	[68]
<i>Pseudomonas fragi</i> CIP 55.4T	Unknown	30	Collection of Pasteur Institute
<i>Pseudomonas fragi</i> ECF146	Slaughterhouse surface	25	[67]

A parallel beam configuration was used with a Ge (220) monochromator mounted on the primary beam ($\text{Cu}\lambda_{\text{K}\alpha 1} = 0.154056 \text{ nm}$). Data were recorded from 10° to 80° with a step angle of 0.01° and a scan rate of $0.15^\circ/\text{min}$. TiO_2 peak indexation has been performed in reference to the joint committee in powder diffraction standards files: 71-1167 for anatase phase and 77-0442 for TiO_2 rutile phase.

Surface and cross-section observations were conducted on a Jeol JSM-5600 scanning electron microscope (SEM) operating at 10 kV. The in-depth morphology of layers was studied by SEM on cleaved sections.

Properties of the TiO_2 layers

Photocatalytic activity

The photocatalytic activity of the TiO_2 thin layers under UVA illumination was evaluated by a methylene blue (MB) test [27] using a UVA lamp at 365 nm, $1350 \mu\text{W cm}^{-2}$, (Vilbert Lourmat, VWR) for 1 h at a distance of 2 cm. Bare glass coupons have been used as negative controls.

Each coupon (coated with or without TiO_2 layer) was placed into a well of a 24-well microplate and loaded with 50 μL of a MB solution at 0.002% (w/v). After UVA illumination, 950 μL of saline water (9 g/L NaCl) was added in each well. Absorbance was measured with a spectrophotometer (Thermospectronic, Biomate₃, France) at 650 nm. The decrease of the optical density before and after UVA illumination evidences the photocatalytic activity of the TiO_2 thin layers in comparison with negative controls. The photocatalytic activity PA is expressed in Table 2 as the ratio between the relative variation of the absorbance ($A - A_0$) and the initial absorbance A_0 , as follows:

$$PA = \left(\frac{A - A_0}{A_0} \right) \times 100 \quad (3)$$

Bactericidal activity

For bactericidal activity measurements, coupons of glass (negative controls) and coupons coated with TiO_2 thin layers (dimensions of $1 \times 1 \text{ cm}$ each) were placed into wells of a 24-well microplate (Greiner Bio-one, Austria). Then 50 μL of the prepared bacterial suspension were loaded onto the surface of each coupon. All coupons were incubated at 20°C for 3 h to provide bacterial

adhesion. The incubation was done in a wet atmosphere to avoid any drying effect of the coupons. After the adhesion step, half of the coupons was exposed to UVA radiations (365 nm, 60 min, 2 cm distance between coupons and UVA lamp); other coupons were placed in the dark.

The bactericidal activity of the TiO_2 -coated coupons was assessed by two different ways: by counting the surviving bacterial cells and by observing the morphology of the cells on the coupons by scanning electron microscopy.

For the enumeration of the surviving bacterial cells, coupons with adherent cells were first washed twice with saline solution and placed in 2 mL of saline solution for sonication at 47 kHz for 20 min (Ultrasonic Bath 3210, Branson, USA) to take off adherent cells. Cultivable cells were then enumerated on BHI agar plates after 48 h at 37°C for *L. monocytogenes*, and LB agar plates at 30°C for *Y. enterocolitica* and at 25°C for *P. fragi*.

The decadic logarithm of reduction, i.e. $\log(N/N_0)$, where N_0 is the number of bacteria deposited onto coupons expressed in CFU, and N is the number of cultivable bacteria after treatment expressed in CFU, was determined.

For the observation of the morphology of the cells on the coupons by scanning electron microscopy, coupons with adherent cells were immersed in a 3% glutaraldehyde solution prepared in 0.1 M phosphate buffer for 1 h to allow fixation of the cells. Coupons were then washed twice with saline water and immersed in successive ethanol baths with increasing percentage in volume: 50, 75 and 90% for 5 mins each and ethanol at 100% for 30 min. Finally, ethanol was replaced using a hexamethyldisilazane (HMDS) (Sigma-Aldrich, France) gradient at 50%, 75% for 10 min each and 100% for 30 min. HMDS is a drying agent and is used as a good alternative to Critical Point Drying for SEM sample preparation [28]. At the end, the coupons were dried at room temperature during 24 h. Samples were then observed with a SEM.

Sensitivity of the strains to UVA radiations

Coupons of glass with bacteria prepared as described previously have been used to assess the sensitivity of the strains to UVA radiations, by comparing the number of adherent cells with and without UVA treatment.

In parallel, a 10-fold serial dilution of each strain suspension was dropped on PCA. Plates were placed under

Table 2. Sputtering parameters and characteristics of the TiO_2 layers.

Layer ID	Temp. ($^\circ\text{C}$)	O_2/Ar ratio (Vol %)	Thickness d (nm)	Crystalline phase	Band gap Eg (eV)	Photocatalytic activity under UVA radiation (% of MB discolouration)
TiO_2 -360-6%	360	6	80	Anatase	3.40	No significant
TiO_2 -400-6%	400	6	80	Anatase	3.40	No significant
TiO_2 -440-6%	440	6	50	Anatase	3.40	Significant (~10.8%)
TiO_2 -460-6%	460	6	70	Anatase	3.40	No significant
TiO_2 -480-6%	480	6	70	Rutile	3.15	No significant
TiO_2 -440-12%	440	12	70	Anatase	3.40	Significant (~8.4%)
TiO_2 -440-3%	440	3	80	Anatase	3.35	Significant (~22.9%)

UVA radiations for 10 minutes or not. After incubation of the plate for 24 h at 37 °C, 30 °C or 25 °C according to the strains, a comparison of the bacteria growth was done between the UVA treated and untreated plates.

Statistical analysis

Statistical tests were carried out using a two sample *t*-test with the same variance (XL Stats, free version, Addinsoft). Significant differences are indicated for each case study ($p < 0.05$).

Results

Characterisation of TiO₂ thin layers

Seven TiO₂ thin layers with thickness (*d*) ranged from 50 to 80 nm have been elaborated after one hour-deposition (Table 2). The sheet resistance R_s at room temperature of the whole samples is equal to $R_s = +\infty$, indicating that all layers are perfect electrical insulators.

XRD patterns exhibit an anatase crystallisation (main (1 0 1) peak) as the predominant homogeneous crystalline phase, except with the TiO₂-480-6% sample, which is mainly composed of rutile phase (Figure 1, (2 0 0) peak). Below a deposition temperature of 360 °C, TiO₂ layer is in an amorphous state, which provides neither photocatalytic, nor bactericidal activity. For deposition temperature higher than 480 °C, glass substrate reaches its softening temperature and thereby becomes unusable.

The surface morphology of TiO₂ layers observed by SEM appears smooth, except for the TiO₂-480-6% sample (Figure 2). The surface roughness of this sample could be due to the deposition temperature (480 °C), inducing the rutile phase crystallisation.

To assess the TiO₂ optical properties, optical transmission spectra of the samples have been recorded in air (data not shown) and band gap E_g is computed. As a result, the band gap values equal 3.15 eV for TiO₂-480-6% and 3.40 eV for TiO₂-360-6% (Figure 3). E_g value of

the sample deposited at 480 °C is in accordance with the expected value of rutile phase (3.05 eV), while that for samples deposited at lower temperature is in accordance with the anatase phase value (3.2 eV), see Table 2 and Tang et al. [25]. It is worth noting that an increase in the band gap values of the anatase and rutile TiO₂ phases is measured on our samples. This behaviour is explained by the smallness of the TiO₂ grains into the layers [29] in accordance with the SEM pictures (Figure 2).

Photocatalytic properties of TiO₂ thin layers

Only TiO₂ thin layers deposited at 440 °C present photocatalytic activity under UVA radiations (Table 2) exhibiting a significant MB discolouration rate after 60 mins of illumination (Student test; $p < 0.05$), compared with samples without UVA activation. The most photoactive thin layer is the TiO₂-440-3% sample exhibiting a discolouration rate of 22.9% (Table 2). It should be underlined that a decrease of the O₂/Ar ratio from 6 to 3% in sputtering parameters introduces additional energy states inside the anatase band gap [30] and thus slightly decreases the band gap value from 3.4 to 3.35 (Table 2). This coupon has been selected to test the antibacterial properties on the six strains.

Sensitivity of the strains to UVA radiations

UVA radiations have some bactericidal effects on the strains with a decrease of the number of adherent cells, ranging from 0.2 to 3 log (Figure 4). Nevertheless the sensitivity of the strains to UVA radiations depends on the bacterial species. For *L. monocytogenes* and *Y. enterocolitica*, there is no significant bactericidal effect whatever the strains. This result is confirmed through the strain growth on agar plates after UVA illumination (Figure 5). On the contrary, *P. fragi* strains are more sensitive to UVA radiations. Indeed, there is a significant difference (Student test; $p < 0.05$) between the reference strain and the environmental strain of *P. fragi*. A 3 log decrease

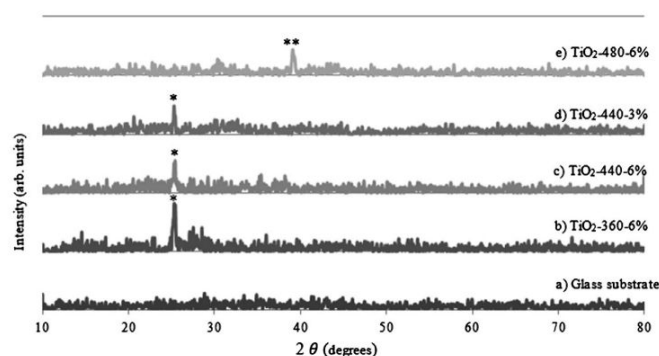


Figure 1. X-ray diffraction patterns of (a) bare glass substrate; (b) TiO₂-360-6%; (c) TiO₂-440-6%; (d) TiO₂-440-3%; (e) TiO₂-480-6% samples. *Anatase phase; **Rutile phase.

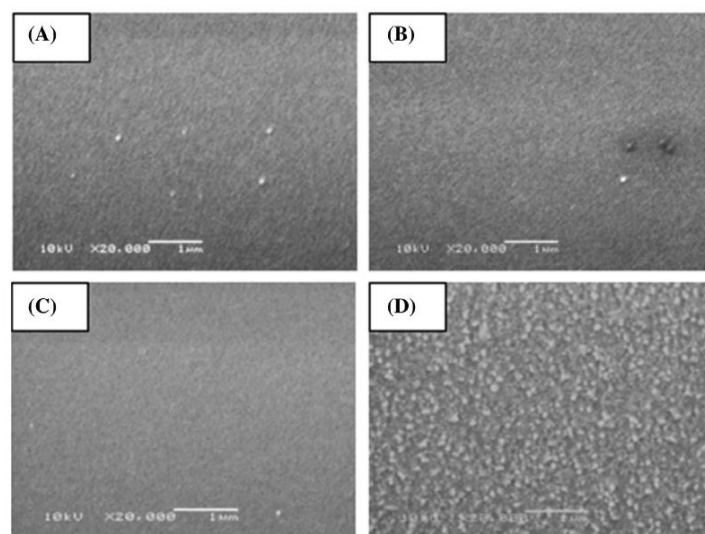


Figure 2. Surface morphology of TiO_2 layers observed by Scanning Electron Microscopy ($\times 20,000$). (A) TiO_2 -360-6%; (B) TiO_2 -440-6%; (C) TiO_2 -440-3% (D) TiO_2 -480-6%.

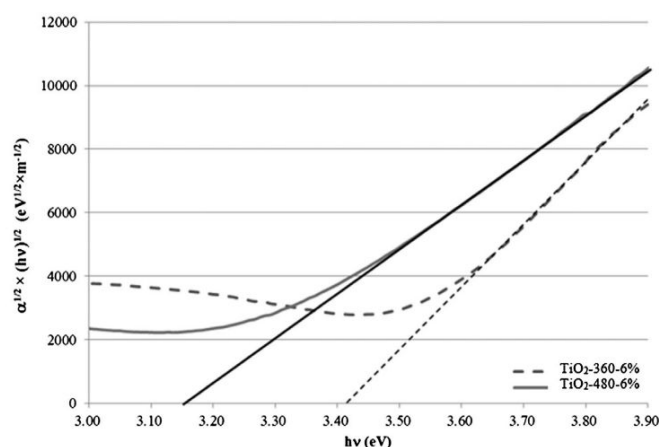


Figure 3. Optical absorption coefficient $(\alpha h\nu)^{1/2}$ vs. photon energy $(h\nu)$ and the band gap widths of the TiO_2 layers.

of adherent cells was observed after UVA illumination for the reference strain (CIP 55.4T), whereas the environmental *P. fragi* strain (ECF146) is less sensitive with only a 1.3 log decrease. The same conclusion could be reached in Figure 5. UVA exposure is responsible for a loss of cultivability for *Pseudomonas* strains whereas no difference could be observed for the other species.

Bactericidal properties of TiO_2 -440-3% thin layer

Without any UVA radiation, the cultivable adherent cells on the TiO_2 layer are as numerous as on the bare glass coupons (Figure 4); the difference is not significant

(Student test, $p > 0.05$) whatever the strains. In consequence, the TiO_2 thin layer does not provide any anti-adhesive property to the functionalised glass coupons.

After photoactivation with UVA radiations, a significant decrease of the adherent cells on the TiO_2 -440-3% sample is observed as compared to the bare glass coupons after UVA treatment (Student test, $p < 0.05$). This result is obtained for all strains, except the *P. fragi* CIP 55.4T one (Figure 4), since a 4 log decrease is already observed with the UVA treatment without TiO_2 .

The cells of the environmental strains adhering onto the TiO_2 -440-3% coupon surface and onto the bare surface were submitted to UVA illumination and

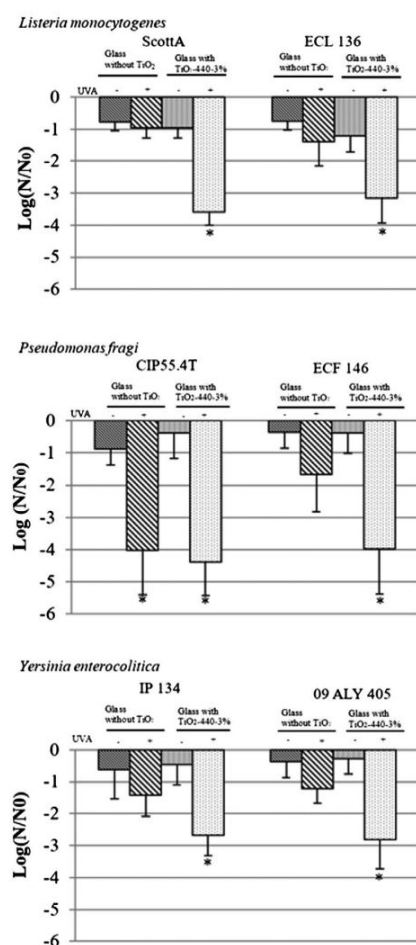


Figure 4. Influence of TiO₂ layers and UVA illumination on cell viability of six bacterial strains. Surviving cells are numerated on agar plates, N₀ is the cell number deposited on coupon and N the number of surviving cells. Activity of TiO₂ under UVA radiations (+) is measured compared with the same coupon in the dark (–s) and bare glass (reference). Data reported here are the mean values of three replicates $\pm$ standard deviation. Black stars indicate a significant difference ($p < 0.05$).

have been observed by scanning electron microscopy. Damaged cells occur on the functionalised surface, by contrast to those adhering on glass coupons and showing no morphological damages (Figure 6). Cells appear empty, as ‘ghost cells’ on the functionalised surface after UVA illumination. On bare glass coupons, UVA illumination does not affect the bacterial morphology. Indeed UVA treatment could be responsible for DNA mutation and death cell if UV exposure is long. In our case, we used UVA wavelength, the less damaging UV rays (365 nm) for a maximum limit of 60 mins.

Discussion

The development of functionalised surfaces could be one of the emerging fighting strategies against biofilms [10,31]. Indeed, the bactericidal surface activity of devices designed for biomedical or agri-food sectors can be achieved through different approaches. Basically, a surface texture modification by ion implantation [32] or by inorganic thin film deposition [33] can be done to modify both the material roughness and its chemical surface structure and, as a consequence, the bacterial adhesion. A second route consists in building metal-doped surfaces that will slowly release ionic efficient species (Ag⁺, Cu²⁺). Therefore, copper (II) ions can be intrinsically trapped in the material top layers (Cu bearing stainless steels) [34–37] or immobilised in specifically deposited upperlayers. Films containing Cu (II) chelated in polydopamine [38] or copper-containing coatings deposited by RF sputtering [36] or by sol-gel methods [39] have proven to be efficient on a wide range of bacteria (*Escherichia coli*, *S. aureus*, *S. epidermidis*) [31,40]. In any case, the antibacterial performance of Cu-containing surfaces is directly related with the ionic release rate [35,37,39,41]. Complementary routes consist in the grafting of antibacterial molecules i.e. biocides or antibiotics [31]. As the antibacterial properties of all those devices are based on the release of active species embedded in the first atomic layers, their efficiency can significantly decrease over time. This problem can be circumvented by creating the active bactericidal species from the aqueous environment rather than extracting them from the surface composition. That way, using heterogeneous photocatalysis with TiO₂ material will lead to photo-induced ROS and could be a relevant strategy to fight against the biofilm formation in food industry environments. TiO₂ photocatalyst is widely used and provides strong oxidising ability at room temperature and pressure, is stable, non-toxic, cheap and readily available [13].

TiO₂ photocatalysts as fine particle have been already studied to fight against food-borne pathogenic bacteria, such as *E. coli*, *Salmonella choleraesuis*, *Salmonella enterocolitica*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Listeria monocytogenes* or *Vibrio parahaemolyticus* [11,42,43]. TiO₂ can also be used in other fields such as medical environments and devices [2,31,44], or water treatment [45,46]. However the use of TiO₂ powder could turn out to be technologically unworkable and very expensive because of the necessary filtration step [47,48]. Rawat et al. synthesised TiO₂-coated magnetic nanoparticles using reverse micelle and chemical hydrolysis methods. This composite core-shell structure provides surface bactericidal activity and allows a quick and efficient extraction of the ferrite-based particles using a magnetic field [49,50].

In this work, we have used the RF magnetron sputtering technique to grow TiO₂ thin layers onto glass

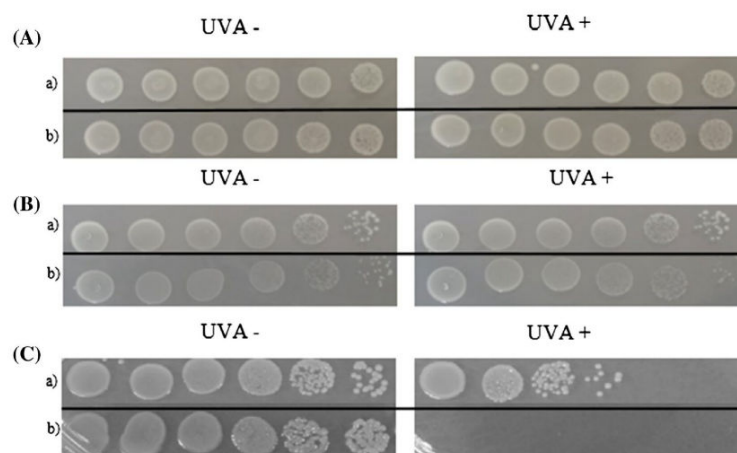


Figure 5. UVA sensitivity of reference and environmental strains listed in Table 1. (A) *Listeria monocytogenes*, (a) ScottA; (b) ECL136. (B) *Yersinia enterocolitica*, (a) 09 ALY 405; (b) IP 134. (C) *Pseudomonas fragi*, (a) ECF146; (b) CIP 55.4T. 'UVA -': No exposition to UVA; 'UVA +': Exposition to UVA for 10 mins. Bacterial suspension was deposited and the next spots represented a 10-fold serial dilution.

substrate. XRD patterns exhibit the growth of TiO_2 films with the anatase structure, the most photoactive phase of TiO_2 [51,52]. Indeed TiO_2 layers elaborated at 440 °C with O_2/Ar ratio equal to 3% display a significant photocatalytic activity under UVA illumination highlighted by the discoloration of methylene blue. Moreover samples elaborated at this temperature present a smooth surface, by contrast to those elaborated at higher temperature [53]. These sputtering parameters are to be considered to improve the cleanability of the functionalised surfaces. It is actually well established that bio-adhesion and fouling are conditioned by numerous surface characteristics, such as surface roughness, surface composition, electrostatic charges, wettability and surface energy [54,55]. At higher deposition temperature, rutile phase grows in accordance with a decrease of the optical band gap [53].

The activity of our TiO_2 thin layers has been tested on adherent cells while in other studies the bactericidal effect is tested on mature biofilms [14,20]. Unfortunately, our TiO_2 coatings do not provide any anti-adhesive properties. Indeed without UVA illumination, no significant difference of the attached cells number is observed whatever the support. These results are in accordance with studies dealing with the adhesion of *L. monocytogenes* ScottA strain onto glass coupons and TiO_2 layers without UVA activation [14].

After photoactivation of the TiO_2 -440-3% coupon, bactericidal activity has been highlighted for all strains. With bare glass coupons, no significant bactericidal activity under UVA radiations has been observed, except with the *P. fragi* CIP 55.4T strain. Compared with the *P. fragi* environmental strain, the CIP 55.4T strain is the most sensitive to UVA illumination. It could be due to the origin of the strains. Indeed environmental strains might have encountered previous stresses in food plants

environment, such as starvation, cold shock heat shock, acids, high osmolarity and high hydrostatic pressure, and then might have developed pleiotropic resistance mechanisms [56]. Moreover *P. fragi* and *Y. enterocolitica* appear to be more sensitive to UVA than *L. monocytogenes* Scott A. This is in accordance with another study showing a more pronounced sensitivity of Gram negative bacteria to UVA than Gram positive [57]. Compared with *L. monocytogenes*, *P. fragi* strains remain also more sensitive to UVC illumination [58].

The action of UVA light on TiO_2 material induces electron-hole pair production and subsequent TiOH formation in the presence of water molecules; this also leads to ROS production. ROS are at the origin of the bactericidal effect of photoactivated TiO_2 layers. ROS production can occur at wavelengths less than 385 nm [59]. These oxidative compounds have a broad activity spectrum, a low corrosion power and another advantage is the absence of final residues. On photoactivated TiO_2 surface, bacteria as 'ghost cells' are observed by SEM, demonstrating bacteria cell wall damage and a release of cytoplasmic content in the external environment. This is in accordance with some studies demonstrating that ROS provoke cell damages, membrane peroxidation and DNA breakage [11,20,48,60]. The UV radiations induce a microbial effect by subsequent mutagenesis of the cell DNA [20,42,61,62], but do not damage bacterial membranes. For the environmental *P. fragi* strain, the most important effect of the TiO_2 photocatalytic action was located at the apical end of the cells, as observed by De Nardi et al. on the same environmental strain ECF 146. ROS generated by UVA-exposed TiO_2 thin layer are responsible for the oxidation of the membrane phospholipids and the lipids are more present in the cell wall of Gram negative cells as *Pseudomonas* sp. [58]. Using

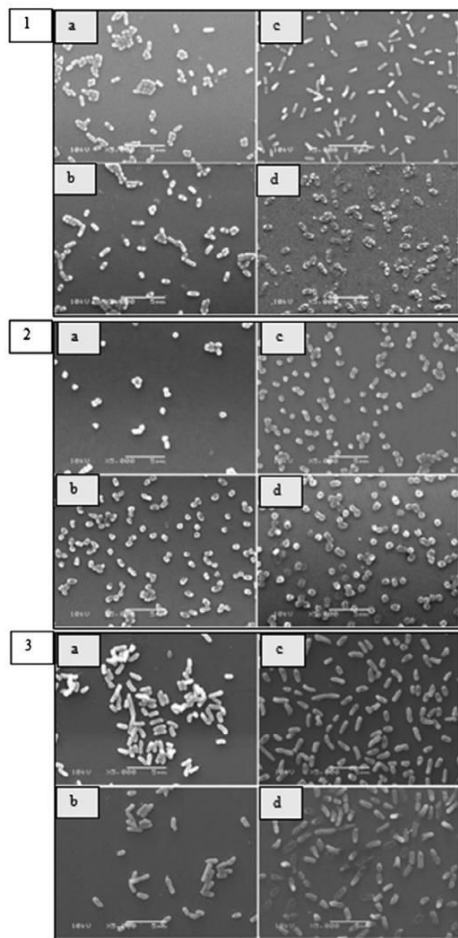


Figure 6. SEM observations of *L. monocytogenes* ECL136 (1); *Y. enterocolitica* 09ALY405 (2) and *P. fragi* ECF 146 (3) cells adhered for 3 hours on bare glass (a;b) and TiO₂-440-3% coupons (c;d), in the dark (a;c) and with 60 minutes of UVA illumination (b;d). Walls of the cells are damaged on TiO₂ after UVA illumination.

atomic force microscopy, Liou et al. also demonstrated that photocatalysis affects first the surface properties of the bacterial cells, and holes are formed at the apical terminus of *E. coli* cells, also a Gram negative bacteria [63]. The TiO₂-440-3% layer caused the reduction of the adherent cells from 1.2 to 2.6 log, according to the strain used, after 60 mins under UVA illumination. Chorianopoulos et al. have reached 2 log reduction of *L. monocytogenes* ScottA after 60 mins under UVA illumination [14]. With our TiO₂-functionalised surface, a 2.5 log reduction is obtained with the same strain, by taking into account only the adherent cells reduction due to the activated TiO₂ layer. Our anatase-TiO₂ thin layer showed a better bactericidal effect on the Gram positive bacterium, *L. monocytogenes* than on the pathogen

Y. enterocolitica, a Gram negative bacterium. This is in accordance with Momeni et al. who showed that the antimicrobial property was more pronounced with the Gram positive bacteria than the Gram negative bacteria [64].

On the other hand, Verran et al. have demonstrated that a protective thin titanium layer, by reducing the surface roughness, helps protect a stainless steel surface from the retention and proliferation of *E. coli* cells in the presence and absence of a meat conditioning film [65]. In the present study, the optimal TiO₂ layer, deposited on glass substrate, displays a high photocatalytic activity and exhibits significant bactericidal activity on *L. monocytogenes*, *Y. enterocolitica* and *P. fragi*. On a rough surface, (stainless steel) these photoactive properties will be complemented by the topographical features modification induced by the thin film deposition that will limit the retention and enhance the removal of bacteria.

As a next step, by doping the titanium dioxide layer during the sputtering with silver or copper, the photo-induced activity of TiO₂ will be coupled with the bactericidal effect of metallic ions to improve the bactericidal efficiency of our surfaces.

In conclusion, we demonstrate in this study that the combination of TiO₂ thin layer with UVA illumination is an effective way to reduce the adherent bacterial cell population. This approach will improve the disinfection step in food industry environments. Indeed TiO₂ photocatalysts could be used as a complementary alternative for the disinfection of contaminated surfaces. Work is under progress to deposit such layer onto stainless steel substrate to promote its use in food plant environment.

Acknowledgments

We thank Stéphanie Bougeard for her help in statistical analysis.

Disclosure statement

No potential conflict of interest was reported by the authors.

Funding

This work was supported by the European Union through the European Regional Development Fund (ERDF), the Ministry of Higher Education and Research, the Région Bretagne, the Département des Côtes d'Armor and Saint-Brieuc Armor Agglomération, through the CPER Projects 2015-2020 MATECOM and SOPHIE/STIC & Ondes.

References

- [1] Bridier A, Sanchez-Vizueté P, Guilbaud M, et al. Biofilm-associated persistence of food-borne pathogens. *Food Microbiol.* 2015;45, Part B:167–178.
- [2] Abdallah M, Benoliel C, Drider D, et al. Biofilm formation and persistence on abiotic surfaces in the context of food and medical environments. *Arch Microbiol.* 2014;196:453–472.

- [3] Trachoo N. Biofilms and the food industry. *Songklanakarin J Sci Technol.* **2003**;25(6):807–815.
- [4] Gil MI, Selma MV, López-Gálvez F, et al. Fresh-cut product sanitation and wash water disinfection: problems and solutions. *Int J Food Microbiol.* **2009**;134:37–45.
- [5] Ibusquiza PS, Herrera JJR, Cabo ML. Resistance to benzalkonium chloride, peracetic acid and nisin during formation of mature biofilms by *Listeria monocytogenes*. *Food Microbiol.* **2011**;28:418–425.
- [6] Chae MS, Schraft H. Comparative evaluation of adhesion and biofilm formation of different *Listeria monocytogenes* strains. *Int J Food Microbiol.* **2000**;62:103–111.
- [7] Skovager A, Larsen MH, Castro-Mejia JL, et al. Initial adhesion of *Listeria monocytogenes* to fine polished stainless steel under flow conditions is determined by prior growth conditions. *Int J Food Microbiol.* **2013**;165:35–42.
- [8] Dizaj SM, Lotfipour F, Barzegar-Jalali M, et al. Antimicrobial activity of the metals and metal oxide nanoparticles. *Mater Sci Eng C.* **2014**;44:278–284.
- [9] Harrison JJ, Turner RJ, Joo DA, et al. Copper and quaternary ammonium cations exert synergistic bactericidal and antibiofilm activity against *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob Agents Chemother.* **2008**;52:2870–2881.
- [10] Hasan J, Crawford RJ, Ivanova EP. Antibacterial surfaces: the quest for a new generation of biomaterials. *Trends Biotechnol.* **2013**;31:295–304.
- [11] Kim B, Kim D, Cho D, et al. Bactericidal effect of TiO₂ photocatalyst on selected food-borne pathogenic bacteria. *Chemosphere.* **2003**;52:277–281.
- [12] Weng X, van Niekerk J, Neethirajan S, et al. Characterization of antimicrobial efficacy of photocatalytic polymers against food-borne biofilms. *LWT – Food Sci Technol.* **2016**;68:1–7.
- [13] Yemmireddy VK, Hung Y-C. Selection of photocatalytic bactericidal titanium dioxide (TiO₂) nanoparticles for food safety applications. *LWT – Food Sci Technol.* **2015**;61:1–6.
- [14] Chorianopoulos NG, Tsoukleris DS, Panagou EZ, et al. Use of titanium dioxide (TiO₂) photocatalysts as alternative means for *Listeria monocytogenes* biofilm disinfection in food processing. *Food Microbiol.* **2011**;28:164–170.
- [15] Maness PC, Smolinski S, Blake DM, et al. Bactericidal activity of photocatalytic TiO₂ reaction: toward an understanding of its killing mechanism. *Appl Environ Microbiol.* **1999**;65:4094–4098.
- [16] Gogniat G, Thyssen M, Denis M, et al. The bactericidal effect of TiO₂ photocatalysis involves adsorption onto catalyst and the loss of membrane integrity. *FEMS Microbiol Lett.* **2006**;258:18–24.
- [17] Gogniat G, Dukan S. TiO₂ photocatalysis causes DNA damage via fenton reaction-generated hydroxyl radicals during the recovery period. *Appl Environ Microbiol.* **2007**;73:7740–7743.
- [18] Muranyi P, Schraml C, Wunderlich J. Antimicrobial efficiency of titanium dioxide-coated surfaces. *J Appl Microbiol.* **2010**;108:1966–1973.
- [19] Kim S, Ghafoor K, Lee J, et al. Bacterial inactivation in water, DNA strand breaking, and membrane damage induced by ultraviolet-assisted titanium dioxide photocatalysis. *Water Res.* **2013**;47:4403–4411.
- [20] Carré G, Hamon E, Ennahar S, et al. TiO₂ photocatalysis damages lipids and proteins in *Escherichia coli*. *Appl Environ Microbiol.* **2014**;80:2573–2581.
- [21] Denis M, Houard E, Labbé A, et al. A selective chromogenic plate, YECA, for the detection of pathogenic *Yersinia enterocolitica*: specificity, sensitivity, and capacity to detect pathogenic *Y. enterocolitica* from pig tonsils. *J Pathog.* **2011**;2011(2011), Article ID 296275:8.
- [22] Ioannidis A, Kyratsa A, Ioannidou V, et al. Detection of biofilm production of *Yersinia enterocolitica* strains isolated from infected children and comparative antimicrobial susceptibility of biofilm versus planktonic forms. *Mol Diagn Ther.* **2014**;18:309–314.
- [23] Le Paven C, Le Gendre L, Benzerga R, et al. Growth of (Sr, La)-(Ta, Ti)-O-N perovskite oxide and oxynitride films by radio frequency magnetron sputtering: Influence of the reactive atmosphere on the film structure. *J Cryst Growth.* **2015**;413:5–11.
- [24] Tian XB, Wang ZM, Yang SQ, et al. Antibacterial copper-containing titanium nitride films produced by dual magnetron sputtering. *Surf Coat Technol.* **2007**;201:8606–8609.
- [25] Tang H, Prasad K, Sanjinès R, et al. Electrical and optical properties of TiO₂ anatase thin films. *J Appl Phys.* **1994**;75:2042–2047.
- [26] Barka-Bouaifel F, Makaoui K, Jouan P-Y, et al. Preparation and photocatalytic properties of quartz/gold nanostructures/TiO₂ lamellar structures. *RSC Adv.* **2012**;2:12482–12488.
- [27] Fu P, Luan Y, Dai X. Preparation of activated carbon fibers supported TiO₂ photocatalyst and evaluation of its photocatalytic reactivity. *J Mol Catal – Chem.* **2004**;221:81–88.
- [28] Hazrin-Chong NH, Manefield M. An alternative SEM drying method using hexamethyldisilazane (HMDS) for microbial cell attachment studies on sub-bituminous coal. *J Microbiol Methods.* **2012**;90:96–99.
- [29] Wang Z, Yao N, Hu X, et al. Structural and photocatalytic study of titanium dioxide films deposited by DC sputtering. *Mater Sci Semicond Process.* **2014**;21:91–97.
- [30] Henkel B, Neubert T, Zabel S, et al. Photocatalytic properties of titania thin films prepared by sputtering versus evaporation and aging of induced oxygen vacancy defects. *Appl Catal B Environ.* **2016**;180:362–371.
- [31] Sun D, Shahzad MB, Li M, et al. Antimicrobial materials with medical applications. *Mater Technol.* **2015**;30:B90–B95.
- [32] Huang H-H, Tung K-L, Lin Y-Y. Treating Ti containing dental orthodontic wires with nitrogen plasma immersion ion implantation to reduce the metal ions release and bacterial adhesion. *Mater Technol.* **2015**;30:B73–B79.
- [33] Yu L, Li J, Wang D, et al. Improved antimicrobial activity and bioactivity of porous CaP–TiO₂ coating through surface nanofunctionalisation. *Mater Technol.* **2015**;30:B109–B114.
- [34] Yin Y, Zhang X, Wang D, et al. Study of antibacterial performance of a type 304 Cu bearing stainless steel against airborne bacteria in real life environments. *Mater Technol.* **2015**;30:B104–B108.
- [35] Zhang S, Yang C, Ren G, et al. Study on behaviour and mechanism of Cu²⁺ ion release from Cu bearing antibacterial stainless steel. *Mater Technol.* **2015**;30:B126–B132.
- [36] Wang S, Yang K, Shen M, et al. Effect of Cu content on antibacterial activity of 17-4 PH stainless steel. *Mater Technol.* **2015**;30:B115–B119.

- [37] Ren L, Chong J, Loya A, et al. Determination of Cu²⁺ ions release rate from antimicrobial copper bearing stainless steel by joint analysis using ICP-OES and XPS. *Mater Technol.* 2015;30:B86–B89.
- [38] He T, Zhu W, Wang X, et al. Polydopamine assisted immobilisation of copper(II) on titanium for antibacterial applications. *Mater Technol.* 2015;30:B68–B72.
- [39] Zhang D, Zhang B, Tang XN, et al. Preparation and characterisation of copper inorganic antibacterial material containing holmium. *Mater. Technol.* 2015;30:B133–B138.
- [40] Noyce JO, Michels H, Keevil CW. Use of copper cast alloys to control *Escherichia coli* O157 cross-contamination during food processing. *Appl Environ Microbiol.* 2006;72:4239–4244.
- [41] Ma Z, Yao M, Liu R, et al. Study on antibacterial activity and cytocompatibility of Ti–6Al–4 V–5Cu alloy. *Mater Technol.* 2015;30:B80–B85.
- [42] Ditta IB, Steele A, Liptrot C, et al. Photocatalytic antimicrobial activity of thin surface films of TiO₂, CuO and TiO₂/CuO dual layers on *Escherichia coli* and bacteriophage T₄. *Appl Microbiol Biotechnol.* 2008;79:127–133.
- [43] Robertson JMC, Robertson PKJ, Lawton LA. A comparison of the effectiveness of TiO₂ photocatalysis and UVA photolysis for the destruction of three pathogenic micro-organisms. *J Photochem Photobiol Chem.* 2005;175:51–56.
- [44] Depan D, Misra RDK. On the determining role of network structure titania in silicone against bacterial colonization: Mechanism and disruption of biofilm. *Mater Sci Eng C.* 2014;34:221–228.
- [45] Kaan CC, Aziz AA, Ibrahim S, et al. Heterogeneous photocatalytic oxidation an effective tool for wastewater treatment – a review. In: Kumarasamy K, editor. *Studies on water management issue*. Rijeka: InTech; 2012. p. 219–236. doi:10.5772/30134. Available from: <https://www.intechopen.com/books/studies-on-water-management-issues/heterogeneous-photocatalytic-oxidation-an-effective-tool-for-wastewater-treatment-a-review>
- [46] Claro EMT, Bidoia ED, de Moraes PB. A high-performance doped photocatalysts for inactivation of total coliforms in superficial waters using different sources of radiation. *J Environ Manage.* 2016;177:264–270.
- [47] Guillard C, Kartheuser B, Lacombe S. La photocatalyse: dépollution de l'eau ou de l'air et matériaux autonettoyants [Photocatalysis: water or air pollution control and self-cleaning materials]. *Tech Ing Génie Procédés Prot Environ.* 2011;TIB327DUO.
- [48] Sunkara BK, Misra RDK. Enhanced antibactericidal function of W4+-doped titania-coated nickel ferrite composite nanoparticles: A biomaterial system. *Acta Biomater.* 2008;4:273–283.
- [49] Rawat J, Rana S, Srivastava R, et al. Antimicrobial activity of composite nanoparticles consisting of titania photocatalytic shell and nickel ferrite magnetic core. *Mater Sci Eng C Biomim Supramol Syst.* 2007;27:540–545.
- [50] Rawat J, Rana S, Sorensson MM, et al. Anti-microbial activity of doped anatase titania coated nickel ferrite composite nanoparticles. *Mater Sci Technol.* 2007;23:97–102.
- [51] Hanaor DAH, Sorrell CC. Review of the anatase to rutile phase transformation. *J Mater Sci.* 2010;46:855–874.
- [52] Venkatasubramanian R, Srivastava RS, Misra RDK. Comparative study of antimicrobial and photocatalytic activity in titania encapsulated composite nanoparticles with different dopants. *Mater Sci Technol.* 2008;24:589–595.
- [53] Nair PB, Justinvictor VB, Daniel GP, et al. Optical parameters induced by phase transformation in RF magnetron sputtered TiO₂ nanostructured thin films. *Prog Nat Sci Mater Int.* 2014;24:218–225.
- [54] Allion A, Merlot M, Boulangé-Petermann L, et al. Thin photocatalytic TiO₂ coatings: impact on bioadhesion and cell viability. *Plasma Process Polym.* 2007;4:S374–S379.
- [55] Gu H, Ren D. Materials and surface engineering to control bacterial adhesion and biofilm formation: a review of recent advances. *Front Chem Sci Eng.* 2014;8:20–33.
- [56] Abée T, Kovács ÁT, Kuipers OP, et al. Biofilm formation and dispersal in Gram-positive bacteria. *Curr Opin Biotechnol.* 2011;22:172–179.
- [57] Cheigh C-I, Park M-H, Chung M-S, et al. Comparison of intense pulsed light- and ultraviolet (UVC)-induced cell damage in *Listeria monocytogenes* and *Escherichia coli* O157:H7. *Food Control.* 2012;25:654–659.
- [58] De Nardi F, Delaunay D, Talibart R, et al. Antimicrobial activity of stainless steel with a modified TiN upperlayer on meat related contaminants. *J Food Sci Eng.* 2016;6:332–343.
- [59] Fu L, Hamzeh M, Dodard S, et al. Effects of TiO₂ nanoparticles on ROS production and growth inhibition using freshwater green algae pre-exposed to UV irradiation. *Environ Toxicol Pharmacol.* 2015;39:1074–1080.
- [60] Vatansever F, de Melo WCMA, Avci P, et al. Antimicrobial strategies centered around reactive oxygen species – bactericidal antibiotics, photodynamic therapy, and beyond. *FEMS Microbiol Rev.* 2013;37:955–989.
- [61] Foster HA, Ditta IB, Varghese S, et al. Photocatalytic disinfection using titanium dioxide: spectrum and mechanism of antimicrobial activity. *Appl Microbiol Biotechnol.* 2011;90:1847–1868.
- [62] Yang X, Wang Y. Photocatalytic effect on plasmid DNA damage under different UV irradiation time. *Build Environ.* 2008;43:253–257.
- [63] Liou J-W, Gu M-H, Chen Y-K, et al. Visible light responsive photocatalyst induces progressive and apical-terminus preferential damages on *Escherichia coli* surfaces. *PLoS One.* 2011;6:e19982.
- [64] Momeni MM, Hashemizadeh S, Mirhosseini M, et al. Preparation, characterisation, hardness and antibacterial properties of Zn–Ni–TiO₂ nanocomposites coatings. *Surf Eng.* 2016;32:490–494.
- [65] Verran J, Packer A, Kelly P, et al. Titanium-coating of stainless steel as an aid to improved cleanability. *Int J Food Microbiol.* 2010;141(Supplement):S134–S139.
- [66] Fleming DW, Cochi SL, MacDonald KL, et al. Pasteurized Milk as a Vehicle of Infection in an Outbreak of Listeriosis. *N Engl J Med.* 1985;312:404–407.
- [67] Chasseignaux E, Gérault P, Toquin M-T, et al. Ecology of *Listeria monocytogenes* in the environment of raw poultry meat and raw pork meat processing plants. *FEMS Microbiol Lett.* 2002;210:271–275.
- [68] Fondrevez M, Labbé A, Houard E, et al. A simplified method for detecting pathogenic *Yersinia enterocolitica* in slaughtered pig tonsils. *J Microbiol Methods.* 2010;83:244–249.

C. Conclusion

En faisant varier la température de dépôt ainsi que le ratio entre l'oxygène et l'argon lors du dépôt, il a été possible de mettre en évidence les conditions les plus favorables à l'obtention de couches minces de TiO_2 photoactives.

Il s'avère qu'à 440°C , toutes les couches minces réalisées possèdent une activité photocatalytique sous rayonnement UVA. En dessous de cette température, les couches minces déposées ne permettent aucune décoloration significative du bleu de méthylène (BM) et par conséquent, ne sont donc pas photoactives. Au-delà de 460°C , le verre sodocalcique, dans les conditions de pression dans l'enceinte, semble atteindre un point de fusion. A 480°C , le verre semble s'être ramolli lors du dépôt. En effet, les fixations du substrat ont pu pénétrer dans le verre, signe du ramollissement du verre. L'observation de la morphologie de surface de cet échantillon, le TiO_2 -480-3%, a montré que la surface était plus granuleuse que celle des autres échantillons. De plus, parmi tous les échantillons obtenus, cette couche mince est la seule à présenter une phase cristalline du TiO_2 uniquement rutile. L'ensemble des autres couches minces a présenté une phase cristalline anatase. Cette observation a pu être confirmée grâce à la détermination de l'énergie d'activation, la valeur du Band Gap (BG). Pour les échantillons présentant une phase anatase, la valeur de BG est située à 3,40 eV. Cette valeur diminue pour la couche mince TiO_2 -480-3% et se situe à 3,15 eV. Une diminution de la valeur de BG entre les phases anatase et rutile était attendue d'après les données bibliographiques. En effet, les valeurs sont normalement de 3,20 eV pour l'anatase et 3,05 eV pour le rutile (Tang *et al.*, 1994). La différence entre les valeurs obtenues expérimentalement avec nos couches minces et les valeurs données dans la littérature, peut être expliquée par le fait que les couches minces ont été obtenues après 60 minutes de dépôt, ce qui correspond à une épaisseur de comprise entre 50 et 80 nm. Il s'agit d'une faible épaisseur et les grains de TiO_2 à la surface de nos échantillons sont de petite taille, ce qui est à l'origine d'un biais dans la détermination des valeurs de BG (Wang *et al.*, 2014)

Une fois la température de dépôt fixée à 440°C , le ratio entre l'oxygène et l'argon au moment du dépôt a été modifiée. Trois couches minces ont été réalisées, à 3%, 6% et 12% d'oxygène. Ces trois couches minces ont permis la décoloration du BM sous illumination UVA avec un taux de réduction de l'absorbance à 650 nm de 22,9%, 10,8% et 8,4% respectivement suggérant la production de EROs. La couche mince déposée en présence de la plus faible quantité d'oxygène dans l'enceinte est la plus photoactive. En 2012, Chiou et ses collaborateurs, ont déposé par pulvérisation cathodique radio-fréquence des couches minces de TiO_2 dans différentes condition de flux d'oxygène dans l'enceinte. Les couches minces qu'ils ont obtenues sont de forme anatase (101) (Annexe 1). Les taux d'oxygène testés sont compris entre 0 et 70%. L'activité photocatalytique de leurs différents échantillons est testée par le test de décoloration du BM sous illumination UVA jusqu'à 240 minutes. D'après

ce test, les couches minces les plus photoactives dans leur étude sont des couches minces déposées avec 50% de flux d'oxygène. La couche mince déposée avec 10% d'oxygène est également un des échantillons qui présente la meilleure activité photocatalytique (Chiou *et al.*, 2012). Cela rejoint les valeurs testées dans notre étude et le fait que la diminution de la quantité d'oxygène dans l'enceinte peut générer une couche mince avec une forte activité photocatalytique. La couche mince TiO₂-440-3% est l'échantillon sélectionné pour la suite des tests. Les paramètres de dépôt de cet échantillon seront conservés comme base pour les futurs dépôts.

Les tests sur bactéries ont été réalisés sur 6 souches, de trois genres différents compte tenu de leurs caractéristiques physiologiques (paroi, membrane, et génétique). Parmi ces souches, certaines sont des souches de référence, d'autres des souches qualifiées de souches de « terrain ». Les souches de référence sont des souches répertoriées et caractérisées. En général, leur génotype est entièrement connu et ce sont les souches majoritairement étudiées dans les études microbiologiques. Utiliser des souches de référence dans notre étude permet de comparer les résultats obtenus.

Les souches de « terrain » aussi appelées souches environnementales ont été isolées directement d'IAA dans notre cas. Les souches de *L. monocytogenes* ECL 136 et *P. fragi* ECF 146 ont été retrouvées au sein d'un même prélèvement au sein d'un abattoir de porc (Chasseignaux *et al.*, 2002). Le choix de ces souches est justifié par le fait qu'elles sont susceptibles d'avoir subi divers stress dans les ateliers et sont potentiellement plus adaptées à cet environnement.

Le test de sensibilité des souches face au rayonnement UVA a montré qu'il existait des différences entre genre et même entre souches d'une même espèce. *Y. enterocolitica* est par exemple moins sensible que les *Listeria* et *Pseudomonas*. En ce qui concerne *P. fragi*, les souches de terrain et de référence n'ont pas montré la même sensibilité. La souche de terrain est beaucoup moins sensible aux UVA que la souche provenant de la Collection de l'Institut Pasteur ; CIP 55.4T. Ce test nous a permis de voir qu'il est nécessaire d'évaluer l'activité antibactérienne de nos couches minces sur différentes souches, d'espèces différentes.

Les résultats d'effet bactéricide ont renforcé le fait de tester les couches minces sur les six souches. L'effet bactéricide est plus marqué sur la souche *P. fragi* ECP 146. La souche de référence, déjà trop sensible sous illumination UVA, n'a pas donné de résultats interprétables. Concernant les souches de bactéries pathogènes, *Y. enterocolitica* est l'espèce la moins sensible, à la fois par rapport aux UVA et par rapport à la photocatalyse.

Cependant, l'épaisseur de l'échantillon TiO₂-440-3% est faible, autour de 80 nm. Un moyen d'améliorer les performances photocatalytiques et bactéricides de cette couche mince

consiste à optimiser la durée de dépôt et par conséquent l'épaisseur de la couche mince de TiO_2 . Ceci a donné lieu à de nouveaux essais qui sont présentés dans le paragraphe suivant.

III. Influence de la durée de dépôt sur les performances photocatalytiques et bactéricide

bactéricide avec la durée de dépôt. Une fois les paramètres optimisés, la suite des dépôts sera réalisée sur un autre type de substrat, classiquement rencontré dans les IAA.

B. Article

*Effect of titanium dioxide film thickness on photocatalytic and bactericidal activities against *Listeria monocytogenes**

Marion Barthomeuf, Xavier Castel, Laurent Le Gendre, Martine Denis & Christine Pissavin

Cet article sera soumis dans *Photochemistry and Photobiology*.

Effect of Titanium Dioxide Film Thickness on Photocatalytic and Bactericidal Activities against *Listeria Monocytogenes*

Marion Barthomeuf¹, Xavier Castel², Laurent Le Gendre², Martine Denis³, Christine Pissavin*¹

¹. Département Génie Biologique, IUT de Saint-Brieuc – Université de Rennes 1, 22004 Saint-Brieuc cedex 1, France

². Institut d'Electronique et de Télécommunications de Rennes, IETR UMR-CNRS 6164, Equipe FunMAT, IUT de Saint-Brieuc - Université de Rennes 1, 22004 Saint-Brieuc cedex 1, France

³. Anses – Laboratoire de Ploufragan-Plouzané / Unité Hygiène et Qualité des Produits Avicoles et Porcins, 22440 Ploufragan, France

*Corresponding author e-mail: christine.pissavin@univ-rennes1.fr (Christine
Pissavin)

ABSTRACT

In this work, structural, microstructural and bactericidal surface properties of TiO₂-coated glass substrates elaborated by reactive RF-sputtering are investigated. As pathogenic bacteria in biofilms are a major concern in food industries due to their growing resistance to cleaning and sanitizing procedures, the development of photoactive surfaces exhibiting bactericidal properties is acknowledged as an effective approach to tackle bacterial contaminations. The principal aim of the present work concerns the study of the photoactive top-layer thickness impact (from 80 nm to

layers is photoinduced through the formation of reactive oxygen species (ROS) when irradiated by light energy higher than the band gap value (11). Among chemically stable, non-toxic and cost-effective materials, titanium dioxide (TiO₂) has been widely studied as semiconducting oxide for a large range of photocatalytic applications (12). TiO₂ material exhibits different crystalline phases: anatase, rutile and brookite. Rutile is thermodynamically stable, while anatase and brookite phases are in metastable states (13). Among the three crystalline phases, anatase presents the highest photocatalytic and bactericidal activity (14, 15). When TiO₂ is irradiated by UV light, it produces pairs of electrons and holes. These either recombine, or migrate to the surface of the catalyst where they can participate in oxidation and reduction reactions by generating strong oxidative radicals (hydroxyl radicals, superoxide anions and hydrogen peroxide) that decompose organic compounds (16–18). Therefore, TiO₂ can be used as a photocatalytic antibacterial material: it combines chemical stability, biocompatibility and high potential for self-cleaning. That way, TiO₂-assisted photocatalytic disinfection, purification or clean-up processes have been evaluated on a wide range of organisms, including viruses, bacteria, fungi and algae (19–22).

Photocatalysts are conventionally available in powder form which makes the catalyst particles removal very difficult and expensive once work has been completed. This drawback can be overcome by immobilizing the catalyst onto or as a surface, at the expense of its developed corrugated surface (16, 23). TiO₂ photocatalytic coatings can be elaborated by various techniques, such as sol-gel process (24), chemical vapor deposition (25) and sputtering deposition methods (26). Radiofrequency (RF) and direct current (DC) sputtering are ones of the most available methods, frequently used in mass production due to their high deposition rates, high reliability, moderate running costs and possibility of covering a large range of substrate types (27).

In this work, titanium dioxide thin films with various thicknesses were grown by RF magnetron sputtering technique on glass substrates to investigate the effect of the TiO₂ film thickness on the photocatalytic and bactericidal activities. Transparent substrates have been especially selected in the present study to extract the intrinsic optical characteristics of the photoactive coatings. The elaborated samples have been tested against the relevant food-borne pathogen *L. monocytogenes*.

MATERIALS AND METHODS

Bacterial strain: Two strains of *L. monocytogenes* were considered in the present study: the *L. monocytogenes* ScottA reference strain (28) and the ECL 136 environmental strain sampled in a food plant (29). Each strain was stored at -70°C in Brain Heart Infusion (BHI) broth (Biokar, France) containing 40% (v/v) of glycerol.

After the strain culture on Plate Count Agar (PCA) for 18 hours at 37°C, one colony was placed into BHI broth for 7 hours, as a pre-culture, at 37°C. Using the pre-culture, the appropriate broth was inoculated for an overnight sub-culture. After this, the bacterial suspension concentration was adjusted to 10⁸ CFU/mL by measuring its optical density at 600 nm, and confirmed by enumeration on BHI. Then, 50 µL of these suspensions have been loaded onto TiO₂ thin film to assess the sensitivity of the strains to UVA (365 nm) and to measure the bactericidal activity.

TiO₂ film elaboration: TiO₂ thin films were deposited on (50 mm × 50 mm × 0.7 mm) soda-lime glass substrates by RF magnetron sputtering technique (30, 31). The deposition chamber (Plassys MP 450S) that contained a titanium metal target (100.4 mm diameter, 99.995% purity) was pumped down to 5 × 10⁻⁵ Pa by a turbomolecular rotary pump system. The distance between the target and the substrate was set at 80 mm. Glass substrates were first cleaned in an alkaline lye at 60°C for 15 min, rinsed copiously with deionized water (10 min) and dried under a steam of dry nitrogen. The glass substrate, clamped on a sample holder, was then introduced in the deposition chamber via a loadlock chamber. The titanium target was supplied with RF power through an automatic matching network. Before each deposition step, the target was pre-sputtered in pure argon (Ar) atmosphere (2.75 Pa) under 50 W RF power for 10 min to remove any target surface contaminates. Then a mixture of argon (Ar) and oxygen (O₂) gas was bled into the sputtering chamber and adjusted by two mass flow controllers. The different parameters during TiO₂ deposition were set as follows: RF power: 200 W, substrate temperature: 440°C, O₂/Ar volume ratio: 3% and working pressure: 2.75 Pa. In order to obtain different film thicknesses, six deposition times: 60, 120, 180, 240, 300 and 360 min were used. The elaborated films are denoted in the present paper by TiO₂-film thickness, such as TiO₂-80nm (film thickness d = 80 nm and sputtering time = 60 min). After deposition, each sample was cleaved into coupons of 1cm×1cm each.

Physical characterizations of the TiO₂ thin films: A standard 4-point probe configuration, with a 225 Keithley current source and a 7050 Schlumberger microvoltmeter, provides the sheet resistance RS at room temperature.

Optical transmittance was recorded by a UV–Visible spectrophotometer (Perkin Elmer Lambda 20 (Waltham, MA, USA), scanning speed 240 nm/min, 2 nm width slit) in the 200–1100 nm spectral range at normal incidence. The UV–Visible spectrophotometer was previously calibrated with air (blank). In region of strong

absorption, the transmittance of the thin film T is expressed in terms of absorption coefficient

Bactericidal activity

For bactericidal activity measurements, coupons of glass (negative controls) and coupons coated with TiO₂ thin layers (1 cm² in size) were placed into wells of a 24-well microplate. Then 50 µL of the prepared bacterial suspension were loaded onto the surface of each coupon. All coupons were incubated at 20°C for 3 hours to provide bacterial adhesion. The incubation was done in a wet atmosphere to avoid any drying effect of the coupons. After the adhesion step, half of the coupons was exposed to UVA radiations (365 nm, 20 min, 2 cm distance between coupons and UVA lamp); the other coupons were placed in the dark.

The bactericidal activity of the TiO₂-coated samples was assessed by two different ways: by enumerating the surviving bacterial cells and by observing the morphology of the cells anchored on the coupon surface by SEM.

For the enumeration of the surviving bacterial cells, coupons with adherent cells were first washed twice with saline solution and placed in 2 mL of saline solution for sonication at 47 kHz for 20 min (Ultrasonic Bath 3210, Branson, USA) to take off adherent cells. Cultivable cells were then enumerated on BHI agar plates after 48 hours at 37°C.

The decadic logarithm of reduction, i.e. $\log(N/N_0)$ was computed, where N_0 is the number of bacteria deposited onto coupons expressed in CFU, and N is the number of cultivable bacteria after treatment expressed in CFU.

For the morphology observation of the cells anchored on the coupon surface by SEM, coupons with adherent cells were immersed in a 3% glutaraldehyde solution prepared in 0.1M phosphate buffer for 1 hour to allow fixation of the cells. Then, coupons were washed twice with saline water and immersed in successive ethanol baths with increasing percentage in vol.: 50%, 75% and 90% for 5 min each and ethanol at 100% for 30 min. Finally, ethanol was replaced using a hexamethyldisilazane (HMDS) (Sigma-Aldrich, France) gradient at 50%, 75% in vol. for 10 min each and 100% for 30 min. HMDS is a drying agent and is used as a good alternative to Critical Point Drying for SEM sample preparation (35). At the end, the coupons were dried at room temperature during 24 hours for final SEM observation.

Statistical analysis

Statistical tests were carried out by using a two sample Student t-test with the same variance (XL Stats, free version, Addinsoft) and “R” software. Significant differences were indicated for each treatment ($p < 0.05$).

RESULTS

Characterization of the TiO₂ thin films

Six TiO₂ thin films have been elaborated by RF sputtering according to various deposition times (from 1 to 6 hours) with the same substrate temperature and partial pressure of oxygen

in argon (Table 1). A deposition rate of 1.33 nm/min has been obtained with the sputtering parameters as reported in Table 1. The sheet resistance (R_S) of the samples, measured at room temperature, is equal to $R_S = +\infty$, indicating the electrical insulating behaviour of the TiO₂ films.

Table 1: Deposition parameters and characteristics of the TiO₂ thin films.

Layer ID	Deposition time (min)	Substrate temperature (°C)	O ₂ /Ar ratio (%)	Thickness d (nm)	Crystalline phase	Band gap EG (eV)	Photocatalytic activity (% of MB discoloration after 60 min of UVA illumination)
TiO ₂ -80nm	60	440	3	80	Anatase	3.30	23.2
TiO ₂ -170nm	120	440	3	170	Anatase	3.25	36.6
TiO ₂ -240nm	180	440	3	240	Anatase	3.30	50.4
TiO ₂ -310nm	240	440	3	310	Anatase/Rutile	3.25	64.1
TiO ₂ -400nm	300	440	3	400	Anatase/Rutile	3.15	89.1
TiO ₂ -480nm	360	440	3	480	Anatase/Rutile	3.20	87.1

The TiO₂ phases were identified by XRD. Figure 1 presents the XRD patterns according to the TiO₂ films thickness. On one hand, a permanent signature of the anatase phase (main peak at 2

Figure 2 shows the surface morphology of the TiO₂ thin films observed by SEM according to the film thickness too. SEM images exhibit uniform distribution of nanometric grains and are crack free.

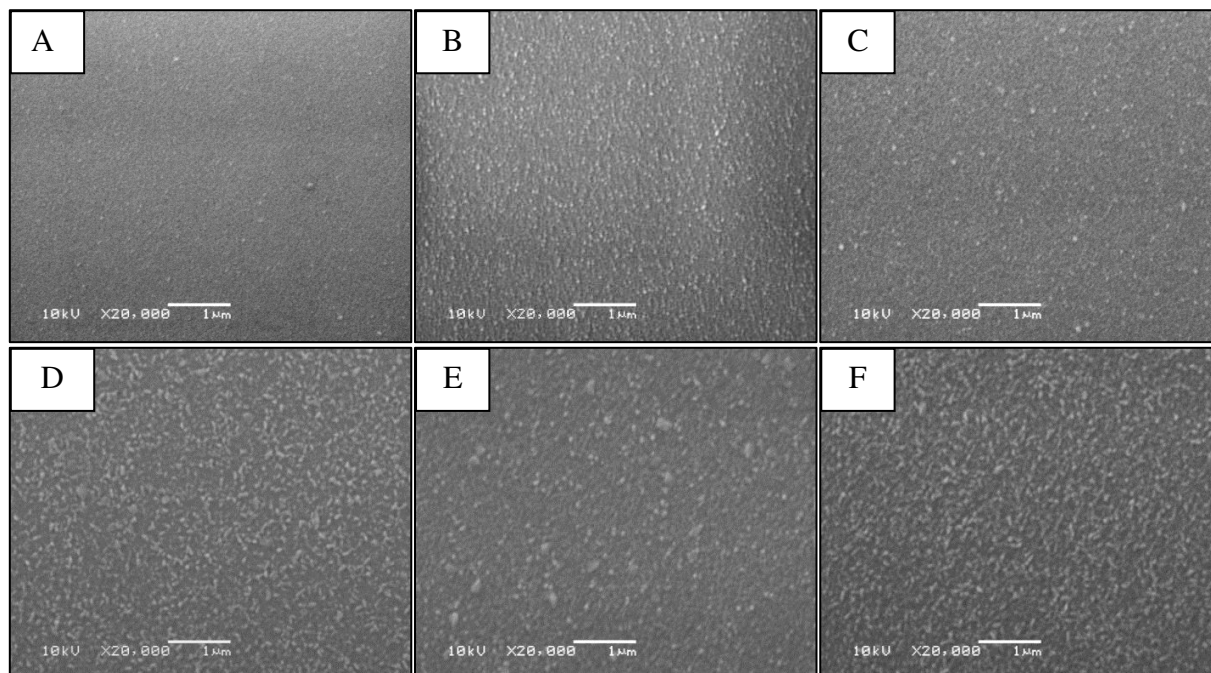


Figure 2: Surface morphology of TiO₂ thin films observed by Scanning Electron Microscopy (

To assess the optical properties of the TiO₂ films, optical transmission spectra of the samples have been recorded in air (data not shown) and the band gap E_g has been computed. E_g values of the thinner films are slightly higher than that of the thicker films. As the reported band-gap values of the pure anatase and rutile phases are in the range [3.3 - 3.2 eV] and [3.1 - 3.0 eV] respectively (32,36,37), the decrease of the optical band gap versus the thickness supports the phase evolution from anatase to rutile, as observed on XRD patterns (Figure 1).

Photocatalytic properties of the TiO₂ coatings

The decrease of the methylene blue absorbance at 650 nm according to illumination time is presented in Figure 3. The six TiO₂ thin films exhibit a significant MB discoloration rate after 60 min of UVA illumination (Student test; $p < 0.$) compared with the samples without UVA activation and with the glass bare (Figure 3A). An exponential decrease is observed and suggests first-order kinetics. According to the $-\ln(A/A_0) = kt$ equation, a straight line is fitted to the data and the apparent first-order constant k is retrieved from the slope (Figure 3B). As the TiO₂ thin film thickness increases, the MB discoloration rate increases too. The degradation rate saturates above the 400 nm film thickness value.

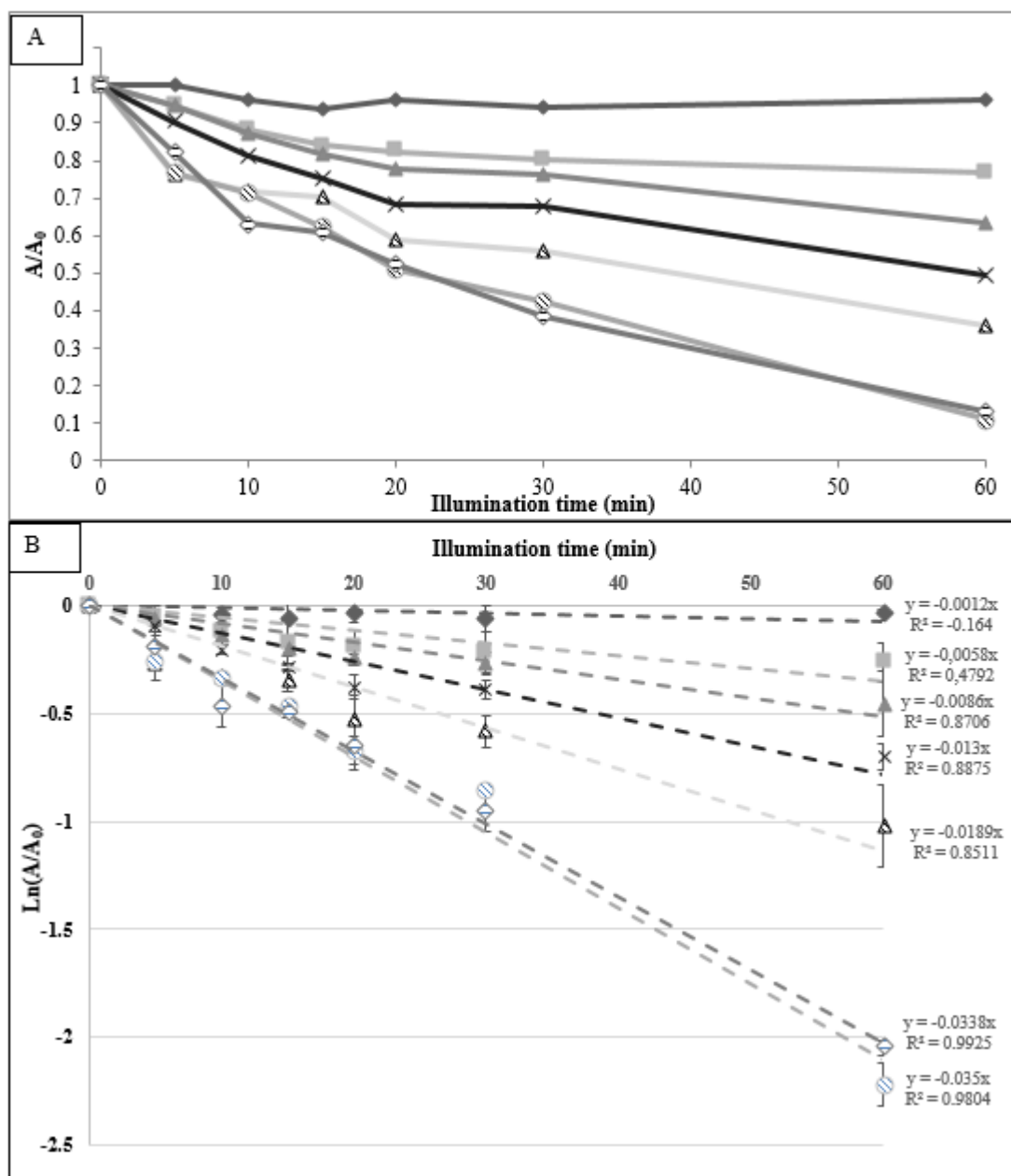


Figure 3: Effect of film thickness on photocatalytic discoloration of methylene blue. A) Absorbance of the methylene blue is related to the initial value according to UVA irradiation time. B) Logarithm of the absorbance ratio of methylene blue. First order linear kinetics. The value is a mean of 3 measurements. Bare glass substrate (◆); TiO₂-80nm (■); TiO₂-170nm (▲); TiO₂-240nm (×); TiO₂-310nm (△); TiO₂-400nm (○); TiO₂-480nm (◇).

Bactericidal properties of the TiO₂ coatings

The anti-bacteria tests was carried out on the two strains of *L. monocytogenes* to determine the inactivation performance of the six TiO₂ coatings grown on glass substrates. The results of bactericidal assays, with and without UVA illumination, and using the bare glass substrate as negative control, are presented in Figure 4. The measurements undertaken on the bare glass

substrate exhibit no significant bactericidal effect on both strains of *L. monocytogenes* in the dark and under UVA illumination (Figure 4).

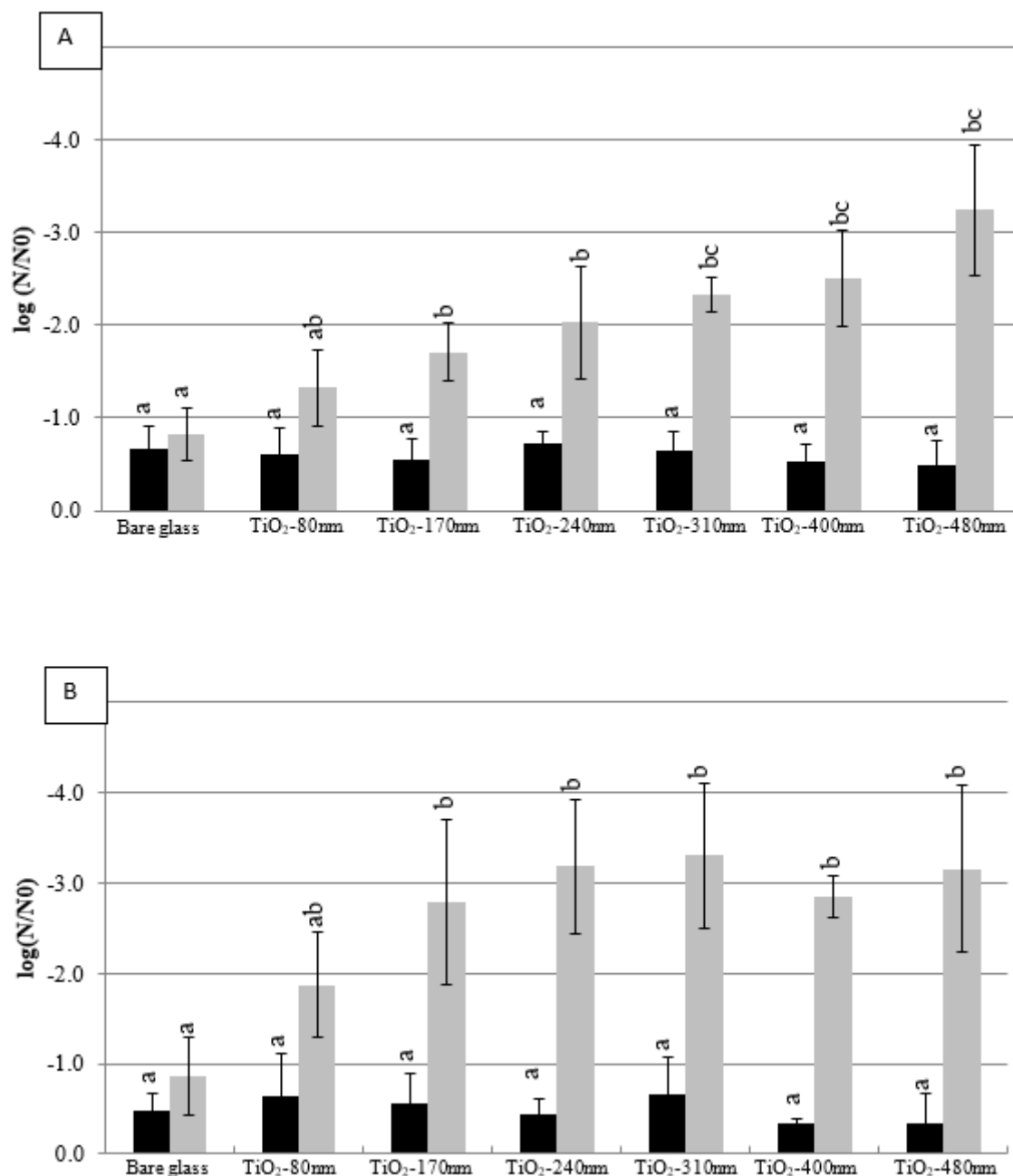


Figure 4: Influence of the TiO₂ coatings and UVA illumination on cell viability of 2 bacterial strains A) *L. monocytogenes* ScottA; B) *L. monocytogenes* ECL136. Surviving cells are numerated on agar plates, N₀ is the cell number deposited onto the coupon and N the number of surviving cells after 3 hours and subsequent irradiation or not. Activity of TiO₂ under UVA radiations (20 min) (■) is measured and compared with that measured in the dark (■) and with the bare glass (negative control). Data reported here are the mean values of three replicates +/- standard deviation. Means with different lowercase letters differ significantly (p<0.05).

Without UVA radiation, the number of adherent cells is similar over all samples, on the bare glass coupons as well as on the TiO₂ coatings whatever their thickness. On both strains, the

difference in the bacteria natural ability to survive on the bare glass substrate, with or without UVA illumination, is not significant (Student test, $p > 0.05$). The bacteria adhesion on the coupons is not any more affected by the TiO_2 coatings, as shown by the measurements in the dark (Figure 4).

Figure 5: Variation of log reduction of adherent cells onto TiO_2 coatings after UVA activation versus TiO_2 thickness. Rectangles on the figure associate the XRD results. (○) *Listeria monocytogenes* ScottA; (●) *Listeria monocytogenes* ECL136.

After photoactivation with UVA radiations for 20 min, TiO_2 coatings as a whole provide a strong bactericidal effect on both strains. On *L. monocytogenes* ScottA (Figure 4 A), the number of adherent bacteria decreases gradually with the increase of the TiO_2 thickness. That way, a reduction in the number of surviving cells of 2.5 log is obtained with the 480 nm-thick TiO_2 coating. On *L. monocytogenes* ECL136 (Figure 4 B), the photocatalytic efficiency of the active coating increases from the first few tens of nanometer and reaches a saturation point with a TiO_2 thickness close to 240 nm, corresponding to a similar efficiency (2.5 log) measured on the previous reference strain with the thicker TiO_2 coating (d

Figure 6: SEM observations (

Heikkilä et al., in 2009, also conclude that grains and surface roughness increase toward the TiO₂ film thickness (23).

Using our sputtering parameters, TiO₂ thin films exhibit an anatase structure at low thicknesses (d thinner than ≈ 240 nm) whereas the crystalline phase evolves towards a combination of anatase and rutile structures with the thicker films. Such dual structure could help to achieve a better efficiency in bactericidal activity. Indeed many studies have previously underlined a higher photocatalytic performance in a wide range of applications (self-cleaning surfaces, air and water purification, H₂ production by water splitting...) when TiO₂ provides a mixture of anatase and rutile structures (39) as found in the commercially available titania photocatalyst Degussa P25 (14, 15, 40). Under UV light, while anatase-type TiO₂ powders or thin films always exhibit an antibacterial activity on various types of bacteria (41–44) rutile-type titanium dioxide phase demonstrates no bactericidal activity (15, 16, 42, 45), unless the film is fully {111}-oriented (46). Conversely, under the visible light, while the detrimental effect of the anatase phase on the survival of the bacteria is non-existent (47) or limited (48), the rutile structure takes over the activity (47–49). As the rutile phase exhibits a lower band-gap value than that of the anatase, its ability to use the blue part of the visible spectrum explains in part this behaviour. Moreover, ROS types, natures and quantities, depend on both titanium dioxide structure and radiation wavelengths. That way, it has been shown that under UV illumination, the activity of anatase materials is primarily related to the efficient production of •OH species (50) while visible light illumination largely enhances •O₂-formation on rutile surfaces (45, 50). One must also keep in mind that the exact composition of the ROS mixture formed as well as its reactivity depends not only on the structure and texture of the photocatalyst, but also on the bacteria-type itself. In the present study, TiO₂ coatings thicker than 240 nm, composed of anatase and rutile phases, exhibit the best photocatalytic and bactericidal activities. The kinetic data retrieved from the photocatalytic degradation of MB can be correlated with the bactericidal performance. The photocatalytic activity of our TiO₂ coatings with thicknesses up to 400 nm, allowed more than 90% of MB discoloration in one hour. Commercial Degussa P25®, tested by Barnes et al. in 2013, provided 76% of discoloration rate after one hour exposure under UVA radiations at 365 nm (51). Moreover Heikkilä et al. also grew TiO₂ thin films by Atomic Layer Deposition (ALD) technique (23). Their anatase-TiO₂ films with various thicknesses (from 50 to 520 nm) caused MB discoloration, around 10%, after 60 min-UVA irradiation. As we observed above, Heikkilä et al. showed an exponential decrease, which suggests first-order kinetics. Initial MB concentration, temperature, TiO₂ concentration and form, illumination wavelength have been shown to influence the photocatalytic activity and especially the kinetics rate (52). Comparison of kinetics rate is therefore difficult because of the spread in the initial settings.

TiO₂ photocatalysts as fine particles have already been studied to fight against bacteria in various environments such as medical environments (53, 54), water disinfection field (55–58)

or food plants (19, 20). However, the use of TiO₂ suspension presents a disadvantage in the postcatalytic catalyst removal (17, 59). In food plants, an alternative way concerns the development of stable coatings through thin film deposition. In the present work, RF magnetron sputtering technique has been used to grow TiO₂ thin films with different thicknesses. This type of functionalized materials aims at enhancing the fight against the first step of biofilm formation, by preventing the bacteria adhesion. For this purpose, the TiO₂ thin films have been tested against adherent *L. monocytogenes* bacteria and not against mature biofilms (19, 60). Unfortunately these TiO₂ coatings do not provide any anti-adhesive property, since no difference has been observed between the number of bacteria grown on the bare glass substrates and those grown on the TiO₂ coatings without UVA illumination. Similarly, Chorianopoulos and co-workers did not obtain any anti-adhesive effect on the *L. monocytogenes* ScottA bacteria grown onto glass coated with TiO₂ layers, without UVA irradiation (19).

After UVA activation of the TiO₂ layers, the surfaces present a strong bactericidal activity against both *L. monocytogenes* strains. This bactericidal effect can be related to the thickness of the TiO₂ layer and also to the TiO₂ crystalline phase as depicted in Figure 5. Indeed, apparition of the rutile phase, in addition to the anatase one, in TiO₂ films thicker than 240 nm seems to be linked to for the saturation effect undergone by the environmental strain *L. monocytogenes* ECL136.

Active species (ROS) produced by the photocatalytic TiO₂ coating affects the cell wall integrity as observed by SEM, while direct UVA radiations do not affect their cell morphology. Indeed, UV radiations may damage DNA and cause mutations (61). UV resistance of bacteria differs between species and also depends on the age of organisms, growth stage and also bacterial form (biofilm or adherent cells) (31, 62, 63). In general, Gram-positive bacteria tend to be more resistant to UV radiations than Gram-negative bacteria (31, 61).

In conclusion, TiO₂ coatings deposited by RF sputtering technique on glass substrates and activated by UVA illumination exhibit bactericidal activity against the foodborne pathogen *L. monocytogenes*. Indeed a significant reduction of the adherent cells after 20 min of UVA exposure has been measured. 240 nm-thick TiO₂ coating is sufficient to promote optimal bactericidal activity against *L. monocytogenes* ECL316 whereas thicker films (>500 nm) are needed against *L. monocytogenes* ScottA. The TiO₂ surface functionalization paves the way to improve cleanability and disinfection in food industry environments. Work is under progress to grow such TiO₂ thin films onto stainless steel substrates in order to be applied in food plants.

ACKNOWLEDGMENTS

This work was supported by the European Union through the European Regional Development Fund (ERDF), the Ministry of Higher Education and Research, the “Région Bretagne”, through the CPER Projects 2015-2020 MATECOM and SOPHIE/STIC & Ondes, and by a grant from “Saint-Brieuc Armor Agglomération” and the “Conseil Départemental des Côtes d’Armor”. We thank Stéphanie Bougeard for her help in statistical analysis and Maël Visdeloup for his technical support, Nyedna Policarpo and Maël Visdeloup for their technical support.

REFERENCES

1. Trachoo N. 2003. Biofilms and the food industry. *Songklanakarin J. Sci. Technol.* 25(6):807–15
2. Abdallah M, Benoliel C, Drider D, Dhulster P, Chihib N-E. 2014. Biofilm formation and persistence on abiotic surfaces in the context of food and medical environments. *Arch. Microbiol.* 196(7):453–72
3. Gil MI, Selma MV, López-Gálvez F, Allende A. 2009. Fresh-cut product sanitation and wash water disinfection: Problems and solutions. *Int. J. Food Microbiol.* 134(1–2):37–45
4. Ibusquiza PS, Herrera JJR, Cabo ML. 2011. Resistance to benzalkonium chloride, peracetic acid and nisin during formation of mature biofilms by *Listeria monocytogenes*. *Food Microbiol.* 28(3):418–25
5. Soumet C, Méheust D, Pissavin C, Le Grandois P, Frémaux B, et al. 2016. Reduced susceptibilities to biocides and resistance to antibiotics in food-associated bacteria following exposure to quaternary ammonium compounds. *J. Appl. Microbiol.* 121(5):1275–81
6. Colagiorgi A, Di Ciccio P, Zanardi E, Ghidini S, Ianieri A. 2016. A Look inside the *Listeria monocytogenes* Biofilms Extracellular Matrix. *Microorganisms.* 4(3):1-12
7. Pilchova T, Hernould M, Prévost H, Demnerova K, Pazlarova J, Tresse O. 2014. Influence of food processing environments on structure initiation of static biofilm of *Listeria monocytogenes*. *Food Control.* 35:366–72
8. Bridier A, Sanchez-Vizueté P, Guilbaud M, Piard J-C, Naïtali M, Briandet R. 2015. Biofilm-associated persistence of food-borne pathogens. *Spec. Issue Predict. Model. Food.* 45, Part B:167–78
9. Carpentier B, Cerf O. 1993. Biofilms and their consequences, with particular reference to hygiene in the food industry. *J Appl Bacteriol.* 75(6):499–511
10. Reis-Teixeira FB dos, Alves VF, Martinis ECP de. 2017. Growth, viability and architecture of biofilms of *Listeria monocytogenes* formed on abiotic surfaces. *Braz. J. Microbiol.* 48(3) :587–591.
11. Joost U, Juganson K, Visnapuu M, Mortimer M, Kahru A, et al. 2015. Photocatalytic antibacterial activity of nano-TiO₂ (anatase)-based thin films: Effects on *Escherichia coli* cells and fatty acids. *J. Photochem. Photobiol. B.* 142(Supplement C):178–85

12. Nakata K, Fujishima A. 2012. TiO₂ photocatalysis: Design and applications. *J. Photochem. Photobiol. C Photochem. Rev.* 13:169–89
13. Gopal M, Chan WJM, Jonghe LCD. 1997. Room temperature synthesis of crystalline metal oxides. *J. Mater. Sci.* 32(22):6001–8
14. Navabpour P, Cooke K, Sun H. 2017. Photocatalytic Properties of Doped TiO₂ Coatings Deposited Using Reactive Magnetron Sputtering. *Coatings.* 7(1):433–49
15. Sirimahachai U, Phongpaichit S, Wongnawa S. 2009. Evaluation of bactericidal activity of TiO₂ photocatalysts: a comparative study of laboratory-made and commercial TiO₂ samples. *Songklanakarin J. Sci. Technol.* 31(5):517–25
16. Miao L, Tanemura S, Kondo Y, Iwata M, Toh S, Kaneko K. 2004. Microstructure and bactericidal ability of photocatalytic TiO₂ thin films prepared by RF helicon magnetron sputtering. *Appl. Surf. Sci.* 238(1–4):125–31
17. Ede S, Hafner L, Dunlop P, Byrne J, Will G. 2012. Photocatalytic disinfection of bacterial pollutants using suspended and immobilized TiO₂ powders. *Photochem. Photobiol.* 88(3):728–35
18. Nosaka Y, Nosaka AY. 2017. Generation and Detection of Reactive Oxygen Species in Photocatalysis. *Chem. Rev.* 117(17):11302–36
19. Chorianopoulos NG, Tsoukleris DS, Panagou EZ, Falaras P, Nychas GJ. 2011. Use of titanium dioxide (TiO₂) photocatalysts as alternative means for *Listeria monocytogenes* biofilm disinfection in food processing. *Food Microbiol.* 28(1):164–70
20. Kim B, Kim D, Cho D, Cho S. 2003. Bactericidal effect of TiO₂ photocatalyst on selected food-borne pathogenic bacteria. *Chemosphere.* 52(1):277–81
21. Thabet S, Weiss-Gayet M, Dappozze F, Cotton P, Guillard C. 2013. Photocatalysis on yeast cells: Toward targets and mechanisms. *Appl. Catal. B Environ.* 140–141:169–78
22. Gogniat G, Thyssen M, Denis M, Pulgarin C, Dukan S. 2006. The bactericidal effect of TiO₂ photocatalysis involves adsorption onto catalyst and the loss of membrane integrity. *FEMS Microbiol. Lett.* 258(1):18–24
23. Heikkilä M, Puukilainen E, Ritala M, Leskelä M. 2009. Effect of thickness of ALD grown TiO₂ films on photoelectrocatalysis. *J. Photochem. Photobiol. Chem.* 204(2–3):200–208
24. Calabria A. J, Vasconcelos WL, Daniel DJ, Chater R, McPhail D, Boccaccini AR. 2010. Synthesis of sol–gel titania bactericide coatings on adobe brick. *Constr. Build. Mater.* 24(3):384–89
25. Bessergenev VG, Mateus MC, Morgado IM, Hantusch M, Burkel E. 2017. Photocatalytic reactor, CVD technology of its preparation and water purification from pharmaceutical drugs and agricultural pesticides. *Chem. Eng. J.* 312(Supplement C):306–16
26. Singh J, Khan SA, Shah J, Kotnala RK, Mohapatra S. 2017. Nanostructured TiO₂ thin films prepared by RF magnetron sputtering for photocatalytic applications. *Appl. Surf. Sci.* 422(Supplement C):953–61

27. Ferraris S, Perero S. 2016. 2 - Smart and composite inorganic coatings obtained by sputtering: A promising solution for numerous application fields. *Smart Composite Coatings and Membranes*, ed MF Montemor, pp. 33–60. Woodhead Publishing
28. Fleming DW, Cochi SL, MacDonald KL, Brondum J, Hayes PS, et al. 1985. Pasteurized Milk as a Vehicle of Infection in an Outbreak of Listeriosis. *N. Engl. J. Med.* 312(7):404–7
29. Chasseignaux E, Gérault P, Toquin M-T, Salvat G, Colin P, Ermel G. 2002. Ecology of *Listeria monocytogenes* in the environment of raw poultry meat and raw pork meat processing plants. *FEMS Microbiol. Lett.* 210(2):271–75
30. Le Paven C, L. Le Gendre, R. Benzerga, F. Chevir , F. Tessier, et al. 2015. Growth of (Sr,La)-(Ta,Ti)-O-N perovskite oxide and oxynitride films by radiofrequency magnetron sputtering: Influence of the reactive atmosphere on the film structure. *J. Cryst. Growth.* 413:5–11
31. Barthomeuf M, Raymond P, Policarpo N, Castel X, Le Gendre L, et al. 2017. Bactericidal efficiency of UVA-active titanium dioxide thin layers on bacteria from food industry environments. *Mater. Technol. Adv. Perform. Mater.* DOI: 10.1080/10667857.2017.1363143
32. Tang H, Prasad K, Sanjinès R, Schmid PE, Lévy F. 1994. Electrical and optical properties of TiO₂ anatase thin films. *J. Appl. Phys.* 75:2042–47
33. Barka-Bouaifel F, Makaoui K, Jouan P-Y, Castel X, Bezzi N, et al. 2012. Preparation and photocatalytic properties of quartz/gold nanostructures/TiO₂ lamellar structures. *RSC Adv.* 2(32):12482–88
34. Fu P, Luan Y, Dai X. 2004. Preparation of activated carbon fibers supported TiO₂ photocatalyst and evaluation of its photocatalytic reactivity. *J. Mol. Catal. -Chem.* 221(1):81–88
35. Hazrin-Chong NH, Manefield M. 2012. An alternative SEM drying method using hexamethyldisilazane (HMDS) for microbial cell attachment studies on sub-bituminous coal. *J. Microbiol. Methods.* 90(2):96–99
36. Aarik J, Aidla A, Kiisler A-A, Uustare T, Sammelselg V. 1997. Effect of crystal structure on optical properties of TiO₂ films grown by atomic layer deposition. *Thin Solid Films.* 305(1):270–73
37. Daude N, Gout C, Jouanin C. 1977. Electronic band structure of titanium dioxide. *Phys. Rev. B.* 15(6):3229–35
38. Nair PB, Justinictor VB, Daniel GP, Joy K, James Raju KC, et al. 2014. Optical parameters induced by phase transformation in RF magnetron sputtered TiO₂ nanostructured thin films. *Prog. Nat. Sci. Mater. Int.* 24(3):218–25
39. Yuangpho N, Le STT, Treerujiraphapong T, Khanitchaidecha W, Nakaruk A. 2015. Enhanced photocatalytic performance of TiO₂ particles via effect of anatase–rutile ratio. *Phys. E Low-Dimens. Syst. Nanostructures.* 67(Supplement C):18–22

40. van der Meulen T, Mattson A, Österlund L. 2007. A comparative study of the photocatalytic oxidation of propane on anatase, rutile, and mixed-phase anatase–rutile TiO₂ nanoparticles: Role of surface intermediates. *J. Catal.* 251(1):131–44
41. Cheng TC, Yao KS, Yeh N, Chang CI, Hsu HC, et al. 2011. Bactericidal effect of blue LED light irradiated TiO₂/Fe₃O₄ particles on fish pathogen in seawater. *Thin Solid Films.* 519(15):5002–6
42. Joo H-C, Lim Y-J, Kim M-J, Kwon H-B, Han J-H. 2010. Characterization on titanium surfaces and its effect on photocatalytic bactericidal activity. *Appl. Surf. Sci.* 257(3):741–46
43. Sisti L, Cruciani L, Totaro G, Vannini M, Berti C, et al. 2012. TiO₂ deposition on the surface of activated fluoropolymer substrate. *Thin Solid Films.* 520:2824–28
44. Lee HU, Lee SC, Lee SM, Lee JW, Kim HJ, Lee J. 2013. Improved photocatalytic and antibacterial activities of three-dimensional polycrystalline anatase TiO₂ photocatalysts. *Appl. Catal. Gen.* 467:394–99
45. Perelshtein I, Applerot G, Perkas N, Grinblat J, Gedanken A. 2012. A one-step process for the antimicrobial finishing of textiles with crystalline TiO₂ nanoparticles. *Chem. Weinh. Bergstr. Ger.* 18(15):4575–82
46. Liu X, Zhang H, Liu C, Chen J, Li G, et al. 2014. UV and visible light photoelectrocatalytic bactericidal performance of 100% {111} faceted rutile TiO₂ photoanode. *Catal. Today.* 224:77–82
47. Veréb G, Manczinger L, Bozsó G, Sienkiewicz A, Forró L, et al. 2013. Comparison of the photocatalytic efficiencies of bare and doped rutile and anatase TiO₂ photocatalysts under visible light for phenol degradation and E. coli inactivation. *Appl. Catal. B Environ.* 129:566–74
48. Rincon AG, Pulgarin C. 2003. Photocatalytical inactivation of E. coli: effect of (continuous-intermittent) light intensity and of (suspended-fixed) TiO₂ concentration. *Appl. Catal. B-Environ.* 44(3):263–84
49. Kim C-H, Lee E-S, Kang S-M, de Josselin de Jong E, Kim B-I. 2017. Bactericidal effect of the photocatalytic reaction of titanium dioxide using visible wavelengths on Streptococcus mutans biofilm. *Photodiagnosis Photodyn. Ther.* 18:279–83
50. Zoltan T, Rosales MC, Yadarola C. 2016. Reactive oxygen species quantification and their correlation with the photocatalytic activity of TiO₂ (anatase and rutile) sensitized with asymmetric porphyrins. *J. Environ. Chem. Eng.* 4(4):3967–80
51. Barnes RJ, Molina R, Xu J, Dobson PJ, Thompson IP. 2013. Comparison of TiO₂ and ZnO nanoparticles for photocatalytic degradation of methylene blue and the correlated inactivation of gram-positive and gram-negative bacteria. *J. Nanoparticle Res.* 15(2):1–11
52. Wu C-H, Chern J-M. 2006. Kinetics of Photocatalytic Decomposition of Methylene Blue. *Ind. Eng. Chem. Res.* 45(19):6450–57
53. Campoccia D, Montanaro L, Arciola CR. 2013. A review of the biomaterials technologies for infection-resistant surfaces. *Biomaterials.* 34(34):8533–54

54. Yoshinari M, Oda Y, Kato T, Okuda K. 2001. Influence of surface modifications to titanium on antibacterial activity in vitro. *Biomaterials*. 22(14):2043–48
55. Claro EMT, Bidoia ED, de Moraes PB. 2016. A high-performance doped photocatalysts for inactivation of total coliforms in superficial waters using different sources of radiation. *J. Environ. Manage.* 177:264–70
56. Fisher MB, Keane DA, Fernández-Ibáñez P, Colreavy J, Hinder SJ, et al. 2013. Nitrogen and copper doped solar light active TiO₂ photocatalysts for water decontamination. *Appl. Catal. B Environ.* 130–131:8–13
57. Kaan CC, Aziz AA, Ibrahim S, Matheswaran M, Saravanan P. 2012. Heterogeneous Photocatalytic Oxidation an Effective Tool for Wastewater Treatment – A Review. *Studies on Wat. Manag. Issues, InTech*, 219–236
58. Robertson JMC, J. Robertson PK, Lawton LA. 2005. A comparison of the effectiveness of TiO₂ photocatalysis and UVA photolysis for the destruction of three pathogenic micro-organisms. *J. Photochem. Photobiol. Chem.* 175(1):51–56
59. Guillard C, Kartheuser B, Lacombe S. 2011. La photocatalyse : dépollution de l'eau ou de l'air et matériaux autonettoyants. *Tech. Ing. Génie Procédés Prot. Environ.* Base documentaire : TIB327DUO.
60. Carré G, Hamon E, Ennahar S, Estner M, Lett M-C, et al. 2014. TiO₂ Photocatalysis Damages Lipids and Proteins in *Escherichia coli*. *Appl. Environ. Microbiol.* 80(8):2573–81
61. Gailunas KM, Matak KE, Boyer RR, Alvarado CZ, Williams RC, Sumner SS. 2008. Use of UV light for the inactivation of *Listeria monocytogenes* and lactic acid bacteria species in recirculated chill brines. *J. Food Prot.* 71(3):629–33
62. Bonsaglia ECR, Silva NCC, Fernades Júnior A, Araújo Júnior JP, Tsunemi MH, Rall VLM. 2014. Production of biofilm by *Listeria monocytogenes* in different materials and temperatures. *Food Control.* 35(1):386–91
63. Vázquez-Sánchez D, Cabo ML, Ibusquiza PS, Rodríguez-Herrera JJ. 2014. Biofilm-forming ability and resistance to industrial disinfectants of *Staphylococcus aureus* isolated from fishery products. *Food Control.* 39:8–16

C. Conclusion

Augmenter la durée de dépôt avait pour objectif d'augmenter l'épaisseur de la couche mince de TiO_2 de référence développée dans la partie précédente. Ce paramètre est indispensable dans l'optimisation des couches minces afin de les rendre les plus photoactives et efficaces contre les bactéries adhérentes.

Six durées de dépôt ont été testées allant de 60 minutes à 360 minutes par palier de 60 minutes. Dans les conditions de dépôts fixées avec une puissance RF de 200 W, une pression de travail à 0,0276 mbar, une température dans l'enceinte à 440°C et un ratio d' O_2 de 3%, la vitesse de dépôt des couches minces de TiO_2 est de 80 nm/heure. Les tranches des différents échantillons ont été observées au MEB afin de mesurer leur épaisseur *via* un logiciel informatique. L'extraction de cette donnée est primordiale pour la détermination du band gap (E_g).

En ce qui concerne la morphologie de surface, les observations au MEB ont permis d'observer des surfaces uniformes présentant aucune craquelure. Ces surfaces peuvent être considérées comme lisses et ne semblent pas favoriser l'adhésion des bactéries. Bien qu'aucune mesure de rugosité n'ait été réalisée, il est cependant possible que la rugosité de surface augmente avec l'épaisseur. Ce phénomène a déjà pu être observé dans le cadre d'autres dépôts de TiO_2 (Heikkilä *et al.*, 2009).

Les couches minces de TiO_2 d'épaisseur croissante ont été analysées par DRX afin de connaître la nature de leur phase cristalline. Les couches minces de faible épaisseur, c'est-à-dire inférieure à 240 nm, présentent une structure anatase. Pour les couches minces d'épaisseur plus importante, la structure cristalline évolue vers un mélange des formes anatase et rutile. Ce type de structure représente un résultat particulièrement intéressant. En effet, à l'heure actuelle le TiO_2 le plus actif est un mélange des formes anatase et rutile avec par exemple le TiO_2 Degussa P25® (van der Meulen *et al.*, 2007; Sirimahachai *et al.*, 2009; Ede *et al.*, 2012; Luttrell *et al.*, 2014; Yuangpho *et al.*, 2015). Il semble également que du fait de la faible épaisseur des couches minces (<240 nm), la phase rutile pourrait être déjà présente mais non détectable par DRX.

Les valeurs de band-gap ont été déterminées après étude des propriétés optiques des couches minces. Ainsi, pour les couches minces les plus fines, la largeur de la bande interdite est plus importante que pour celle des couches minces les plus épaisses. Pour des phases pures d'anatase les valeurs classiques retrouvées dans la littérature sont comprises entre 3,3 et 3,2 eV, pour des phases pures de rutile la gamme comprend des valeurs entre 3,1 et 3,0 eV (Daude *et al.*, 1977; Tang *et al.*, 1994; Aarik *et al.*, 1997). Pour nos couches minces, la diminution des valeurs de band-gap avec l'augmentation de l'épaisseur est en accord avec l'apparition

d'un mélange des deux phases puisque l'apparition de la phase rutile réduit la largeur du band-gap.

L'activité photocatalytique sous illumination UVA des couches minces est croissante en suivant l'augmentation de l'épaisseur. Un seuil d'activité est atteint à partir de couches minces de TiO_2 supérieure à 400 nm. Ce phénomène avait déjà pu être observé par Heikkilä et ses collaborateurs (2009). Cependant, à ce jour, aucune étude n'a étudié l'impact de l'épaisseur de la couche mince sur l'effet antibactérien. L'augmentation de l'épaisseur des couches minces a permis d'améliorer l'action antibactérienne sous UVA contre les deux souches de *L. monocytogenes*, bien qu'aucun effet anti-adhésif n'ait pu être observé. Les deux souches testées ne présentent pas les mêmes profils de réponse par rapport à l'utilisation du TiO_2 . L'origine des souches, leurs caractéristiques peuvent expliquer ces différences de réponses aux couches minces de TiO_2 .

Enfin, les EROs produites à la surface de ces revêtements sont capables d'altérer les bactéries présentes. Il semble également possible que les EROs formées ne soient pas les mêmes en fonction de la nature de la phase cristalline des couches minces (Yan *et al.*, 2009; Perelshtein *et al.*, 2012; Veréb *et al.*, 2013; Zoltan *et al.*, 2016).

IV. Conclusion générale

Afin d'obtenir des couches minces de TiO_2 de forme cristalline, il a été nécessaire d'optimiser les paramètres et conditions de dépôt. Pour cela, cette étape a nécessité l'utilisation d'un substrat inerte chimiquement et surtout transparent. Cette caractéristique est primordiale pour la détermination de la valeur du band-gap.

Grâce aux conditions de dépôt fixées dans ce chapitre, des couches minces de TiO_2 sous forme cristalline ont été obtenues. Tout d'abord de forme uniquement anatase, les couches minces ont évolué vers un mélange de formes anatase et rutile lorsque leur épaisseur augmente.

Nos couches minces de TiO_2 déposées sur verre sodocalcique possèdent une activité photocatalytique importante, ainsi qu'un effet antibactérien sur différentes souches bactériennes provenant d'environnements d'industries agro-alimentaires et plus particulièrement issues de la filière carnée. Toutes les étapes d'amélioration ont permis de réduire la durée d'illumination sous UVA nécessaire pour obtenir un effet antibactérien significatif passant de 60 minutes à seulement 20 minutes.

La physiologie des bactéries suite à l'exposition aux couches minces de TiO_2 illuminées est altérée. Les membranes sont endommagées par l'action des EROs produites à

la surface du TiO_2 lorsqu'il est illuminé sous UVA. L'étude de ces mécanismes sera menée dans le chapitre V.

Cependant, ce matériau n'est pas retrouvé sous forme de surfaces dans les IAA. L'objectif final de ces travaux de thèse est d'obtenir un revêtement capable de lutter contre la présence de bactéries adhérentes sur les surfaces ouvertes dans les IAA. Pour cela, la nature de support de la couche mince représente également un paramètre d'optimisation des dépôts de couches minces. Ce paramètre sera développé dans le chapitre suivant.

Chapitre IV :

Étude de couches minces de TiO_2

déposées sur support d'acier

inoxydable AISI 316

I.	Contexte et objectifs	120
II.	Préparation des supports et conditions de dépôts	120
A.	<i>Acier inoxydable AISI 316.....</i>	<i>120</i>
B.	<i>Paramètres de dépôt des couches minces de TiO_2</i>	<i>121</i>
III.	Caractérisation physique des couches minces de TiO_2	126
A.	<i>Morphologie de surface.....</i>	<i>126</i>
B.	<i>Analyse par diffraction des rayons X</i>	<i>129</i>
IV.	Activité photocatalytique des couches minces de TiO_2	133
V.	Effet antibactérien sur les souches de <i>L. monocytogenes</i>	135
VI.	Conclusions	139

I. Contexte et objectifs

Ce chapitre est consacré à la détermination des paramètres de dépôt sur un nouveau support, l'inox 316. L'objectif de ce projet étant d'élaborer des matériaux antibactériens destinés aux IAA, des essais ont été réalisés pour transférer sur acier inoxydable les couches minces déposées précédemment sur verre.

L'acier inoxydable est rigide, résistant et tenace. Il s'agit de l'un des matériaux les plus employés dans l'industrie agroalimentaire. Il peut être mise en forme et usiné pour des besoins spécifiques d'un très grand nombre de domaines (transport, chimie, construction, énergie, santé, emballage ou IAA). Il existe sous différentes formes : feuilles, barres, tubes. Les avantages de l'acier inoxydable sont nombreux : résistance à la corrosion, résistance aux variations de température, antistatique, soudable, durable. De plus, l'acier inoxydable fait partie des rares matériaux utilisables pour produire des surfaces complexes et de grandes dimensions, hygiéniques car peu rugueuses, dures et inertes (Verran *et al.*, 2008).

Le changement de support pour les dépôts des couches minces est susceptible d'entraîner des modifications des paramètres de dépôts. En effet, il existe des différences notables entre le verre (matériau diélectrique amorphe) et l'acier inoxydable (matériau métallique polycristallin). La composition chimique des aciers recouvre plusieurs dizaines de nuances associant au fer et au carbone et différents éléments d'alliage. Parmi ceux-ci, on peut retrouver essentiellement le chrome, le nickel et le molybdène. Pour être classé dans la catégorie inoxydable, l'acier doit contenir au moins 10,5% de chrome et moins de 1,2% de carbone. L'acier inoxydable peut être retrouvé dans la production, le stockage et le transport de produits alimentaires.

II. Préparation des supports et conditions de dépôts

A. Acier inoxydable AISI 316

L'acier inoxydable utilisé provient du fournisseur GoodFellow. Il s'agit d'acier inoxydable AISI 316, appartenant à la famille des aciers inoxydables austéniques. Ce nom provient de la normalisation américaine AISI (*American Iron and Steel Institute*). Il est fourni sous forme de plaque de 300x300mm d'une épaisseur de 0,5 mm. Cet acier, fortement allié est composé de fer (>65% en masse), de chrome (16-19%), de nickel (9-13%) mais également de molybdène (1,5-3%). Le chrome est un élément clé Au contact du dioxygène de l'air, il se forme une couche d'oxyde de chrome, dense et adhérente qui protège l'acier d'une corrosion

destructive en profondeur. Ce film ultramince passif présent une épaisseur comprise entre 1 et 3 nm (Jip Kim et Mi Young, 2013). Le nickel vient, quant à lui, renforcer les propriétés de résistance chimique de la couche de surface qui permet d'assurer la stabilité et la solidité de l'acier inoxydable. Le molybdène augmente notablement la résistance à la corrosion. Il est conseillé pour l'utilisation d'acier inoxydable dans des environnements fortement pollués ou sales.

L'acier inoxydable présente une haute résistance mécanique. Il possède également une bonne tenue en température et une bonne résistance aux pressions. L'acier inoxydable 316 peut être utilisé dans des milieux considérés comme agressifs. Dans le cadre des IAA, l'acier inoxydable AISI 316 est utilisé, notamment en cas d'exposition aux milieux chlorés ou à des protocoles de nettoyage et de désinfection potentiellement agressifs chimiquement.

Proche de sa surface en contact avec le milieu ambiant, l'acier inoxydable peut être présenté de manière schématique comme dans la figure 34. L'objectif, lors de l'étape de pulvérisation est de déposer une couche mince de TiO_2 d'épaisseur supérieure à 100 nm.

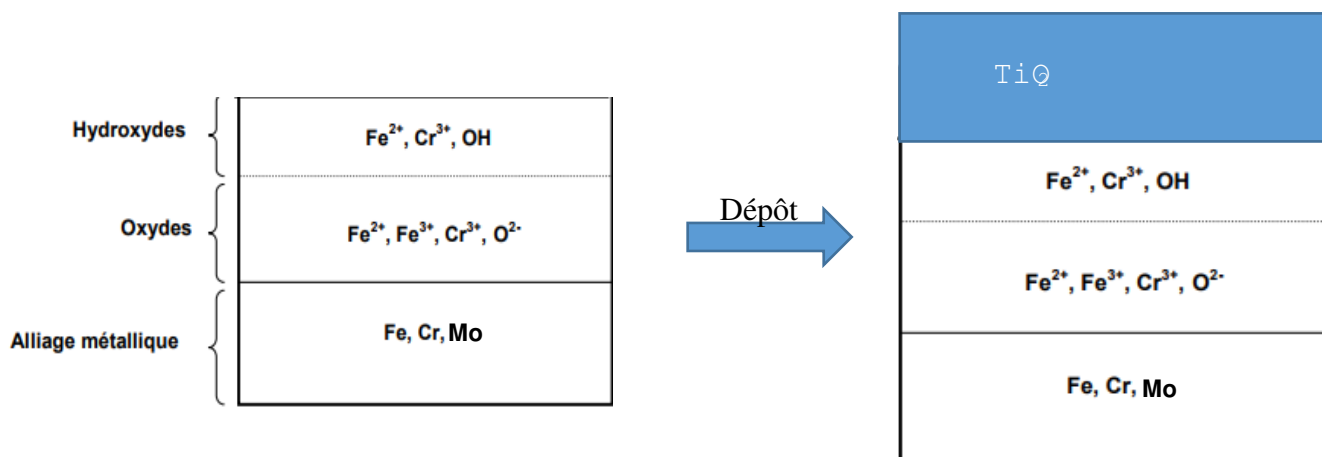


Figure 34 : Représentation schématique des différentes couches qui composent l'acier inoxydable. (d'après Demilly, 2006)

À partir des plaques d'acier inoxydable AISI 316, des échantillons de 50x50 mm sont découpés. Ces dimensions sont fixées par rapport au porte-substrat utilisé pour les dépôts des couches minces. Une fois les échantillons découpés, ils doivent être nettoyés avant toute utilisation. La présence d'impuretés et/ou de défauts peut conduire au dépôt d'un film de TiO_2 de mauvaise qualité.

B. Paramètres de dépôt des couches minces de TiO_2

Dans un premier temps, les paramètres de dépôt des couches minces de TiO_2 sur substrats de verre ont été transposés à ceux sur acier inoxydable, (Chapitre III.). La température est fixée à 440°C avec une proportion d'oxygène dans l'argon égale à 3%. En ce qui concerne la durée de dépôt, elle est fixée à 180 minutes. Cette durée de dépôt permet de synthétiser une couche mince d'épaisseur égale à 210 nm.

Différentes conditions de dépôt ont été testées afin de synthétiser des couches minces de TiO_2 dotées de l'activité photocatalytique, et même d'une activité bactéricide. Bien qu'il paraissait évident que le changement de substrat ait un impact sur la qualité des dépôts, cet impact n'était alors pas connu.

Les verres sodocalciques sont composés majoritairement de silice (73% environ), d'oxyde de sodium (13-15% en masse) et d'oxyde de calcium (9-14% en masse). Il est employé dans la majorité des fabrications industrielles de verres à usage alimentaire pour les verres creux (les bouteilles, les pots ou les bocal, les verres de table), mais également pour les verres plats (vitrages industriels). Le tableau 8 regroupe les caractéristiques de l'acier inoxydable et du verre sodocalcique.

Tableau 8 : Caractéristiques du verre sodocalcique et de l'acier inoxydable 316, (d'après les fiches techniques de fournisseurs).

	VERRE SODOCALCIQUE	ACIER INOXYDABLE 316
Densité	2,5	7,96
Elasticité (GPa)	70	190
Résistance à la traction (MPa)	50	460-860
Conductibilité thermique ($\text{W/m}^2\text{K}$)	1,15	16,3
Température de ramollissement ($^\circ\text{C}$)	575	/
Coefficient de conductivité thermique ($^\circ\text{K}^{-1}$)	94.10^{-7}	110.10^{-7}

Après le premier dépôt de TiO_2 sur inox 316, la couche mince a pelliculé en raison de sa mauvaise adhérence à la surface du substrat. Il a fallu utiliser une couche d'accrochage pour favoriser l'adhérence du film de TiO_2 . Pour cela, du titane pur a été déposé directement sur le substrat d'acier inoxydable. Cette étape est donc ajoutée entre l'étape de la prépulvérisation et celle de pulvérisation. Pendant le dépôt de titane, il n'y a donc pas d'ajout d'oxygène dans l'enceinte, et donc pas d'oxydation. Du titane recouvre la surface du substrat.

Il suffit de quelques dizaines de nanomètres pour permettre la bonne tenue mécanique de la couche mince de TiO_2 .

Les dépôts suivants ont permis de valider la couche d'accrochage (absence de pelliculage). Cependant, il semble que la température de dépôt était trop élevée en raison de la différence de conductibilité thermique entre le verre sodocalcique et l'acier inoxydable. En effet l'acier inoxydable a la capacité de conduire la chaleur près de 14 fois plus que le verre (Tableau 1). La température affichée sur le bâti de pulvérisation étant donnée *via* une sonde présente derrière le porte-substrat, la température réelle à la surface de l'acier inoxydable est donc supérieure à celle affichée. Afin de retrouver des conditions de dépôts voisines de celles sur verre, la solution envisagée a été d'interposer un substrat « tampon » thermique entre le porte-substrat et le substrat d'acier inoxydable (Figure 35).

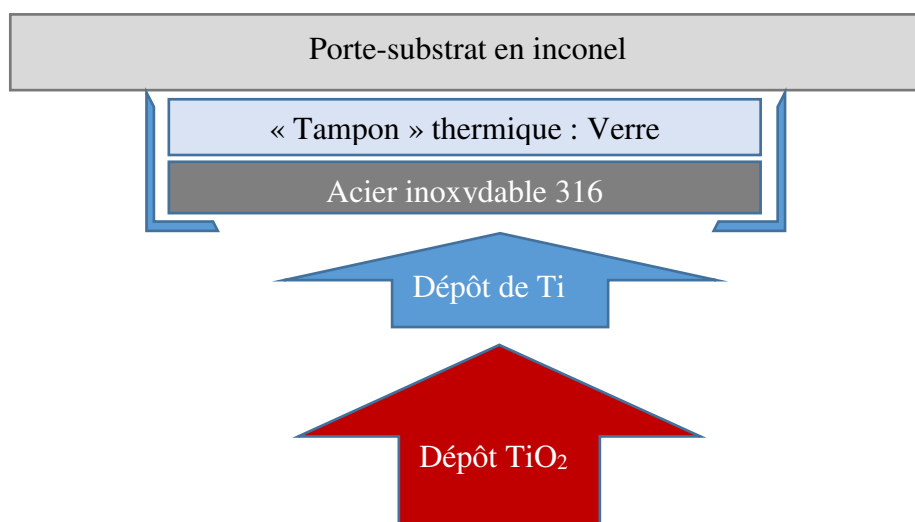


Figure 35 : Schéma représentant le système porte-substrat utilisé pour le dépôt de TiO_2 sur substrat d'acier inoxydable.

Le verre choisi pour le premier dépôt utilisant ce système de substrat « tampon » était un verre sodocalcique d'une épaisseur égale à 0,7 mm. Cependant, il s'avère que ce verre a une tenue en température limitée. En effet, le verre sodocalcique a atteint sa température de ramollissement. Afin de remédier à ce phénomène, la nature du verre du substrat « tampon » a été modifiée. Nous avons utilisé du verre Corning® d'épaisseur égale à 1,1mm. En plus d'être plus épais, ce verre est nettement plus résistant à la température (température de ramollissement égale à 975°C). Ce verre sera conservé pour la suite des dépôts.

Afin de se rapprocher des conditions de température, nous avons également joué sur la température de consigne. Cette température a été diminuée, par palier de 40°C de 440°C jusqu'à 320°C.

Toutes les conditions de dépôts sur acier inoxydable sont regroupées dans le tableau 9. Les conditions de température, de proportion en dioxygène dans le plasma, ainsi que les conditions spécifiques y sont détaillées.

Tableau 9 : Paramètres des dépôts de TiO_2 sur acier inoxydable AISI 316.

<i>Echantillon</i>	Substrat	Température (°C)	Ratio de Dépôt O_2/Ar (%)	Photo de
--------------------	-----------------	-----------------------------	---	-----------------

Après la séquence de dépôts, les échantillons synthétisés sont découpés en coupons de 10x10 mm. Ces coupons sont ensuite utilisés pour les différentes caractérisations.

III. Caractérisation physique des couches minces de TiO₂

A. Morphologie de surface

La surface des différents coupons a été observée par microscopie électronique à balayage (MEB) dans les conditions fixées dans le chapitre II, section III.A. Les observations sont présentées dans les figures 36 et 37.

L'étude de la morphologie de surface a permis de mettre en évidence la nécessité du dépôt d'une couche d'accrochage de titane. En effet, il est clairement visible à la fois sur la photo de l'échantillon TiO₂ 266 dans le tableau 9 et sur les images MEB, que la couche mince de TiO₂ pelliculait à la surface du substrat d'acier inoxydable.

La couche mince de l'échantillon suivant, c'est-à-dire TiO₂ 270, a été déposée après le dépôt de titane pur pendant 1 minute. Cela correspond à une couche mince de très faible épaisseur (~20 nm). Bien que cette couche de titane ait permis d'améliorer l'adhérence de la couche mince de TiO₂, elle n'était toujours pas suffisante. En effet sous l'action d'un flux de liquide, la couche mince se décollait de la surface du substrat. Ainsi les couches minces de TiO₂ suivantes ont été déposées après 10 minutes de dépôt de titane pur (d'épaisseur égale à 200 nm). Cette durée de dépôt a permis d'obtenir une couche mince de TiO₂ adhérent correctement.

La photo de l'échantillon TiO₂ 287 (Tableau 9) a montré que l'utilisation du verre sodocalcique comme substrat « tampon » pour limiter la conduction de la chaleur n'était pas appropriée. En effet, le verre sodocalcique s'est fortement ramolli au centre de l'échantillon au niveau du point chaud. Les cercles autour de ce point chaud montrent qu'il y a eu, lors du dépôt, un fort gradient de température. Le point chaud où le verre a ramolli, montre que la température a atteint une valeur supérieure à 545°C. La surface de cet échantillon n'a pas été observée par microscopie électronique à balayage, car il ne présentait pas d'intérêt pour la suite des tests en raison du manque d'homogénéité du dépôt et de l'altération du porte-échantillon après le dépôt.

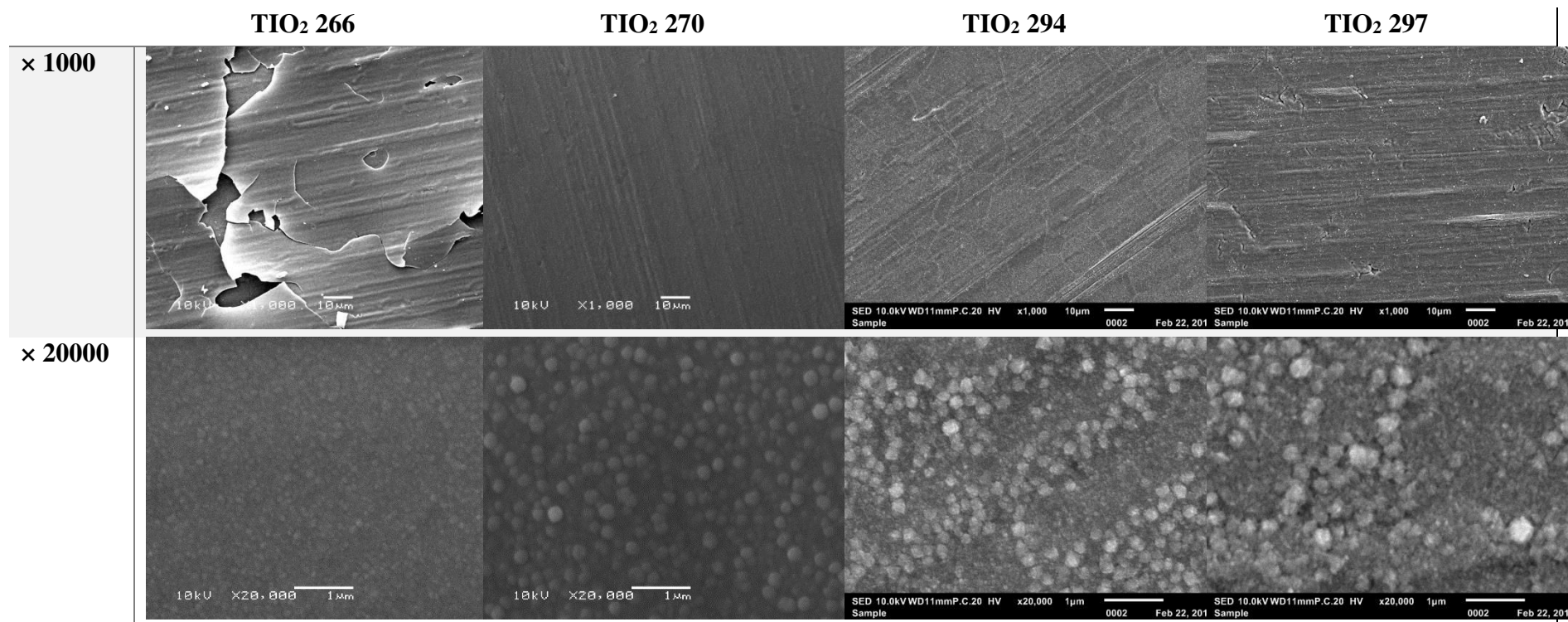


Figure 36 : Observations de la morphologie de surface par microscopie électronique à balayage (grossissement ×1000 et ×20000).

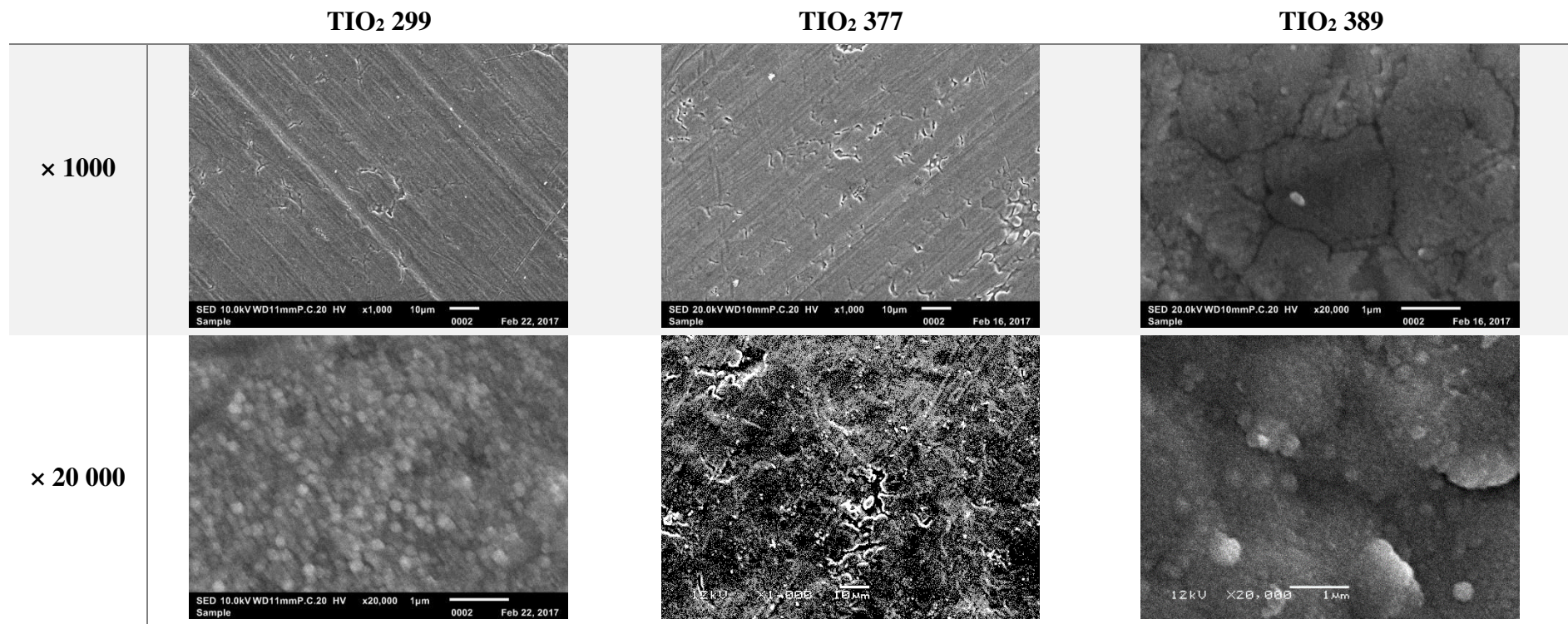


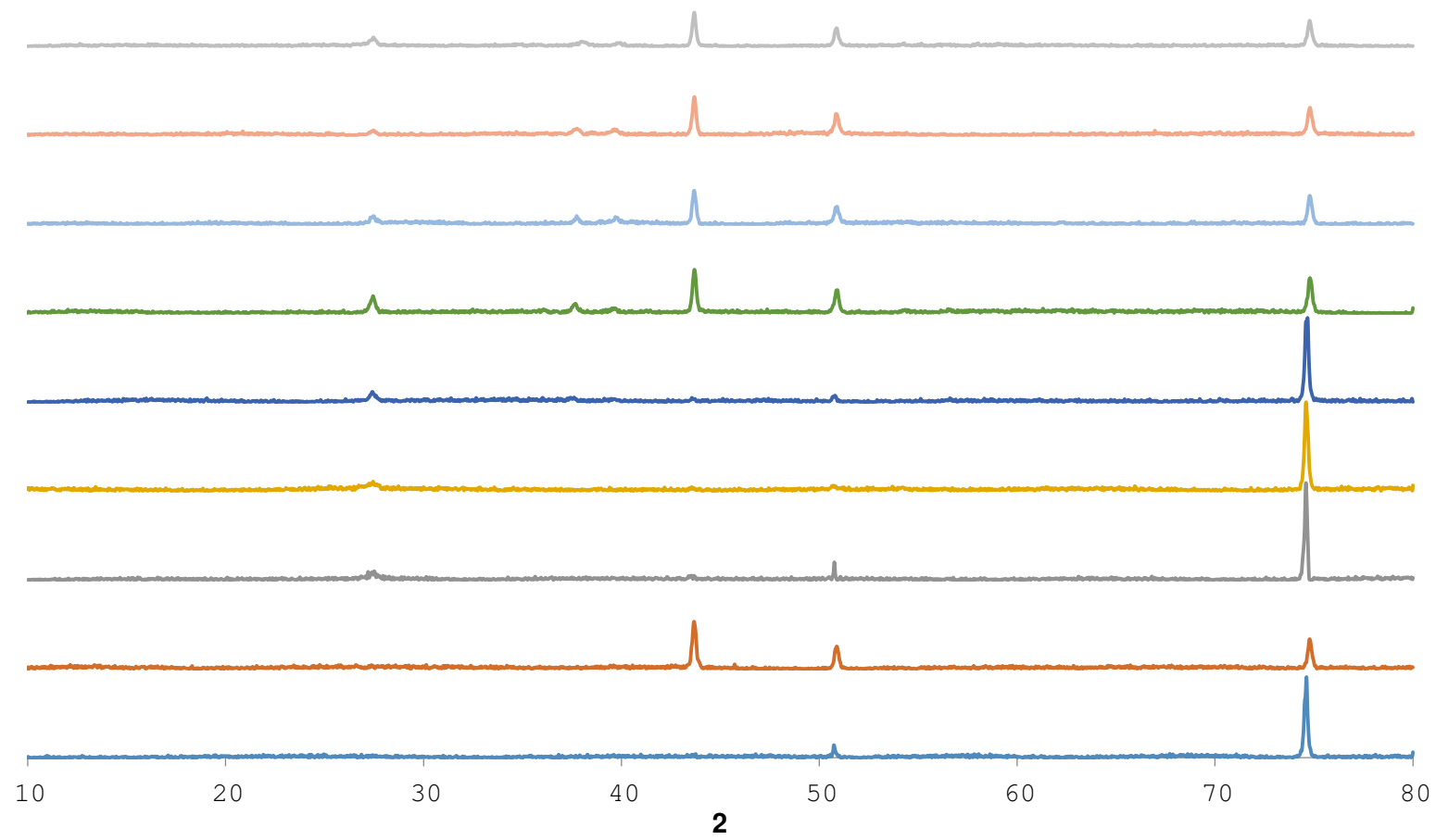
Figure 37 : Observations de la morphologie de surface par microscopie électronique à balayage (grossissement ×1000 et ×20000).

Pour les échantillons suivants, le verre Corning® a été utilisé comme substrat « tampon ». Bien plus résistant à la chaleur, ce verre n'a pas ramolli lors du dépôt des couches minces suivantes. Dans ces conditions, les dépôts à 440°C ont été réalisés pendant 3 heures, puis pendant 6 heures. À faible grossissement ($\times 1000$), les surfaces semblent relativement lisses. Les observations à plus fort grossissement ($\times 20000$) montrent la présence de grains submicroscopiques. L'augmentation de la durée de dépôt accroît la dimension de ces grains, même si leur dimension reste toujours submicroscopique.

La mesure de l'épaisseur n'a pas été réalisée sur les coupons recouverts de la couche mince de TiO_2 . Ceci est dû à la méthode de découpe des échantillons réalisée *via* un massicot pour feuilles et plaques métalliques. L'écrasement de l'échantillon lors de la découpe le rend inexploitable pour l'observation de la tranche au MEB.

B. Analyse par diffraction des rayons X

Toutes les couches minces, excepté la couche mince TiO_2 287, ont été analysées par DRX dans les conditions précisées dans le chapitre II, section II.B.3. En plus de ces échantillons, des témoins ont été nécessaires. Le premier est le substrat d'acier inoxydable 316 sans aucun post-traitement. Un autre échantillon d'acier inoxydable a été porté en température à 440°C pendant 6 heures dans l'enceinte d'un four à moufle afin d'évaluer l'effet de la température : un troisième pic est observé par comparaison à l'inox 316 sans post-traitement. Il s'agit d'un pic positionné à 2



Nascimento et ses collaborateurs (2009) ont analysé un échantillon d'acier inoxydable n'ayant subi aucun post-traitement. Trois pics peuvent être observés, à 2

L'effet d'une sous-couche de titane pur a été étudié par Krishna *et al.*, en 2011. Dans un premier temps, il a été montré que la couche de titane était capable d'adhérer de manière importante à la surface du substrat d'acier inoxydable. De plus, d'après leurs résultats de DRX (Figure 40), il est possible d'observer l'effet de la sous-couche de Ti et son épaisseur sur la croissance de la couche mince de TiO_2 . Sur un échantillon sans sous-couche de Ti, le TiO_2 est sous sa forme cristalline anatase. Dès que la sous-couche de Ti est présente, quelle que soit son épaisseur, le TiO_2 est présent sous sa forme rutile et aucune forme anatase n'est observée. Cependant, pour une sous-couche d'une épaisseur de près de $1\mu\text{m}$, la phase rutile n'est presque plus visible en raison de la formation de TiO_2 amorphe (Figure 40, 4.). Les auteurs ont montré que pour les sous-couches de Ti les plus fines, une orientation préférentielle (100) était observée alors qu'à plus forte épaisseur le film déposé présentait plusieurs orientations (100) et (002). Cette structuration du film mince de Ti pourrait influencer la croissance du TiO_2 . Les mêmes conclusions ont pu être obtenues par Arias *et al.*, en 2017.

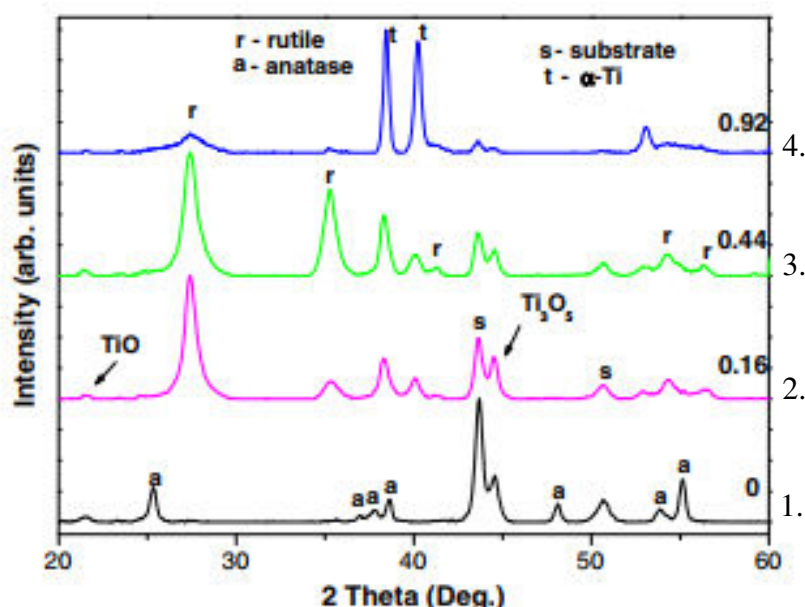


Figure 40 : Diagramme de DRX d'échantillons d'acier inoxydable recouverts ou non d'une sous-couche de titane avec une couche mince de TiO_2 . 1. : Aucun film de Ti – 2. Film de Ti de $0,16\mu\text{m}$ – 3. Film de Ti de $0,44\mu\text{m}$ et 4. $0,92\mu\text{m}$ (Krishna *et al.*, 2011)

Dans notre cas, même sans couche d'accrochage de titane, il est possible d'observer du TiO_2 uniquement sous sa forme rutile. Cela peut provenir de la méthode de dépôt mise en œuvre. En effet, lors du passage de la séquence de prépulvérisation et celle de la pulvérisation, du titane pur peut être déposé à la surface du substrat même s'il n'a pas été détecté par DRX. Cette hypothèse s'appuie sur le changement de couleur du plasma dans l'enceinte de pulvérisation. Lorsqu'il s'agit d'un dépôt de Ti, le plasma est totalement de couleur bleue. Au fur et à mesure que l'oxygène se mélange à l'argon pour oxyder le Ti et donc former le TiO_2 , la couleur du plasma vire petit à petit vers la couleur mauve. Lors de la prépulvérisation, le

plasma est totalement bleu et le virage vers la couleur mauve s'opère en moyenne autour de 1 minute après le début du dépôt de TiO_2 . Ainsi lors de cette minute, du titane pur peut être déposé à la surface du substrat.

L'influence d'autres types de sous-couche a été testée sur un substrat d'oxyde de magnésium (MgO) (Kamiko *et al.*, 2010). Quatre natures de sous-couche différentes ont été comparées : fer, cuivre, argent, et cobalt. Les sous-couches de Cu et d'Ag conduisent à une baisse de la qualité du TiO_2 et à son amorphisation. Avec une sous-couche Fe, la couche de TiO_2 est un mélange de rutil et d'anatase. Avec une sous-couche Co, le TiO_2 est uniquement présent sous sa forme anatase.

Dans notre cas, la sous-couche de Ti déposée avant la couche mince de TiO_2 était uniquement utilisée comme couche d'accrochage. Cette sous-couche semble cependant présenter un obstacle pour l'obtention d'une couche mince identique à celle déposée sur verre sodocalcique.

L'activité photocatalytique de nos couches minces de TiO_2 déposées sur acier inoxydable est testée afin de mettre en évidence la possible photoactivité du TiO_2 sous sa forme rutil et afin de comparer les résultats obtenus avec les couches minces déposées sur substrat de verre.

IV. Activité photocatalytique des couches minces de TiO_2

L'activité photocatalytique des couches minces déposées sur acier inoxydable a été mesurée par un test de décoloration du bleu de méthylène sous illumination UVA (Chapitre II, Section III ;B.). Il est admis que la phase anatase présente une activité photocatalytique plus importante que celle de la phase rutil, notamment sous forme nanoparticulaire (Luttrell *et al.*, 2014; Zhang *et al.*, 2014). L'activité photocatalytique peut donc être différente en fonction de la forme du TiO_2 , cependant, au sein d'une même forme, l'orientation cristalline peut également conduire à des différences au niveau de l'activité photocatalytique. Toutefois, c'est un mélange des phases anatase et rutil du TiO_2 qui permet d'obtenir la meilleure activité photocatalytique (Nosaka et Nosaka, 2017).

Toutes les couches minces déposées sur acier inoxydable ont permis la décoloration du bleu de méthylène (BM) (Figure 41).

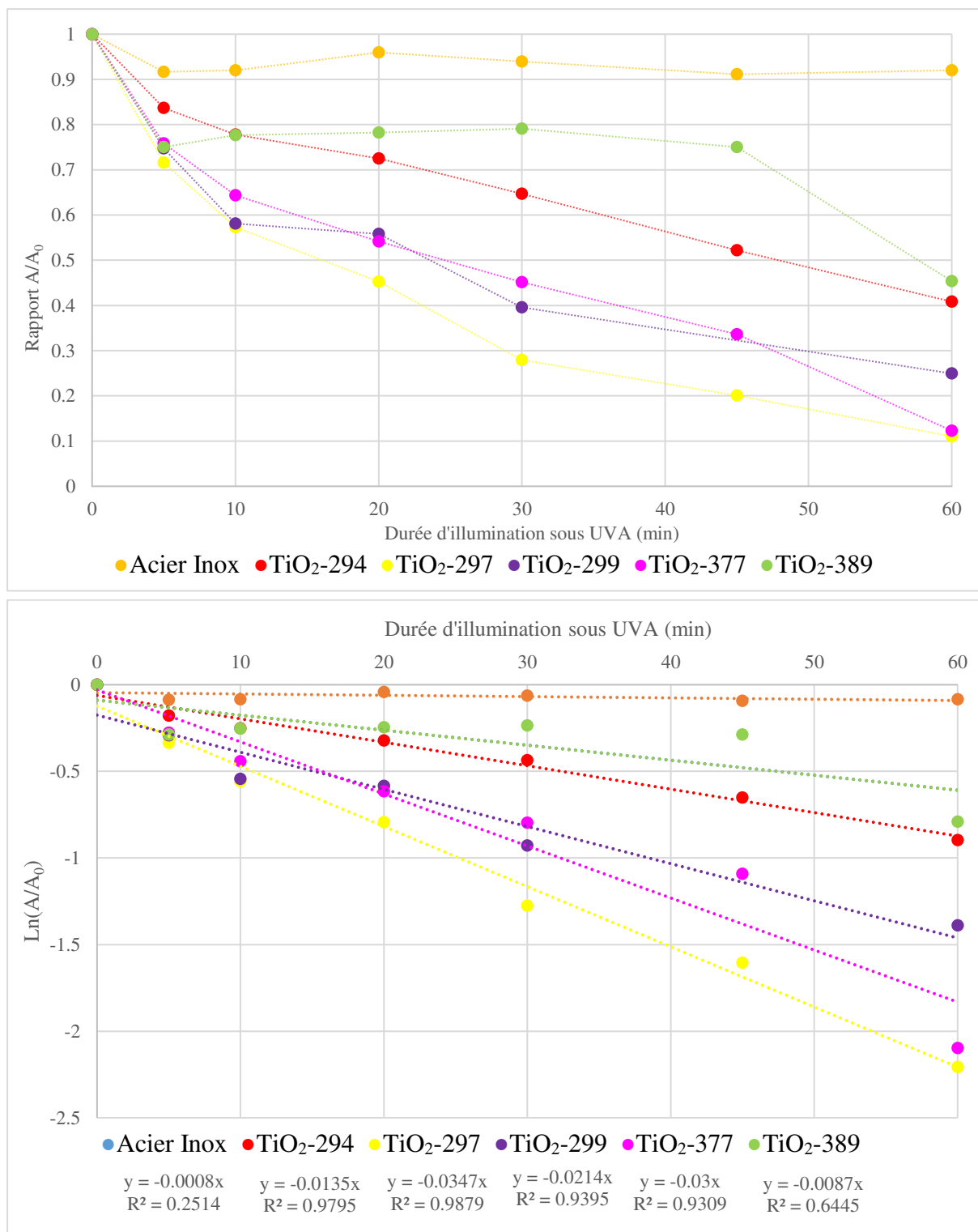


Figure 41 : Cinétique de décoloration du bleu de méthylène par les couches minces déposées sur acier inoxydable.

Les résultats de décoloration du BM sont présentés à la fois par le rapport de l'absorbance à 650 nm (A/A_0), mais aussi *via* le logarithme népérien de ce ratio. La vitesse de décoloration suit une cinétique d'ordre 1, tout comme pour les échantillons déposés sur

verre et majoritairement de forme anatase. Ainsi, la forme rutile présente sur les couches minces déposées sur acier inoxydable est dotée d'activité photocatalytique.

La couche mince TiO_2 -440°C-180min sur verre permet une décoloration de près de 60% en 60 minutes d'illumination sous UVA. Les couches minces sur acier inoxydable déposées à la même température possèdent une activité photocatalytique équivalente. Lorsque la durée de dépôt augmente, 360 minutes, la décoloration est plus importante autour de 70%. Ce phénomène avait pu être observé avec les couches minces déposées sur verre sodocalcique. L'augmentation de l'épaisseur de la couche mince, même si celle-ci est sous forme rutile, permet l'augmentation de l'activité photocatalytique.

La diminution de la température de dépôt par rapport à la référence sur verre met en évidence la synthèse d'une couche mince sur acier inoxydable dotée d'une activité photocatalytique plus importante. À 400°C, l'échantillon a permis de décolorer le BM de près de 75%. La meilleure efficacité de décoloration (88%) est obtenue avec l'échantillon élaborée à 360°C. Lorsque la température de dépôt est trop diminuée (320°C), la décoloration du BM est nettement moins importante (65%). Ainsi, il est possible que les phases cristallines de ce dernier échantillon ne soit pas tout à fait identiques à celles de l'échantillon élaboré à 360°C. Il est important d'observer que malgré l'absence de différence notable au niveau des diagrammes de DRX, l'amplitude des pics de diffraction reste faible et ne sont indexées et interprétées que les raies présentent. La contribution d'une phase amorphe aux rayons X ou une modification de la rugosité de surface sont des causes possibles à des différences d'efficacité photocatalytique.

Bien que les couches minces de TiO_2 sous forme rutile assurent la décoloration du BM, traduisant leurs propriétés photocatalytiques, la question de leur activité bactéricide reste à déterminer.

V. Effet antibactérien sur les souches de *L. monocytogenes*

L'effet bactéricide des couches minces de TiO_2 déposées sur acier inoxydable a été testé vis-à-vis des deux souches de *L. monocytogenes* utilisées préalablement, la souche de référence *L. monocytogenes* ScottA et celle environnementale ECL136 (Figure 42).

À ce jour, les données sur l'activité bactéricide des couches minces de TiO_2 constituée de la forme rutile restent peu nombreuses. Il paraît donc très intéressant de pouvoir comparer les performances des couches minces déposées sur verre et sur acier inoxydable qui présentent des phases cristallines différentes.

Au vu des résultats d'activité photocatalytique des couches minces de TiO_2 déposées sur acier inoxydable, l'échantillon TiO_2 -377 a été sélectionné. Il s'agit de l'échantillon qui présente la plus forte activité sous sa forme rutile.

La figure 42 présente l'effet bactéricide de la couche mince de TiO_2 -377 déposée sur acier inoxydable basée sur la représentation du logarithme du rapport de N , le nombre de bactéries présentes à la fin du traitement et N_0 le nombre de bactéries déposées initialement à la surface de l'échantillon. En premier lieu, il est important de noter que les deux souches de *L. monocytogenes* sont capables d'adhérer à la surface du substrat d'acier inoxydable. Cette capacité d'adhésion n'est pas différente de celle observée sur verre sodocalcique (Chapitre III., section B), avec environ 1 Log de bactéries non adhérentes. La couche mince de TiO_2 ne possède pas d'effet anti-adhésif, aucune différence n'a pu être observée entre le nombre de bactéries adhérentes sur la couche mince sans illumination UVA et le substrat d'acier inoxydable.

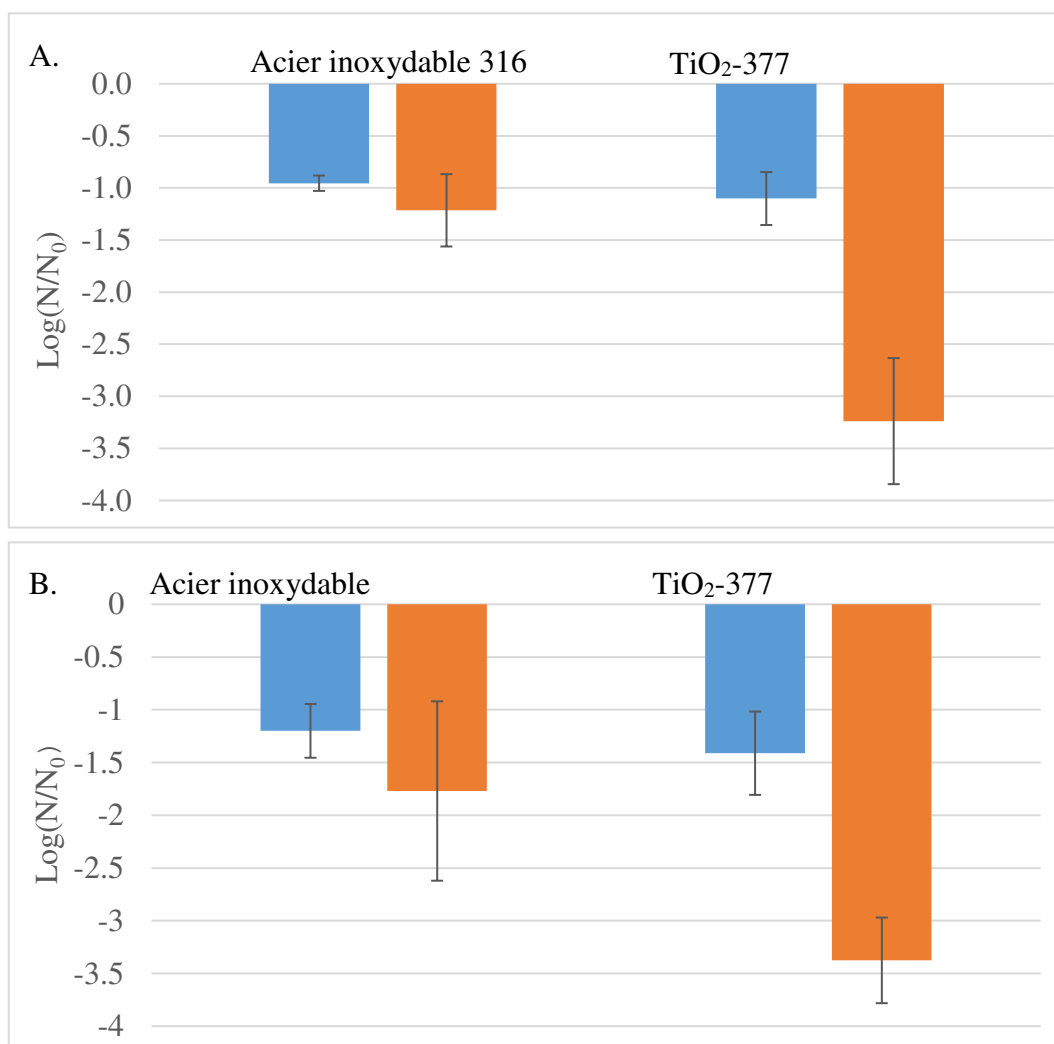


Figure 42 : Effet bactéricide de la couche mince TiO_2 -377 sur les souches de *L. monocytogenes* : A. Scott A; B. ECL 136.
■ Obscurité, ■ Illumination sous UVA pendant 20 minutes.

Lorsque les bactéries adhérees à la surface de l'acier inoxydable sont exposées aux UVA, ce traitement n'induit pas une diminution significative du nombre de bactéries. Ainsi, sur acier inoxydable, les UVA ne possèdent pas un effet létal sur les deux souches de *L. monocytogenes*. Les mêmes conclusions ont été observées avec les tests des couches minces déposées sur substrat de verre sodocalcique.

Afin de mettre en évidence l'effet bactéricide du revêtement de l'échantillon TiO₂-377 sous UVA, ce sont les valeurs du matériau témoin (acier inoxydable) exposé aux UVA et celles issues de l'échantillon TiO₂-377 exposé aux UVA qu'il faut comparer. Ainsi, pour *L. monocytogenes* ScottA (la souche de référence) l'utilisation de la couche mince de TiO₂ permet une diminution de près de 3 log de la quantité de bactéries adhérees. Pour la souche ECL136, cette valeur est moins importante, avec une diminution de 1,6 log.

Sous illumination UVA, la couche mince TiO₂-377 déposé sur acier inoxydable possède un effet bactéricide, qui est plus important sur la souche de référence *L. monocytogenes* ScottA. La souche ECL136, souche environnementale, est moins sensible. Ce phénomène n'était pas significatif lors des tests réalisés avec les couches minces de TiO₂ déposées sur verre sodocalcique, bien que cette tendance ait été mise en évidence. En effet, les souches de terrain ont été retrouvées dans des environnements où elles peuvent être confrontées à différents stress. Cela peut être à l'origine de l'apparition de mécanismes de réponse et de résistance de ces bactéries environnementales.

Le tableau 10 compare les effets bactéricides des couches minces de TiO₂ sur les souches de *L. monocytogenes*. Ainsi, pour la souche *L. monocytogenes* ECL136, les valeurs se situent autour de 2 Log suivant la nature du substrat sur lesquels elles sont déposées : verre et acier inoxydable de couches minces de TiO₂. En parallèle, pour la souche *L. monocytogenes* ScottA, les meilleurs résultats sont obtenus avec la couche mince déposée sur acier inoxydable.

Tableau 10 : Comparaison de valeurs de réduction de la quantité de bactéries adhérees après photocatalyse sous UVA pendant 20 minutes pour les couches minces de TiO₂-226 (sur verre) et TiO₂-377 (sur acier inoxydable).

	TiO ₂ -226	TiO ₂ -377
<i>L. monocytogenes</i> ScottA	-1,2 Log	-2,0 Log
<i>L. monocytogenes</i> ECL136	-2,3 Log	-1,6 Log

D'après les résultats présentés dans la Figure 5 du chapitre III, section II.B., il semble que la souche de *L. monocytogenes* ECL136 ne soit pas plus sensible à l'action de la couche mince de TiO₂ lorsque la phase rutile s'ajoute à la phase anatase, contrairement à la souche *L. monocytogenes* ScottA. Cette souche est plus sensible à un mélange des phases anatase et rutile. Il est possible que cette souche soit plus sensible en présence de la phase rutile du TiO₂.

Toutes ces observations peuvent donc être corrélées au fait que la nature cristalline de la couche mince soit différente. Une corrélation avec la nature des espèces réactives de l'oxygène produites semble alors intéressante à investiguer.

L'effet bactéricide de la forme rutile du TiO₂ est toujours discuté à l'heure actuelle. Une étude a mis en évidence une très faible activité photocatalytique de poudres de TiO₂-rutile par rapport à la décoloration du bleu de méthylène ou du rouge Congo ou encore du cristal violet (Kanna et Wongnawa, 2008). D'autres études mettent en évidence que la forme rutile (sous forme de poudre) ne présente aucun effet bactéricide. Sirimahachai et ses collaborateurs (2012) ont montré sur 5 espèces de bactéries différentes que la forme TiO₂-rutile commerciale ne possédait aucune activité.

Les propriétés antibactériennes de la phase TiO₂-anatase sont plus importantes que celles de la phase rutile. Cela peut s'expliquer par le fait que les EROs produites à la surface peuvent être différentes en fonction de la phase cristalline (Nosaka et Nosaka, 2017).

Cependant, les études restent encore assez contradictoires quant à l'effet de la forme rutile sur les bactéries. Dans certains cas, un effet bactéricide peut être observé avec des poudres de TiO₂ (Zhang *et al.*, 2014; Kim *et al.*, 2017), ou sous forme de surfaces (Liu *et al.*, 2014) alors que dans de plus nombreux cas, l'effet bactéricide de la forme rutile est discuté (Sirimahachai *et al.*, 2009; Körösi *et al.*, 2016). Il est plus rare également de trouver des études menées sur des formes cristallines pures. Il s'agit dans la majorité des cas de mélanges, que cela soit sous forme de couches minces, ou après synthèse de composés sous formes nanoparticulaires par exemple.

Il est particulièrement admis que le composé ayant la plus forte activité photocatalytique et bactéricide soit un mélange des formes anatase et rutile. C'est d'ailleurs un mélange de ces deux formes qui est commercialisé et employé dans le monde industriel, la poudre Degussa P25 ®, composée à 80% d'anatase et 20% de rutile en masse.

Afin d'observer les dommages cellulaires provoqués, les cellules de *L. monocytogenes* ScottA adhérentes à la surface de l'échantillon TiO₂-377, puis exposées aux UVA, ont été observées au MEB (Figure 43). Comparativement aux bactéries présentes sur les autres surfaces exposées ou non aux UVA, elles possèdent des contours nettement moins nets

suggérant une altération de la paroi. Par conséquent, l'effet photocatalytique de la couche mince de TiO_2 a bien un impact sur les bactéries adhérentes.

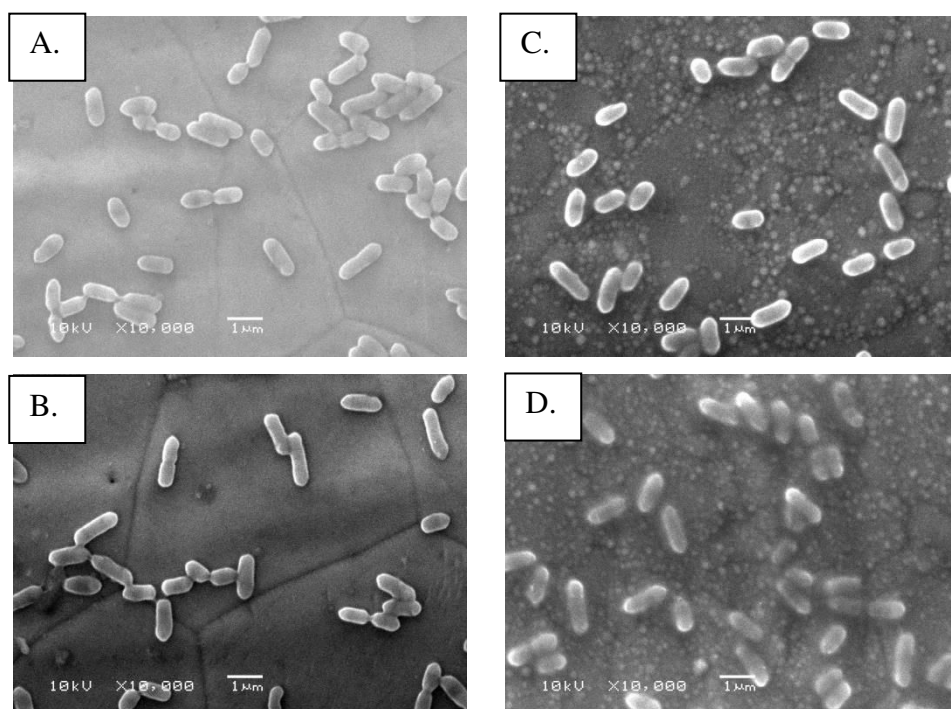


Figure 43 : Observations des bactéries adhérentes de *L. monocytogenes* ScottA sur différentes surfaces : A. Acier inoxydable AISI 316 ; B. Acier inoxydable AISI 316 sous UVA (20 minutes) ; C. TiO_2 -377 ; D. TiO_2 -377 sous UVA (20 minutes)

VI. Conclusions

Le dépôt de couches minces de TiO_2 sur substrat d'acier inoxydable a présenté un défi au niveau technologique. En effet, il a fallu pallier différentes difficultés survenues au cours des manipulations. Ces problématiques sont liées en partie à la technique d'élaboration d'obtention des couches minces, par pulvérisation cathodique RF à partir des paramètres de dépôt optimisés dans le chapitre précédent. La problématique est également liée à la nature même du substrat, l'acier inoxydable, qui présente une conductibilité nettement supérieure à celle du verre.

La modification de la nature du substrat a eu un impact important sur la qualité des couches minces de TiO_2 . Sur substrat de verre sodocalcique, aucun problème d'adhérence de

la couche mince n'avait été mis en évidence. En déposant sur substrat d'acier inoxydable, l'adhérence du film de TiO_2 est apparue comme un premier verrou technique à lever. Le dépôt d'une sous-couche d'accrochage de titane métallique de 200 nm a permis de résoudre ce problème majeur. L'utilisation d'une telle sous-couche a cependant généré une modification de la croissance cristalline de la couche mince de TiO_2 . Sur substrat d'acier inoxydable AISI 316, toutes les couches minces de TiO_2 croissent souvent sous la forme rutile. Dans un premier temps, une hypothèse a imputé ce comportement à la température de dépôt plus élevée en raison de la forte conductibilité thermique de l'acier inoxydable par rapport à celle du verre., L'utilisation d'un substrat « tampon » en verre Corning®, n'a pas permis de modifier la nature cristalline du TiO_2 déposé.

L'utilisation de la sous-couche d'accrochage de titane métallique est à l'origine de la phase rutile de TiO_2 , comparativement aux résultats obtenus sur substrats de verre. L'utilisation de cette sous-couche pourrait cependant permettre à la couche mince de TiO_2 et au substrat d'être plus résistant à la corrosion (Massiani *et al.*, 1991).

La forme rutile du TiO_2 est notamment utilisée dans le domaine des catalyseurs chimiques, des appareils électromagnétiques ou optiques, grâce à ses propriétés physiques, chimiques, mécaniques et biomédicales. De manière plus récente, la phase rutile est employée dans le domaine médicale pour la fabrication d'implants et de dispositifs biomédicaux, notamment grâce à ses caractéristiques biocompatibles (Casaletto *et al.*, 2001). L'obtention de la phase rutile des surfaces de couches de TiO_2 était possible grâce à un traitement thermique post-dépôt (Krishna *et al.*, 2011). Il est également possible d'utiliser une sous-couche métallique permette pour assurer la croissance d'un film de TiO_2 sous sa forme préférentiellement rutile.

L'orientation de la phase cristalline rutile est également impliquée dans l'activité photocatalytique et bactéricide du TiO_2 . Ainsi, sous forme orientée (111) sur la globalité des surfaces exposées, le rutile présente une activité photocatalytique à la fois sous UV ainsi que sous lumière visible (Liu *et al.*, 2014). Il paraît donc intéressant de pouvoir tester nos couches minces sous lumière visible afin de déterminer leur activité photocatalytique et antibactérienne.

Chapitre V :

Mécanismes impliqués dans

l'activité photocatalytique du TiO₂

et réponses bactériennes

I.	Introduction	142
II.	Détection et dosage de EROs produites à la surface des couches minces de TiO₂	142
A.	<i>Échantillons.....</i>	<i>142</i>
B.	<i>Implication des EROs dans le test de décoloration du BM</i>	<i>143</i>
C.	<i>Le peroxyde d'hydrogène</i>	<i>146</i>
D.	<i>Anions superoxydes</i>	<i>149</i>
E.	<i>Radicaux hydroxyles.....</i>	<i>150</i>
III.	Réponses bactériennes aux stress impliqués par la photocatalyse	153
A.	<i>Effet des UVA</i>	<i>154</i>
B.	<i>Effets du peroxyde d'hydrogène</i>	<i>156</i>
C.	<i>Test de MATS</i>	<i>157</i>
D.	<i>Marquages fluorescents in situ.....</i>	<i>160</i>
IV.		

I. Introduction

Ce quatrième chapitre est consacré à la compréhension des mécanismes chimiques impliqués dans la photocatalyse à la surface de nos couches minces ainsi que l'effet du stress généré sur les bactéries.

Pour cela, la formation des différentes EROs à la surface des couches minces et leur implication dans la photocatalyse ont été évaluées par différents tests. Des études ont permis de mettre en évidence que certaines espèces réactives étaient impliquées de manière plus importante que d'autres dans l'activité bactéricide du TiO_2 photoactivé. Il s'agit principalement des radicaux hydroxyles (Gogniat et Dukan, 2007; Yan *et al.*, 2009). Différentes techniques de détection et de dosages colorimétriques seront donc employées pour déterminer les EROs produites à la surface des couches minces de TiO_2 .

Après avoir étudié la production des EROs sur les couches minces de TiO_2 , une dernière partie est dédiée aux mécanismes impliqués dans la réponse des bactéries face aux stress générés par la photocatalyse, dont le stress oxydatif, notamment sur les souches de *L. monocytogenes*.

II. Détection et dosage de EROs produites à la surface des couches minces de TiO_2

A. Échantillons

Tout au long des travaux, des couches minces ont été obtenues à la fois sur verre sodocalcique ainsi que sur substrat d'acier inoxydable. La mise au point des méthodes de détection et de dosage des EROs a été faite sur les couches minces les plus photoactives (Tableau 11). D'après les résultats de DRX, les phases cristallines étant différentes, il semblait intéressant de voir si cela pouvait avoir un impact sur les EROs produites.

Tableau 11 : Description des échantillons de couches minces de TiO_2 testés dans le chapitre V. Partie II.

Échantillon	Substrat	Conditions de dépôts		
		Température (°C)	Ratio O_2/Ar (%)	Durée de dépôt (min)
TiO_2 -87	Verre	440	3	60
TiO_2 -226	Verre	440	3	180
TiO_2 -247	Verre	440	3	360
TiO_2 -294	Acier inoxydable 316	440	3	180
TiO_2 -297	Acier inoxydable 316	440	3	360
TiO_2 -377	Acier inoxydable 316	360	3	180

Les échantillons sont utilisés sous forme de coupon de 1cm^2 . Ils sont préparés de façon non stérile lorsqu'il s'agit des tests de détection des EROs à leur surface. Ils sont toutefois nettoyés avec un détergent, le TFD4 puis rincés à l'eau ultrapure.

B. Implication des EROs dans le test de décoloration du BM

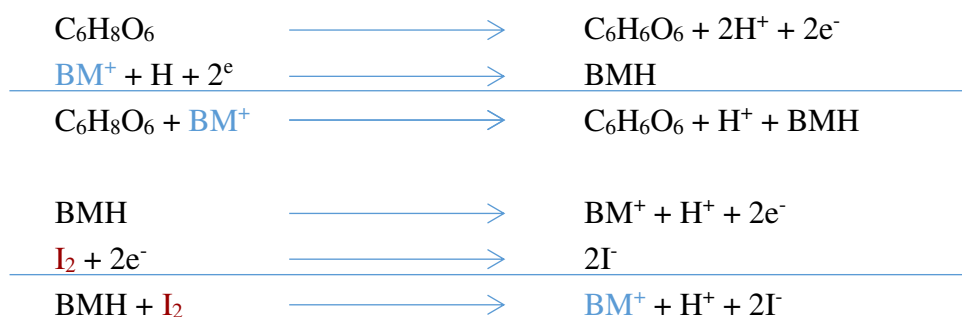
Le test de décoloration du BM est utilisé pour la mise en évidence de l'activité photocatalytique (Chapitre II, section III.B.) Ce test a été employé à la fois pour les couches minces déposées sur verre et sur acier inoxydable (Chapitre III et Chapitre IV).

Lors de l'évaluation de l'activité photocatalytique de nos couches minces de TiO_2 , il s'agit de la mesure de la décoloration du BM. Ce phénomène pourrait être dû à une réduction du BM. En effet, le BM est un composé coloré sous forme oxydée et incolore dans sa forme réduite. De plus, le TiO_2 photoactivé possède des propriétés oxydo-réductrices liées notamment à la formation des paires électron/trou au sein du photocatalyseur (Nakata et Fujishima, 2012). Toutefois, une fragmentation de la molécule sous l'action des EROs ne peut être exclue. Dans ce cas précis, la décoloration du BM ne peut être réversible. Notre étude a donc été basée sur ce principe.

L'objectif est donc de déterminer de quelle manière le BM est décoloré. La première étape consiste à mettre en évidence la réduction du BM par réaction inverse avec une quantité connue de diiode (I_2). L'acide ascorbique est un composé qui permet de réduire le BM. En présence de I_2 , le BM est de nouveau sous forme oxydée et redevient bleu. L'iode existe sous forme oxydée de l'iode est brune (I_2) alors que sa forme réduite est incolore (I^-).

La seconde étape est d'ajouter la même quantité de I_2 au dépôt de BM sur les coupons, après illumination UVA. Si le processus de réduction est mineur et que la décoloration du BM est majoritairement due à un processus de fragmentation, l' I_2 ajouté sera présent en excès et l'échantillon sera de couleur brune.

Chimiquement, les réactions peuvent s'exprimer ainsi,



Les tests ont été réalisés à partir des couches minces de TiO_2 déposées sur verre (TiO_2 -226) et acier inoxydable (TiO_2 -377). Les résultats sont exprimés par un ratio d'absorbance entre A, l'absorbance après traitement et A_0 l'absorbance en début de test. Ces résultats sont présentés dans la Figure 44. En absence de I_2 , le ratio d'absorbance A/A_0 se situe autour de 0,3 soit une décoloration de près de 70%, qu'elle soit due à l'action de l'acide ascorbique ou du TiO_2 photoactivé.

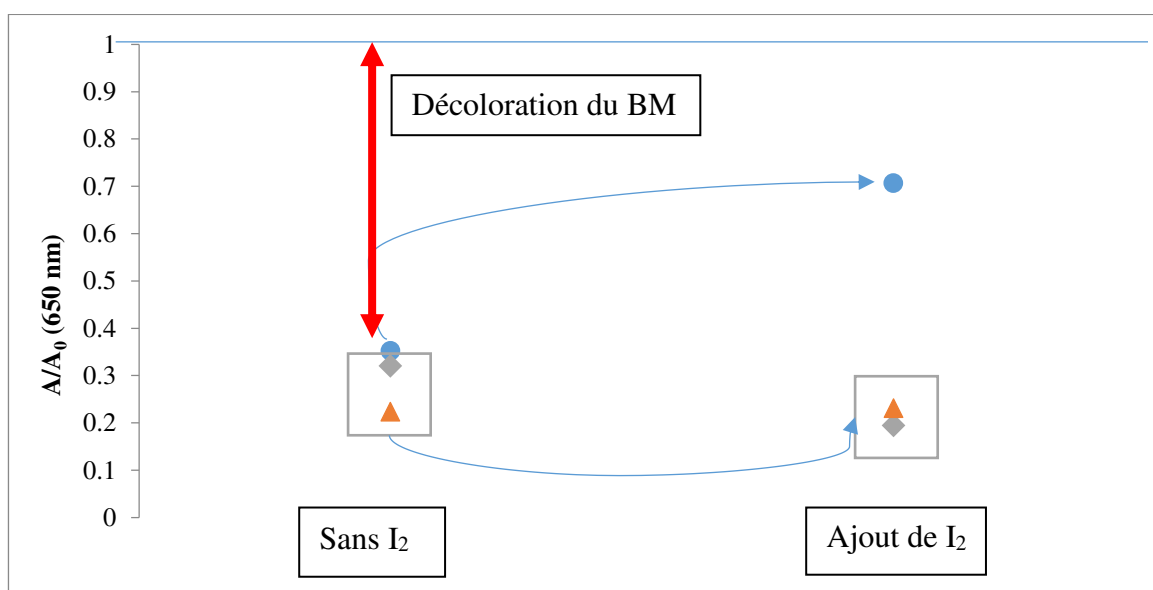


Figure 44 : Effet de l'ajout d'iode sur l'absorbance du BM. Mesure de décoloration du BM, sous l'effet de la photocatalyse (▲ TiO_2 -377 ; ◆ TiO_2 -226) ou par action de l'acide ascorbique (●).

Lorsque I_2 est ajouté dans l'échantillon contenant de l'acide ascorbique, une partie du BM est réoxydée et le ratio d'absorbance atteint 0,7. La réversibilité des réactions d'oxydo-réduction se traduit par une recoloration du BM.

En ce qui concerne les solutions de BM décolorées à la surface des coupons de TiO_2 suite à une illumination sous UVA, aucune recoloration n'est observée *via* l'ajout de I_2 . Ainsi

le ratio A/A_0 se situe toujours au niveau de 0,3. Cela indique que la décoloration du BM par l'action du TiO_2 photoactivé est irréversible.

Le processus impliqué dans la décoloration du BM n'est donc pas une simple réduction de ce composé due au trou électronique (h^+) à la surface de la couche mince, mais bien une fragmentation. Celle-ci conduit à l'obtention de produits minéraux comme l'indique le schéma établi par Houas *et al.*, (2001) (Figure 45) d'après une analyse *via* chromatographie en phase gazeuse ou en phase liquide couplée à de la spectrométrie de masse. En effet, il a été montré que le poids moléculaire des produits lors de la photocatalyse, diminuait au cours de la photocatalyse ce qui indique une fragmentation progressive du colorant.

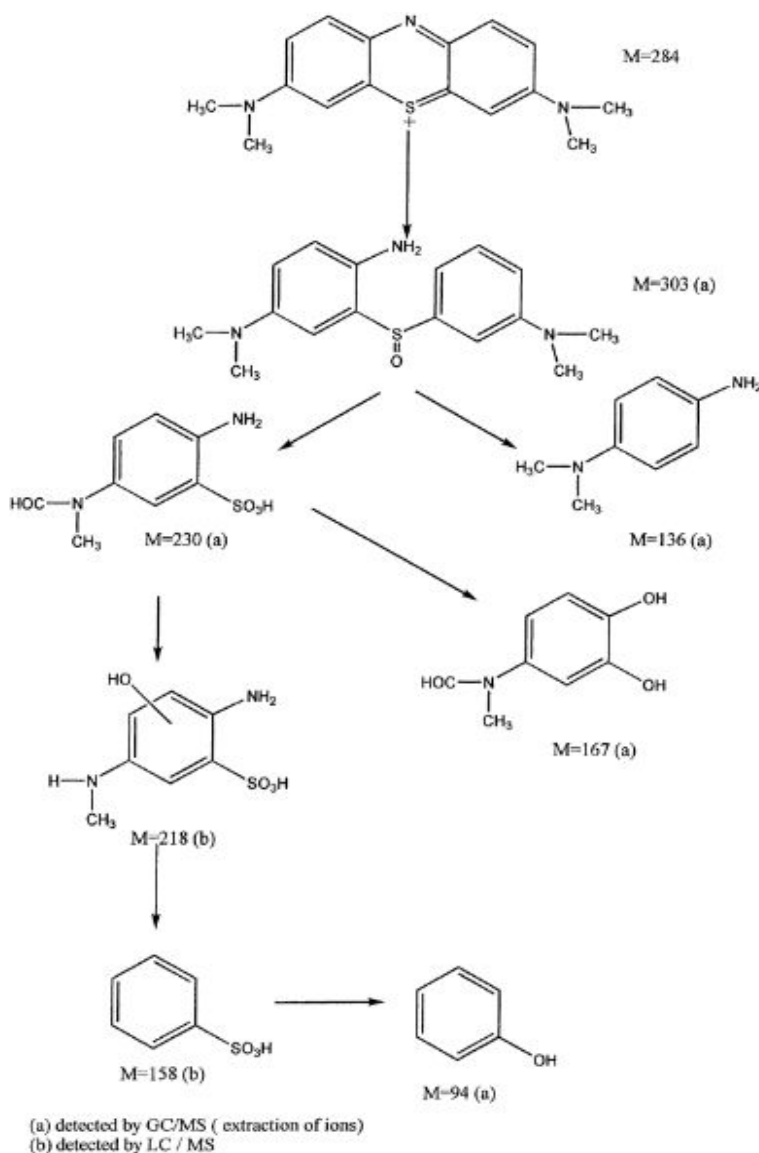


Figure 45 : Processus de dégradation du BM par photocatalyse (Houas *et al.*, 2001).

La dégradation d'autres colorants par photocatalyse a pu être mise en évidence dans différentes études. Le TiO_2 a, par exemple, été utilisé pour la dégradation de l'orange de méthyle (Guettaï et Ait Amar, 2005), du rouge Congo (Kanna et Wongnawa, 2008; Zoltan *et*

al., 2016) ou encore du cristal violet (Kanna et Wongnawa, 2008). En effet, la dégradation de nombreux colorants est utilisée comme modèle afin de suivre la dégradation des polluants dans les eaux traitées (Tang et Huren An, 1995). Ainsi, toutes ces études mettent en évidence que le TiO_2 est capable de dégrader ces colorants *via* l'actions des EROs produites. Comme présenté dans le chapitre I, il existe différentes EROs dont le peroxyde d'hydrogène, les ions superoxydes et les radicaux hydroxyles.

C.

plus d'énergie lors de la photocatalyse. Là encore aucune production d' H_2O_2 n'a pu être observée pour les essais réalisés avec les couches minces de TiO_2 (Figure 47). Cependant, pour les échantillons témoins (verre sodocalcique, acier inoxydable, ainsi que le témoin réalisé avec uniquement de l'eau, une augmentation de l'absorbance à 505 nm a pu être mesurée (Figure 47). Cette augmentation traduit la formation d' H_2O_2 en faible quantité, environ 6 ppm due au phénomène de photolyse de l'eau.

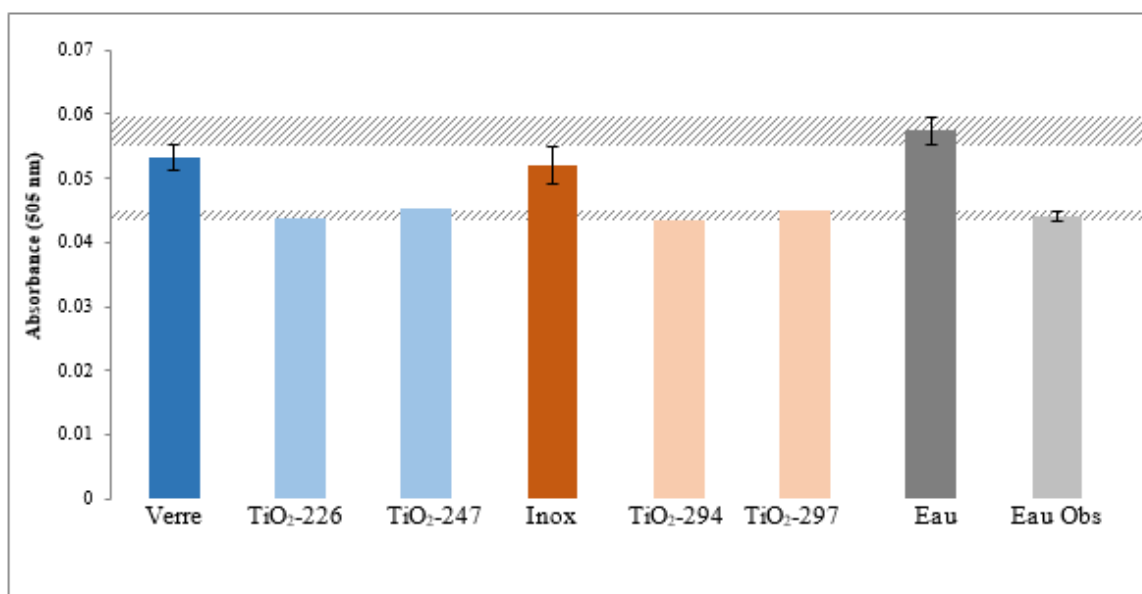


Figure 47 : Mesure de l'absorbance à 505 nm pour le dosage de l' H_2O_2 par les différentes couches minces après exposition sous UVC, excepté pour l'eau conservée à l'obscurité (Eau obs).

Avec les coupons des échantillons recouverts de couches minces, sous illumination UVC, aucun H_2O_2 n'est détectable. La question qui se pose alors est de savoir ce que devient l' H_2O_2 formé par la photolyse de l'eau. Tout d'abord, une expérience simple a permis de mettre en évidence la conversion de l' H_2O_2 par les couches minces de TiO_2 . Pour cela, des solutions standards à différentes concentration d' H_2O_2 ont été réalisées et déposées sur les coupons. Après 60 minutes d'exposition ou non sous UVC, la solution est récupérée et le dosage de l' H_2O_2 est effectué (Figure 48). Dans les puits avec 300 ppm, l'absence de coloration rouge pour la solution sur le coupon de TiO_2 est clairement visible par rapport aux témoins sur verre sodocalcique.

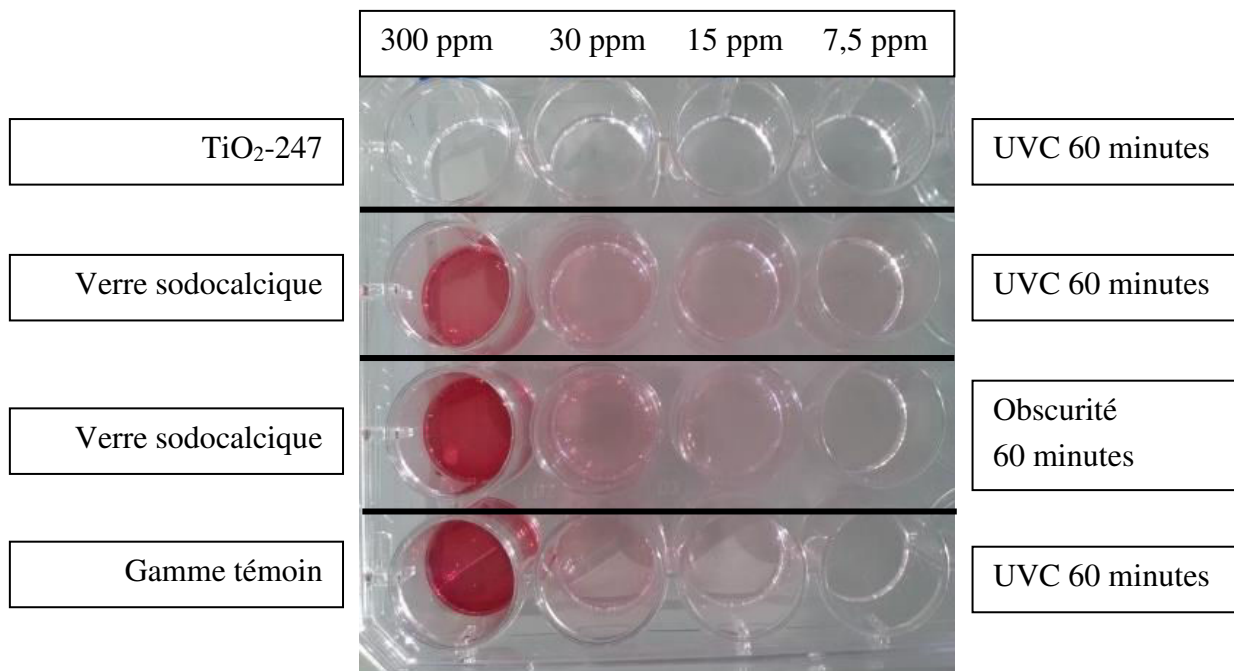


Figure 48 : Mise en évidence de la conversion de l'H₂O₂ pour la couche mince de TiO₂ déposée sur verre sous UVC pendant 60 minutes.

L'H₂O₂ déposé à la surface du coupon de TiO₂ a donc été entièrement converti en un autre composé. Ces observations étant réalisées sous UVC, que se passe-t-il sous UVA ?

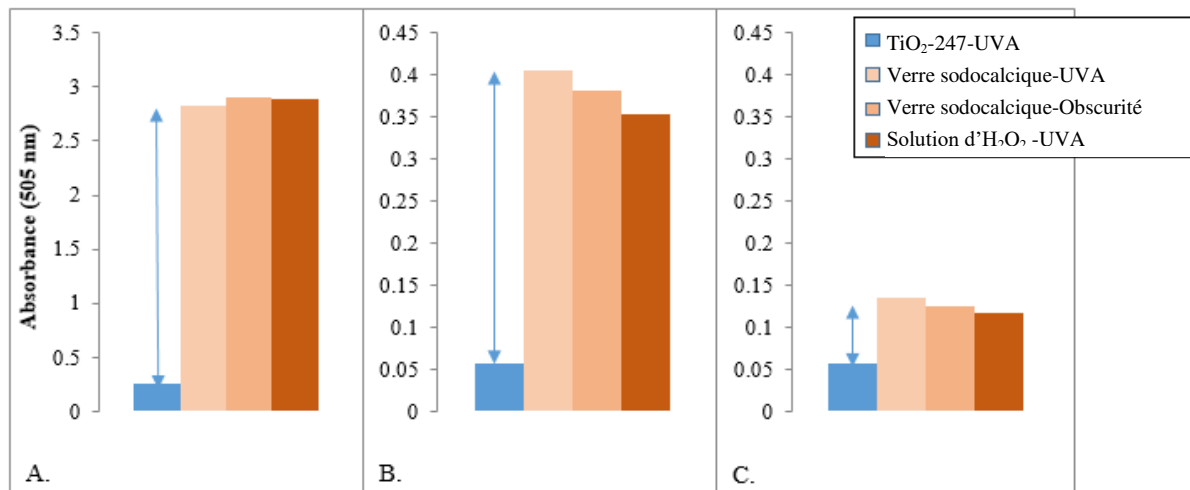


Figure 49 : Mise en évidence de la conversion de l'H₂O₂ par la couche mince de TiO₂ sous UVA pendant 20 minutes. A. [H₂O₂] = 300 mg.L⁻¹, B. [H₂O₂] = 30 mg.L⁻¹, C. [H₂O₂] = 7,5 mg.L⁻¹

Sous UVA, la mesure d'absorbance à 505 nm montre qu'avec les échantillons de verre sodocalcique, le peroxyde d'hydrogène déposé à la surface est toujours présent après illumination sous UVA pendant 20 minutes (Figure 49). La diminution de l'absorbance a

également lieu sous UVA avec la couche mince de TiO_2 . Les couches minces sont capables de convertir l' H_2O_2 , même à forte concentration, au-delà de 300 mg.L^{-1} . À partir de ces résultats, il est intéressant de connaître les produits de conversion de l' H_2O_2 .

D. Anions superoxydes

La première supposition est que l' H_2O_2 pourrait être converti en anions superoxyde. La production des anions superoxydes ($\text{O}_2^{\bullet-}$) est mesurée par spectrophotométrie. La présence de bleu de formazan est détectée après réduction du chlorure de bleu nitrotetrazolium (NBT) (Chapitre II, section IV.B.).

Les premiers tests ont été réalisés sous UVC pendant 60 minutes. Aucune différence significative d'absorbance n'a été observée, que cela soit avec les couches minces de TiO_2 déposées sur substrat de verre sodocalcique, ou sur acier inoxydable. Malgré l'optimisation du protocole pour la détection de $\text{O}_2^{\bullet-}$, aucune production significative avec nos couches minces n'a pu être mise en évidence.

Cependant, une faible quantité de $\text{O}_2^{\bullet-}$ est probablement produite à la surface de nos couches minces, comme le montre la Figure 50. Après 20 minutes ou 60 minutes d'illumination sous UVA, il apparaît une très faible augmentation de l'absorbance à 530 nm pour les échantillons provenant des couches minces de TiO_2 . Cependant, cette différence n'est pas significative, mais il est possible de voir dans ses résultats une tendance à la production de $\text{O}_2^{\bullet-}$.

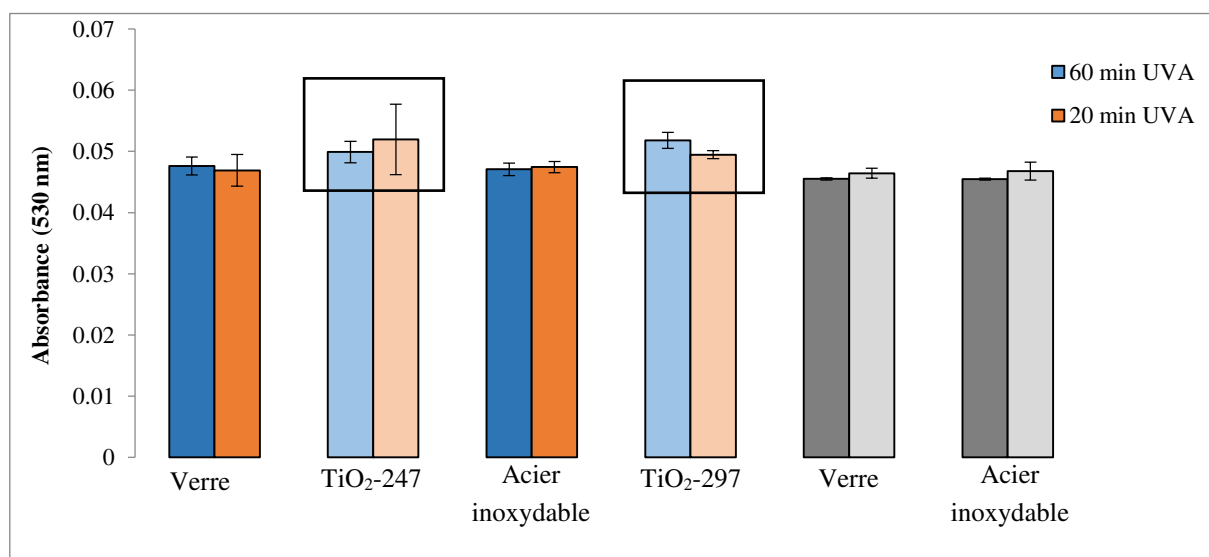


Figure 50 : Détection de la production d'anions superoxydes ($\text{O}_2^{\bullet-}$) par dosage spectrophotométrique de la formation de bleu de formazan à partir des couches minces de TiO_2 photoactivées.

Afin de vérifier le test utilisé, une expérience avec le TiO₂ Degussa P25® a été menée. Pour cela, le TiO₂ sous forme de poudre a été déposé à la surface de coupons de verre. Des suspensions à 1mg.mL⁻¹ et 0,01 mg.mL⁻¹ de TiO₂ Degussa P25® ont été réalisées. Après séchage pendant 48h à l'obscurité, la solution de NBT est déposée sur les coupons. Les coupons sont ensuite illuminés sous UVA. Les témoins négatifs correspondent à des coupons en verre sans ajout de suspension de TiO₂, soumis au même protocole que les autres échantillons de TiO₂ P25. L'absorbance est ensuite mesurée à 530 nm (Figure 51).

À forte concentration, 1mg.mL⁻¹ de TiO₂, l'absorbance à 530 nm est nettement supérieure à celle du témoin. Lorsque la concentration de TiO₂ est diluée au 1/100^{ème}

UVA est déterminée *via* l'inhibition de la décoloration du bleu de méthylène (Chapitre II, Section IV.C.).

Pour cela, un test de décoloration du BM est mené en présence de mannitol. L'absorbance des solutions provenant de la surface des échantillons est mesurée et des spectres d'absorption sont obtenus pour chacune des conditions testées (Figure 52).

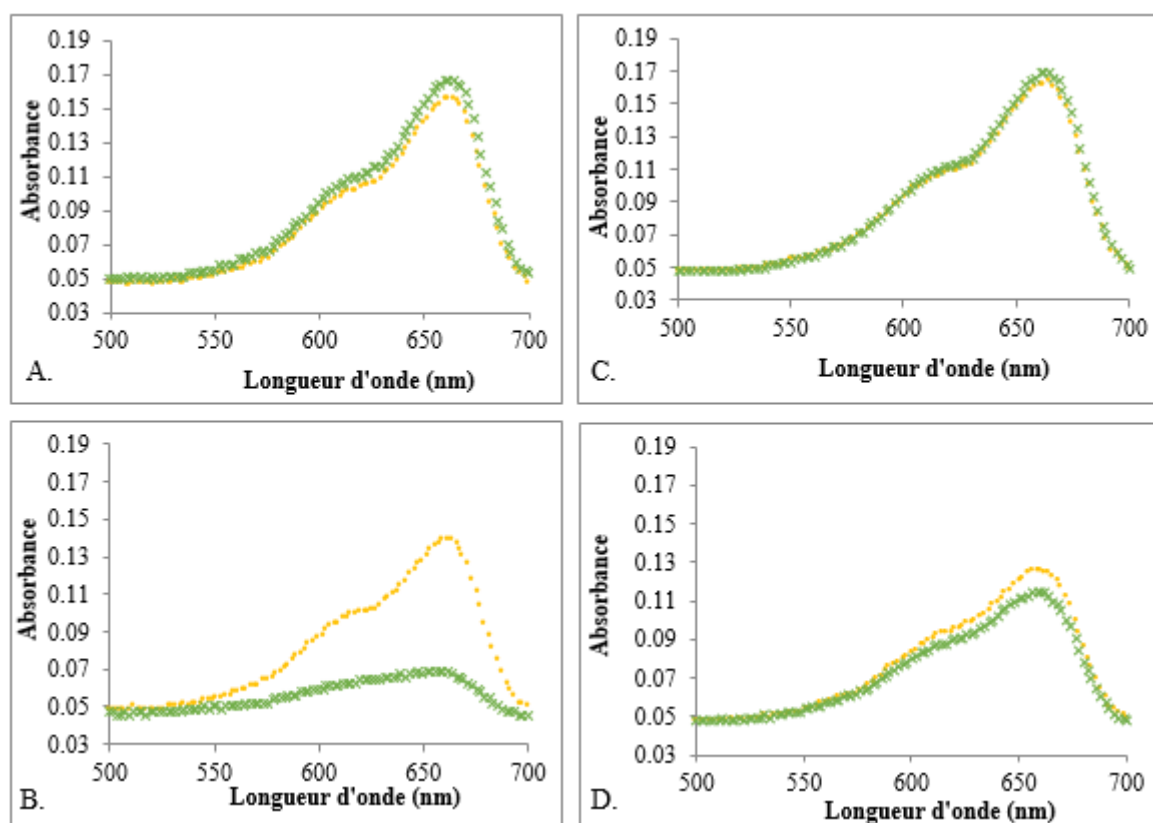


Figure 52 : Spectres d'absorbance des solutions de BM provenant de la surface de différents échantillons après exposition 60 minutes sous UVA. A. Verre sodocalcique, B. TiO₂-247, C. Acier inoxydable, D. TiO₂-297. ● BM à 0,002% avec 600 mM de mannitol ; × BM à 0,002%

Après l'illumination sous UVA, le BM ne subit aucune décoloration sur les échantillons témoins, verre et acier inoxydable en présence ou non de mannitol. La couche mince de TiO₂ déposée sur verre permet en absence de mannitol une décoloration du BM. Lorsque le test de décoloration est réalisé en présence de mannitol, le BM n'est pas décoloré. En ce qui concerne la couche mince de TiO₂ déposée sur acier inoxydable, il semble que l'activité photocatalytique de cette couche mince ne soit plus efficace. Ces coupons particuliers ont été exposés de manière prolongée à de l'eau physiologique ce qui a généré de la corrosion. Cette corrosion a pu altérer la couche mince et donc annuler les effets photocatalytiques.

Le même test a été réalisé avec la couche mince de TiO₂-377, la couche mince de TiO₂ déposée sur acier inoxydable, la plus photoactive. Cet échantillon a été testé avec l'échantillon TiO₂-226 afin de pouvoir comparer des couches minces d'épaisseur identique (Figure 53).

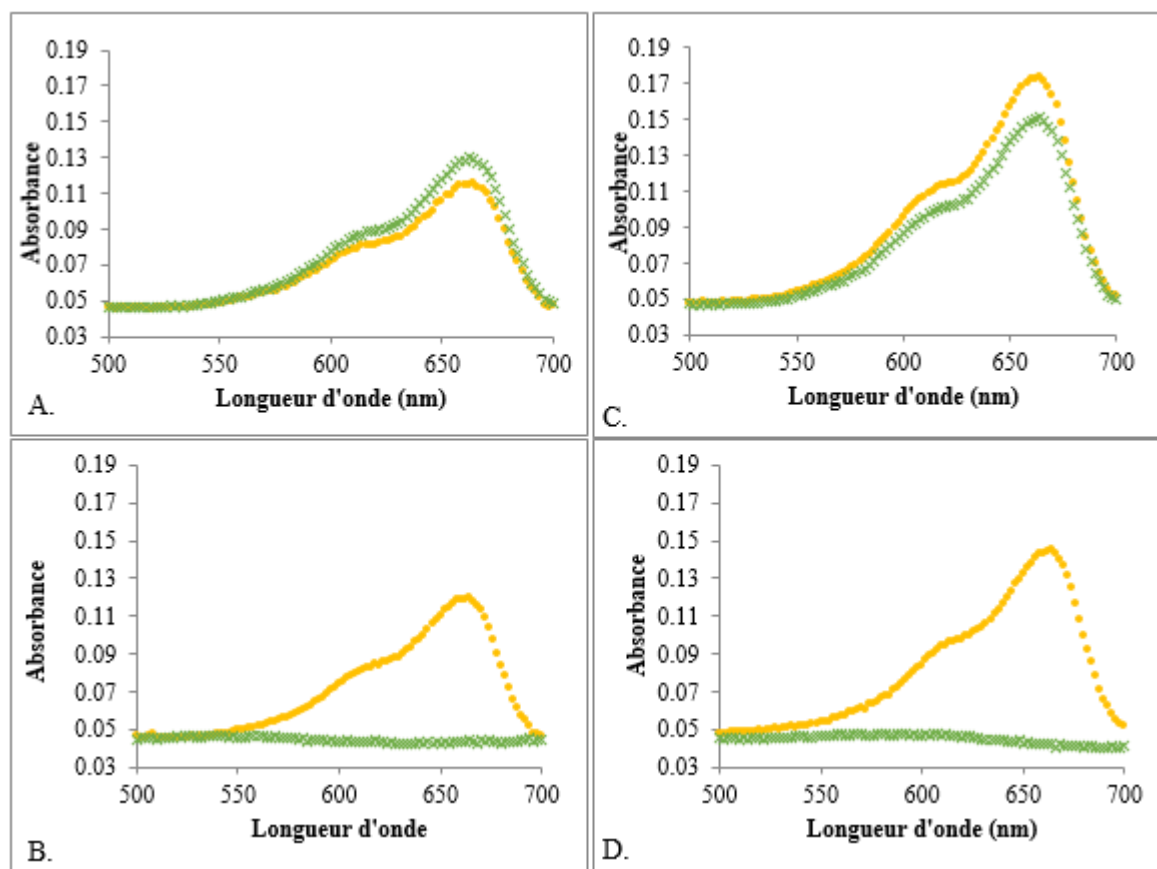


Figure 53 : Spectres d'absorbance des solutions de BM provenant de la surface de différents échantillons après exposition 60 minutes sous UVA. A. Verre sodocalcique, B. TiO₂-226, C. Acier inoxydable, D. TiO₂-377. ● BM à 0,002% avec 300 mM de mannitol ; × BM à 0,002%

Les spectres obtenus pour les témoins exposés aux UVA en 60 minutes, montrent qu'aucune décoloration n'est obtenue. Le verre et l'acier inoxydable seuls sous UVA ne possèdent pas d'activité photocatalytique et les UVA n'ont pas d'effet sur le BM. Les spectres obtenus avec les deux couches minces de TiO₂ présentés sur la Figure 53 mettent en évidence l'activité photocatalytique *via* la décoloration du BM. En présence de mannitol, aucune décoloration n'est observée.

D'après ces résultats, l'activité photocatalytique de nos couches minces de TiO₂ est possible en partie grâce à la production de $\bullet\text{OH}$. En effet, le mannitol est capable de piéger ces radicaux. Ainsi si aucune décoloration du BM n'a lieu en présence de mannitol, c'est que ce composé a permis de piéger les radicaux $\bullet\text{OH}$ impliqués dans l'activité photocatalytique. Les radicaux $\bullet\text{OH}$ représentent, dans le cadre de nos couches minces de TiO₂, une ERO primordiale dans la dégradation du bleu de méthylène.

Selon Zoltan *et al.* (2016), la quantité de $\bullet\text{OH}$ produit est plus faible avec le TiO_2 sous forme rutile par rapport à la forme anatase du TiO_2 . Cependant, aucune différence significative n'a pu être observée avec nos couches minces. De plus, les radicaux $\bullet\text{OH}$ possèdent un temps de vie très court. Il est nécessaire d'utiliser une méthode indirecte *via* l'ajout des réactifs pendant l'illumination sous UVA, la première étape étant de vérifier l'absence de dégradation de ces réactifs par les rayonnements UVA.

III. Réponses bactériennes aux stress impliqués par la photocatalyse

Si l'activité antibactérienne confère un bénéfice indéniable à l'utilisation de revêtements de surfaces à base de TiO_2 , il est toutefois nécessaire d'estimer les risques à l'utilisation de ces couches minces. Les bénéfices et risques de ces couches minces doivent donc être pris en considération. Il s'agit de la balance entre l'amélioration de l'hygiène dans les IAA et la question de la réponse des bactéries survivantes aux différents stress qu'elles rencontrent.

Dans les chapitres précédents, les couches minces de TiO_2 ont été élaborées et testées contre différentes souches, à la fois des souches de références mais aussi des souches environnementales provenant d'IAA. Ces couches minces de TiO_2 ont permis de réduire la population de bactéries adhérentes à la surface. Après 20 minutes d'illumination sous UVA, le nombre de bactéries adhérentes de *L. monocytogenes* a, par exemple, été réduit de près de 2 Log après 20 minutes d'illumination.

L'état physiologique des bactéries a pu être observé grâce à la microscopie électronique à balayage. Ainsi, les bactéries adhérentes sur couches minces de TiO_2 activées par les UVA ont montré une physiologie différente. En effet sur ces supports activés, les bactériens semblent être endommagés au niveau de leur paroi et vidées en partie de leur contenu cytoplasmique. Cependant, une certaine quantité de cellules ne semblent pas altérées. Elles peuvent avoir subi un choc subléthal et mis en place des mécanismes de réponses face à l'utilisation de nos couches minces. Il est donc primordial d'étudier ces mécanismes afin de valider l'application de tels revêtements dans la lutte contre la présence de biofilms.

Ce chapitre sera, dans un premier temps, dédié à l'étude des souches face aux stress qui composent l'effet photocatalytique des couches minces, c'est-à-dire le stress lié aux rayonnements UVA mais également le stress lié aux EROs. Pour cela, les souches ont été testées *via* à vis d'un composé simple en mise en œuvre, le peroxyde d'hydrogène. Ces approches sont tout d'abord microbiologiques. Ensuite, des approches de biologie

moléculaire ont permis d'appréhender les mécanismes de réponse aux stress oxydatif chez *L. monocytogenes*.

L'effet antibactérien des couches minces activées par les rayonnements UV combine deux effets, l'un dû aux rayonnements UV et l'autres aux ROS. Afin de découpler ces deux effets, la sensibilité des souches aux UVA a été évaluée puis la sensibilité à un stress oxydatif en présence d'H₂O₂.

A. Effet des UVA

Afin de tester les effets des UVA sur la cultivabilité des différentes souches utilisées au cours des tests des couches minces, la technique des micro-dépôts est utilisée. L'objectif ici est à la fois d'observer les différences d'effet des UVA entre espèces mais aussi entre souches d'une même espèce.

Deux souches de *L. monocytogenes* ont été testées : *L. monocytogenes* ScottA une souche de référence et *L. monocytogenes* ECL 136 isolée d'une surface d'abattoir de porcs (Figure 54).

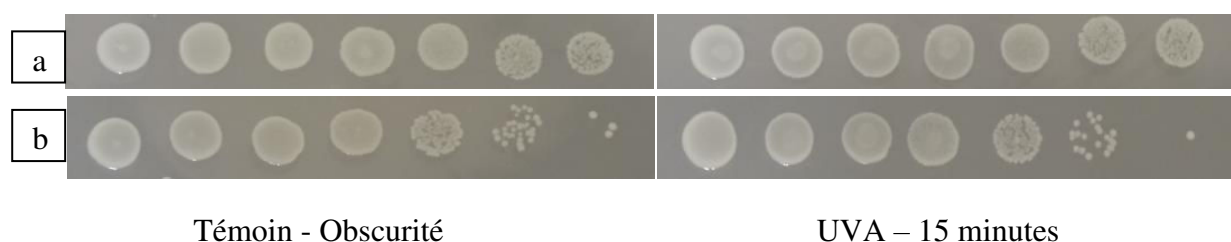


Figure 54 : Test par micro-dépôts pour *Listeria monocytogenes*. a. *L. monocytogenes* ScottA, c. *L. monocytogenes* ECL 136.

Les deux souches ne semblent pas sensibles aux UVA. En effet, les mêmes dilutions peuvent être observées même après le traitement UVA. Il n'existe aucune différence entre les souches de cette espèce.

Les mêmes tests ont été réalisés pour les deux souches de *Y. enterocolitica* (Figure 55). Ici, la souche de référence est la souche *Y. enterocolitica* IP 134, la souche qui a été isolée d'un porc en abattoir est la souche *Y. enterocolitica* 09 ALY 405.



Figure 55 : Test par micro-dépôts pour les souches de *Yersinia enterocolitica*. a. *Y. enterocolitica* IP 134, b. *Y. enterocolitica* 09 ALY 405.

Cette fois encore les souches ne présentent pas une forte sensibilité face aux UVA. Cependant, les dépôts des plus faibles concentrations pour la souche de référence et la souche de terrain ne sont plus visibles. Pour ces deux souches, les UVA ont permis de réduire de près de 2 Log la population de bactérie.

En ce qui concerne les souches de *Pseudomonas fragi*, le premier test (Chapitre III., Section I.B.) a mis en évidence une très forte sensibilité face aux UVA de la souche de référence *P. fragi* CIP55.4T. Afin de valider cette sensibilité accrue, cette souche a été testée par rapport à d'autres souches de la même espèce prélevée de surfaces d'abattoir (Chasseignaux, 1999) (Figure 56).

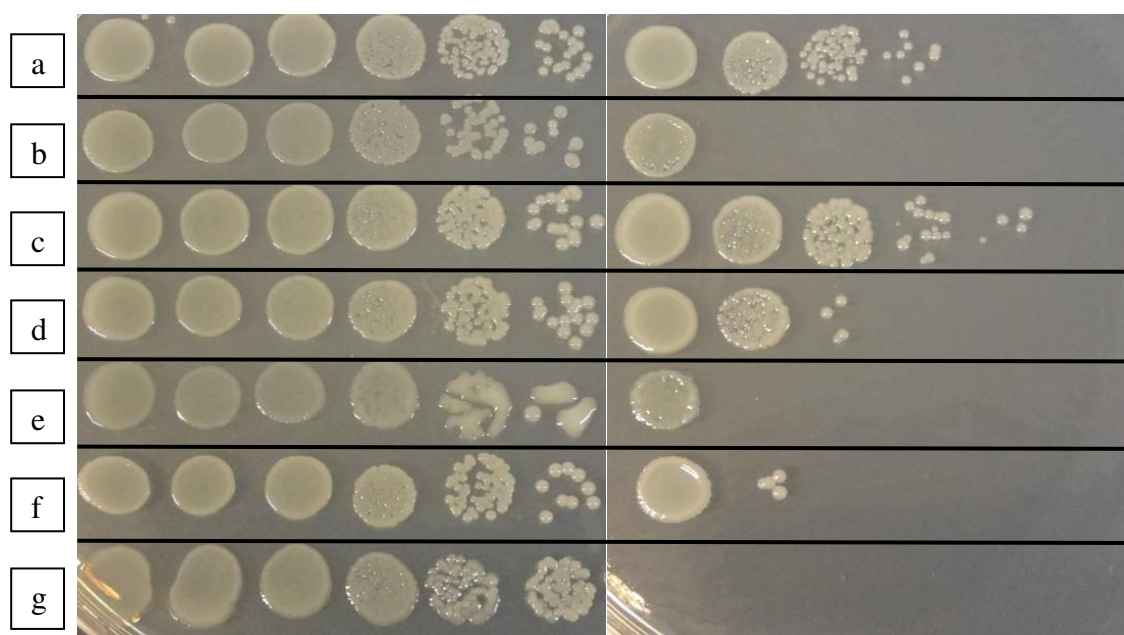


Figure 56 : Tests par micro-dépôts pour des souches de *Pseudomonas fragi*. a. ECF146, b. ECF166, c. ECF 191, d. ECF 196, e. ECF 202, f. ECF 464 et g. CIP55.4T.

Toutes les souches de *P. fragi* présentent une forte sensibilité face aux UVA, avec au minimum 2 Log de diminution. En comparaison avec les souches de terrain, la souche de référence *P. fragi* CIP55.4T est beaucoup plus sensible. Aucun dépôt n'est visible après le passage sous les UVA.

Ces tests mettent en évidence que des souches différentes ne répondent pas de manière égale face à un même stress. *Listeria monocytogenes* est l'espèce, parmi les trois espèces testées, la moins sensible aux rayonnements UVA. De manière générale, les bactéries à Gram positif sont plus résistantes aux rayonnements UV que les bactéries à Gram négatif (Arrage *et al.*, 1993; Cheigh *et al.*, 2012). Pour rappel, *Listeria* est une bactérie gram +, alors que *Yersinia* et *Pseudomonas* sont des bactéries à Gram -. Les résultats obtenus dans notre étude confirment ceux présentés dans une précédente étude où les souches de *L. monocytogenes* étaient moins sensibles que les souches de *P. fragi* (De Nardi *et al.*, 2016). De plus, la sensibilité des bactéries face aux rayonnements UV est corrélée à la présence de thymine dans l'ADN. En effet, plus l'ADN contient de bases de type thymine, plus les bactéries sont sensibles aux effets des UV. La thymine est la base la plus affectée par les UV par la formation de dimères de thymine (Forney et Moraru, 2009). Cependant, le pourcentage de bases AT est autour de 60%, pour *L. monocytogenes*, 50% pour *Y. enterocolitica* et 42% pour *P. fragi*. Les souches de *P. fragi* sont tout de même les plus sensibles aux UVA.

Un facteur supplémentaire peut expliquer la sensibilité accrue aux UVA. Il s'agit de la taille des bactéries. Une bactérie de taille supérieure à 1 micron possède un cytoplasme plus important et donc qui absorbe plus les rayonnements UVA (Forney et Moraru, 2009). Dans l'ordre, les bactéries les plus grandes sont *P. fragi* puis *L. monocytogenes* et enfin *Y. enterocolitica*.

Il ne faut pas oublier un facteur très important dans la sensibilité aux rayonnements UV. Il s'agit de la capacité des bactéries à réparer les dommages créés par les UV. Ces mécanismes font intervenir différentes réponses qui sont décrites plus loin dans ce chapitre.

B.

Tableau 12 : Résultats des tests de CMI par rapport au peroxyde d'hydrogène pour les souches de *L. monocytogenes*, *Y. enterocolitica* et *P. fragi*.

Espèce	Souche	CMI (% d'H ₂ O ₂)
<i>Listeria monocytogenes</i>	Scott A	0,047
	ECL136	0,047
<i>Yersinia enterocolitica</i>	IP134	0,75
	09 ALY 405	0,375
<i>Pseudomonas fragi</i>	ECF 146	0,047
	CIP55.4T	0,006
	ECF166	0,047
	ECF191	0,047
	ECF196	0,047
	ECF202	0,047
	ECF464	0,047

Les souches les moins sensibles au stress oxydatif généré par le peroxyde d'hydrogène, sont les souches de *Y. enterocolitica* avec une CMI assez élevée à 0,375% pour la souche de terrain et 0,75% pour la souche de référence.

Les souches de *L. monocytogenes* possèdent une CMI égale à 0,047%. Aucune différence entre les souches n'a été observée. Il est également possible que la sensibilité au stress oxydatif ne soit pas différente entre les souches lorsqu'il est généré par l'H₂O₂.

En ce qui concerne les souches de *P. fragi*, il s'agit une nouvelle fois de la souche de référence CIP 55.4T qui apparaît la plus sensible avec une CMI égale à 0,006%. Sa valeur de CMI est près de 10 fois inférieure à la valeur de CMI des autres souches de *P. fragi*.

C. Test de MATS

Les propriétés de surfaces des souches conditionnent leur adhésion à un support (Carpentier et Cerf, 1993; Giovannacci *et al.*, 2000).

Les résultats obtenus pour les souches de *L. monocytogenes*, montrent qu'elles possèdent un caractère donneur d'électrons plutôt qu'accepteur d'électrons (Figure 57). L'affinité des deux souches pour le chloroforme et l'hexadécane est supérieure à l'affinité pour l'acétate d'éthyle et le décane. La souche *L. monocytogenes* ScottA apparaît comme la plus hydrophobe, car son affinité pour les solvants non polaires (décane/hexadécane) est la plus importante.

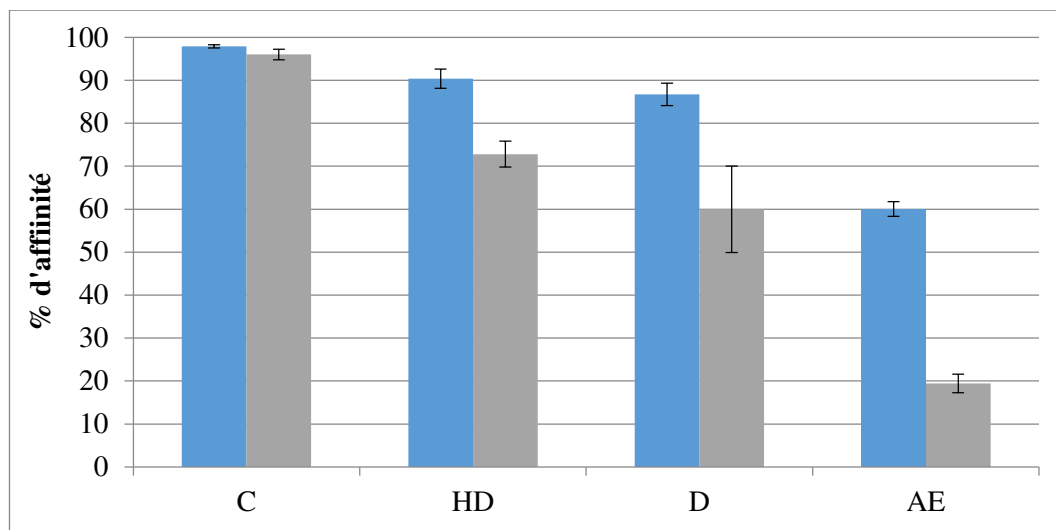


Figure 57 : Affinité des souches de *L. monocytogenes* pour différents solvants, chloroforme (C), hexadécane (HD), décane (D) et acétate d'éthyle (AE), ScottA en bleu et ECL136 en gris.

Briandet *et al.*, (1999) ont testé la souche *L. monocytogenes* ScottA afin de caractériser son caractère de surface. Ils ont par exemple montré que le milieu de culture pouvait avoir un impact. Ainsi, la souche testée dans leur étude possède le même profil d'affinité, c'est-à-dire une affinité très élevée pour le chloroforme (un solvant accepteur d'électron) et l'affinité la plus faible pour l'acétate d'éthyle (solvant donneur d'électron). Cela indique qu'à la surface de la paroi bactérienne se trouvent en majorité des groupements accepteurs d'électrons. Dans cette étude, les données indiquent que l'adhésion de *L. monocytogenes* ScottA implique également les propriétés acide-base de Lewis.

Les souches de *Y. enterocolitica* possèdent un profil similaire (Figure 58). Cette fois encore, les souches ont une très forte affinité pour le chloroforme. Ce sont donc des souches plutôt hydrophobes au vu de la forte affinité pour les solvants non polaires.

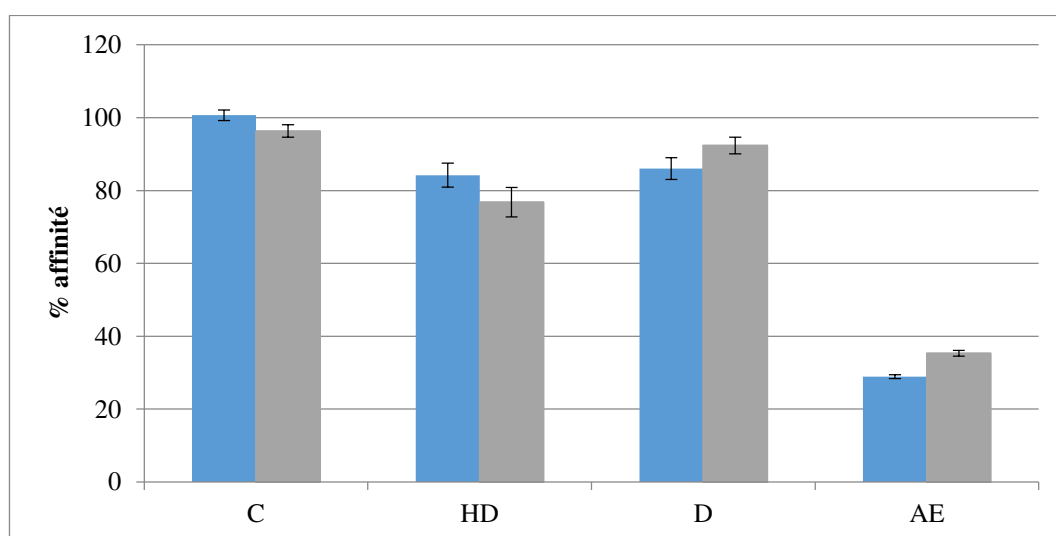


Figure 58 : Affinité des souches de *Y. enterocolitica* pour différents solvants, chloroforme (C), hexadécane (HD), décane (D) et acétate d'éthyle (AE). *Y. enterocolitica* IP134 en bleu, 09ALY405 en gris.

Un profil complètement différent est obtenu avec les souches de *P. fragi* (Figure 59). Les deux souches présentent une très faible affinité pour les solvants non polaires. Elles sont par conséquent plutôt hydrophiles. Les souches à Gram – présentent à leur surface des lipopolysaccharides contrairement à *L. monocytogenes* (Gram +) qui présente plutôt des acides téichoïques.

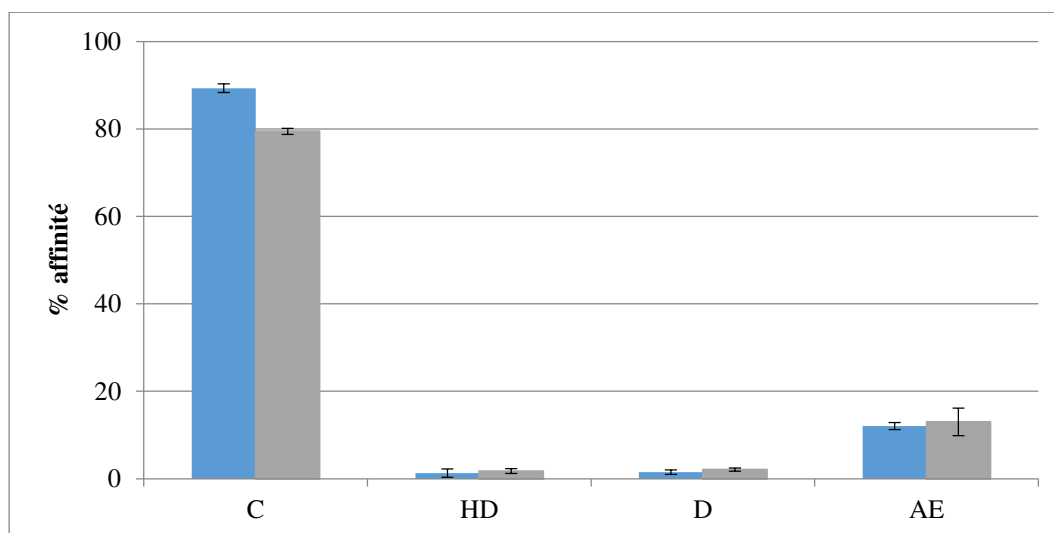


Figure 59 : Affinité des souches de *P. fragi* pour différents solvants, chloroforme (C), hexadécane (HD), décane (D) et acétate d'éthyle (AE). *P. fragi* CIP 55.4T en bleu, ECF 146 en gris.

Cependant, aucune différence dans la capacité d'adhésion des souches n'a été observée quel que soit le matériau (verre, acier inoxydable ou couche mince de TiO_2). Les matériaux ne possèdent pas le même caractère hydrophobe. En effet, le verre est plus hydrophile que l'acier inoxydable. Les propriétés des couches minces semblent être intermédiaires lorsque la couche mince n'est pas exposée aux UV. Lorsque la couche mince est illuminée, ses propriétés de surface sont radicalement différentes (Allion *et al.*, 2007; De Nardi *et al.*, 2016). La surface devient superhydrophile (Figure 60).

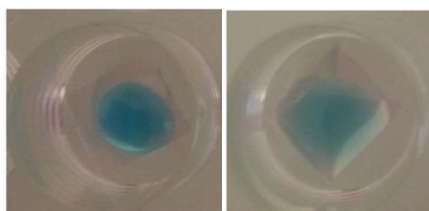


Figure 60 : Modification des propriétés de surface des couches minces de TiO_2 après exposition (60 minutes) aux UVA.

La superhydrophilie du TiO_2 est un phénomène reconnu (Allion *et al.*, 2007; Bazaka *et al.*, 2012). La modification de cette propriété de surface pourrait entraîner des modifications par rapport à l'adhésion de certaines bactéries. Cette propriété superhydrophile se caractérise

par un étalement d'une solution aqueuse déposée à la surface après illumination aux UVA comme le montre la figure X ci-dessus.

D. Marquages fluorescents *in situ*

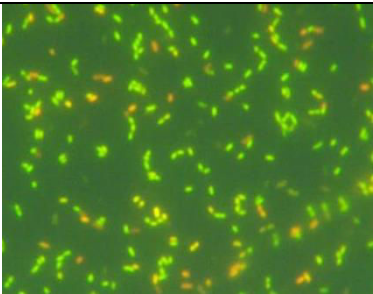
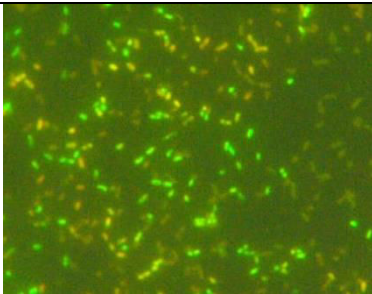
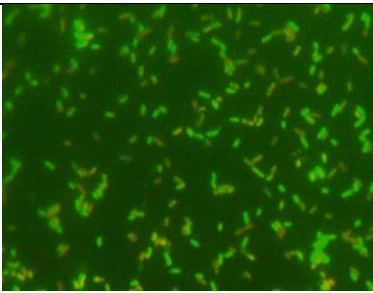
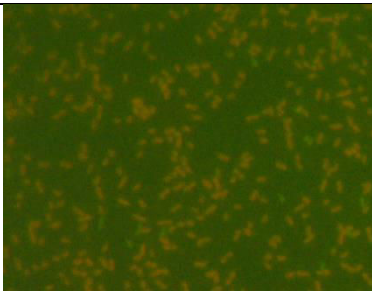
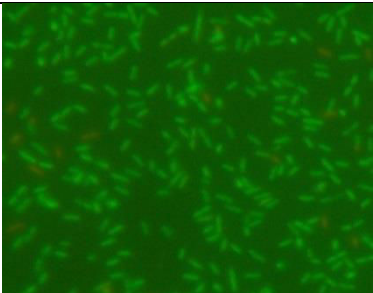
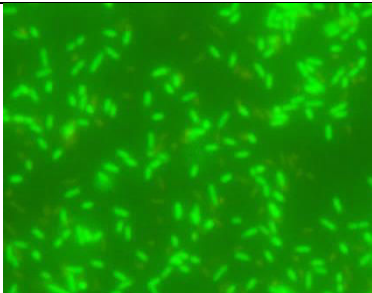
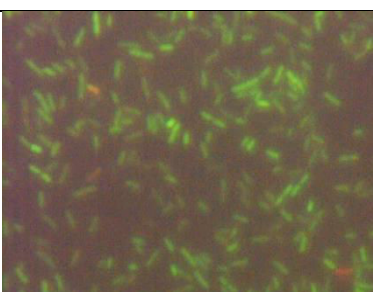
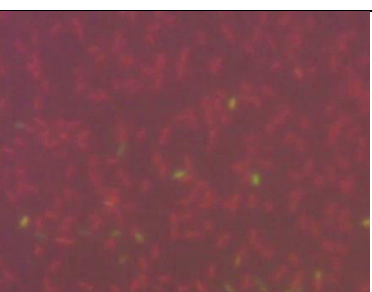
<i>L. monocytogenes</i> ScottA	Verre sodocalcique	TiO ₂ - 87
Obscurité		
UVA+		
<i>L. monocytogenes</i> ECL136	Verre sodocalcique	TiO ₂ -87
Obscurité		
UVA+		

Tableau 13 : Observations de bactéries adhérentes après marquages fluorescents *in situ* (LIVE/DEAD® Film Tracer) sur verre sodocalcique et TiO₂ 87. Observations après 60 minutes à l'obscurité ou après 60 minutes d'illumination sous UVA (UVA+). Les cellules vertes sont vivantes et les cellules orange sont mortes

L'effet antibactérien des couches minces a dans un premier temps été déterminé par dénombrement des bactéries adhérentes suite à l'exposition au TiO₂. En parallèle de ces dénombrements, une méthode de marquage fluorescent directement effectué sur les bactéries adhérentes est entreprise (Chapitre II, Section V.D). Cette méthode a pour objectif de confirmer les conclusions tirées des dénombrements, c'est-à-dire de confirmer un effet antibactérien des couches minces de TiO₂ photoactivées.

Ce marquage différentiel des bactéries adhérentes vivantes (vertes) ou mortes (orange) est un indicateur sur la viabilité après traitement. Sur les coupons de TiO₂-87 exposés aux UVA pendant 60 minutes, la population bactérienne est presque en totalité orange par comparaison au témoin (Tableau 13). Les bactéries exposées uniquement aux UVA, présentent un marquage majoritairement de couleur verte indiquant que les UVA n'ont pas eu d'impact au niveau membranaire contrairement à la photocatalyse. Ce résultat est en adéquation avec ce qui a été observé précédemment.

Cependant, il reste des bactéries moins sensibles à l'activité des couches minces de TiO₂. Il apparaît important de pouvoir tenter de comprendre les mécanismes impliqués dans la réponse des bactéries face au stress généré par la photocatalyse.

IV.

L. monocytogenes ScottA est une souche appartenant au sérotype 4b. Une *L. monocytogenes* 4b a été utilisée dans une étude menée par Suo *et al.* (2014) pour le suivi de l'expression de gènes impliqués dans la réponse au stress oxydatif. Ainsi, la souche a été cultivée dans un bouillon contenant un oxydant : le viologène de méthyle (methyl viologen - MV). Les auteurs se sont placés à une concentration de MV sublétalement pour la bactérie, soit 1 mM. Dans notre cas, la concentration choisie pour *L. monocytogenes* ScottA est à 10 mM. En parallèle, des tests avec des cellules cultivées en présence d'H₂O₂ en dessous de la CMI ont été réalisés. Les résultats sont présentés dans la figure 61.

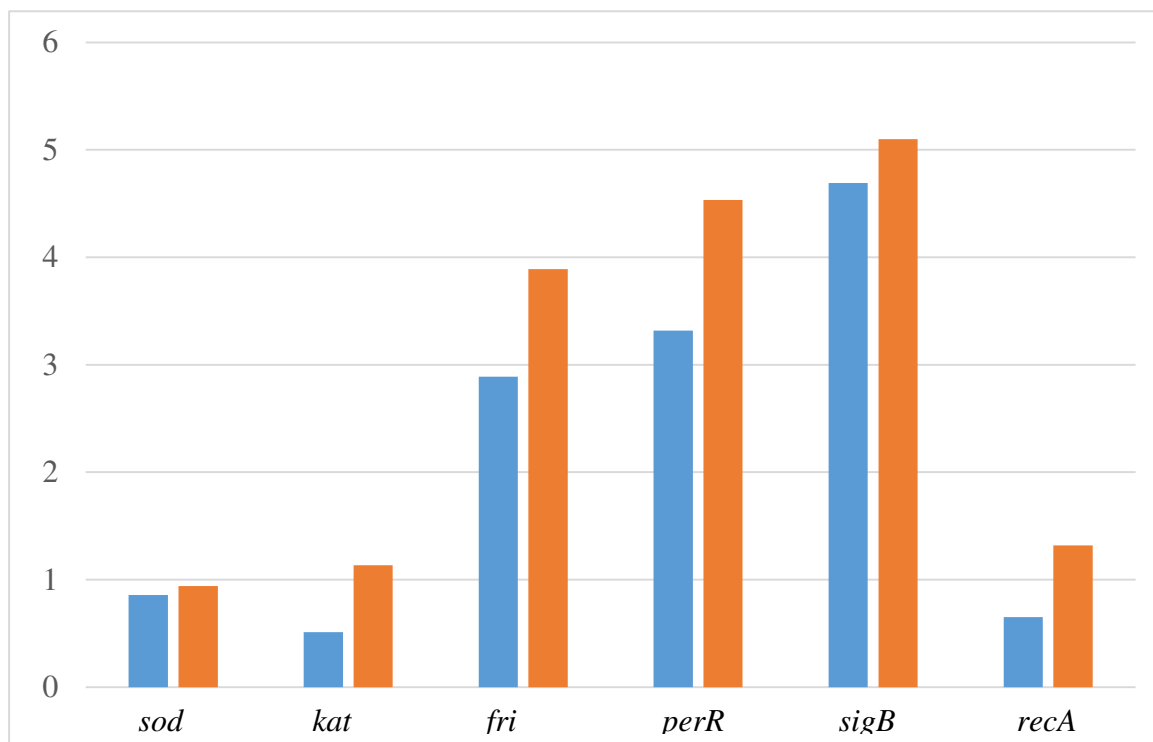


Figure 61 : Expression relative des différents gènes d'intérêt pour la souche *L. monocytogenes* ScottA en présence d'H₂O₂ (0,030%) (en bleu) et en présence de MV (10mM) (en orange)

Ces résultats peuvent être comparés avec ceux obtenus par Suo *et al.* (2012), à partir d'une souche du même sérotype que *L. monocytogenes* ScottA, c'est-à-dire une souche 4b (Figure 62).

Figure 62 : Expression relative des différents gènes d'intérêt pour une souche de *L. monocytogenes* 4b en présence de MV (1mM). (Suo et al., 2012)

La souche *L. monocytogenes* ScottA en condition de stress oxydatif surexprime les gènes *fri*, *perR* et *sigB*, respectivement codant pour une protéine DPS, une peroxydase et pour le facteur Sig

Le profil de surexpression de la souche de *L. monocytogenes* que nous avons testée permet de mettre en évidence que cette souche répond au stress oxydatif et valide la méthode utilisée à la fois pour l'extraction et pour la RT-PCRq.

Un premier test avec les bactéries sur coupons de TiO₂ a été réalisé. Après adhésion et traitement UVA, les bactéries sont décrochées des coupons comme l'explique le protocole décrit dans le chapitre II, Section III.C.

Afin d'avoir le maximum de matériel génétique pour les extractions, les bactéries de trois coupons (des mêmes conditions) sont regroupées. Les extractions sont réalisées sur cet échantillon. La RT-PCRq est directement réalisée afin de perdre le minimum d'ARN. Cependant, la qualité des extraits et la quantité extraite d'ARN n'a pas permis de mettre en évidence des résultats significatifs.

En effet, le gène choisi comme gène de référence, celui codant pour l'ARNr 16S n'a été détecté qu'en très faible nombre de copies avec un cycle seuil (Ct) proche de 30. De plus, la reproductibilité des extractions sur les bactéries provenant des coupons n'est pas bonne. Les extraits d'ARN à partir des coupons sont de qualité moyenne voire mauvaise. Il sera nécessaire pour la suite des manipulations de mettre au point la méthode d'extraction pour rendre la RT-PCRq exploitable.

V. Discussion

La détection des EROs représente un challenge afin de comprendre les mécanismes impliqués dans la photocatalyse et l'effet bactéricide.

Les méthodes envisagées au cours de cette thèse ont permis de mettre en évidence l'implication importante du radical HO• dans la photocatalyse. D'après la Figure 63, HO• semble être une espèce importante dans la photocatalyse.

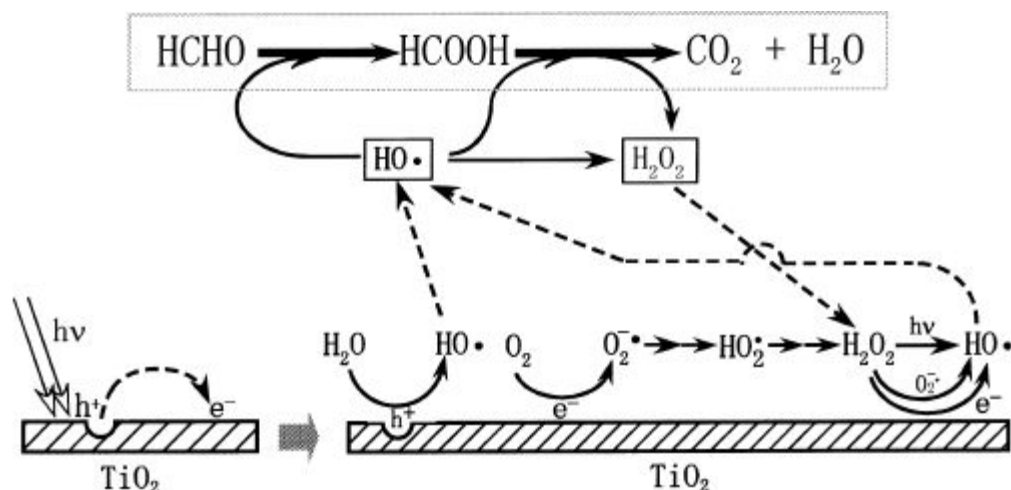


Figure 63 : Principe de la photocatalyse et implication des différentes EROs (Shiraishi *et al.*, 2003).

Lorsque la surface de TiO_2 est illuminée par un rayonnement suffisamment énergétique pour l'activer, alors il y a formation d'une paire électron-trou. La formation de cette paire est à l'origine de la formation des EROs. Le trou h^+ permet la formation de $\bullet\text{OH}$ suite à la réduction de l'eau. D'un côté, ces radicaux hydroxyles vont permettre la formation de H_2O_2 . L' H_2O_2 peut permettre, suite à l'action du rayonnement ou par réaction avec les électrons, à nouveau la formation de radicaux hydroxyles.

À la surface de nos couches minces de TiO_2 (anatase ou rutile), aucun peroxyde d'hydrogène n'a pu être détecté (Figure 63). L' H_2O_2 ajouté à la surface des couches minces a été directement converti en un autre produit (Figure 63). D'après la figure 20, il est possible que H_2O_2 déposé sur nos couches minces soit converti en $\bullet\text{OH}$ (Shiraishi *et al.*, 2003). L'implication de ces radicaux a été mise en évidence *via* l'utilisation du test de décoloration du BM en présence de molécules piégeant les $\bullet\text{OH}$ (Figure 53).

En ce qui concerne les anions superoxydes, les dosages spectro-colorimétriques n'ont pas permis de détecter cette ERO à la surface de nos couches minces de TiO_2 . Avec un photocatalyseur très actif et en forte concentration, ces anions ont pu être détectés lors de la photocatalyse. Le seuil de détection de cette méthode n'était donc pas suffisant pour nos couches minces. Il faut noter que d'autres techniques de détection et quantification des EROs existent. Cependant la plupart de ces techniques demandent un appareillage spécifique et coûteux. Parmi ces techniques, la chimiluminescence peut être employée pour la détection et le dosage des anions superoxydes. La luminescence est l'émission d'un photon lorsqu'une molécule excitée retourne vers un état énergétique moins élevé. Il s'agit de chimiluminescence lorsque l'excitation résulte d'une réaction chimique et par exemple une oxydation.

Aucune différence dans la production des EROs n'a été mise en évidence entre les phases rutile et anatase du TiO_2 . Cependant, il pourrait être nécessaire de mettre en place des tests plus précis notamment en utilisant de nouvelles techniques comme la chimiluminescence ou la résonance de spin électronique (Electron Spin Resonance – ESR).

La méthode ESR a par exemple été utilisée par (Veréb *et al.*, 2013). Ils ont comparé différents types de dioxyde de titane, rutile ou anatase, dopé ou non. L'activité photocatalytique de leur TiO_2 , a été testée *via* la dégradation de phénol et l'effet antibactérien testé sur *E. coli* K12. Les TiO_2 capables de produire des radicaux $\bullet\text{OH}$ possèdent une activité photocatalytique et un effet antibactérien contrairement aux TiO_2 ne produisant pas de $\bullet\text{OH}$. Cependant, il semble que la formation des $\bullet\text{OH}$ soit largement dépendante de la présence d' H_2O_2 (Yan *et al.*, 2009). Ces deux espèces réactives sont par conséquent, impliquées dans les mécanismes d'effet antibactérien.

Conclusions et Perspectives

Ce travail s'inscrit dans une démarche de recherche finalisée dans le domaine de la désinfection de surfaces par photocatalyse notamment dans les environnements des IAA. L'objectif est de proposer un outil innovant pour la maîtrise des pathogènes en IAA.

I. Conclusions

L'objectif de ces travaux a été de mettre au point des couches minces de TiO_2 aux propriétés photocatalytiques et antibactériennes. Pour cela, des couches minces ont été élaborées par une méthode de pulvérisation cathodique RF. Dans une démarche d'optimisation, les premiers dépôts ont été réalisés sur du verre. La seconde étape a été de transposer les conditions de dépôt et d'optimiser des couches minces sur un substrat largement rencontré dans les IAA : l'acier inoxydable 316.

Une meilleure compréhension des effets photocatalytiques et antibactériens, en vue de leur amélioration future est nécessaire. Pour ce faire, le dernier volet a porté, d'une part, sur l'étude des mécanismes à l'origine des propriétés des couches minces *via* la synthèse d'EROs et d'autre part, sur l'étude des caractéristiques physiologiques des bactéries ainsi que leur réponse au stress oxydatif. En tenant compte des résultats obtenus avec différentes espèces dans la première partie, *Listeria monocytogenes* a été retenue comme le principal modèle pour la suite des manipulations.

Étude de couches minces de TiO_2 déposées sur substrat de verre sodocalcique.

L'utilisation d'un substrat transparent et inerte, le verre, s'est avéré nécessaire pour effectuer une caractérisation complète des couches minces déposées. La détermination de la largeur du band-gap ou bande interdite, valeur caractéristique de la forme cristalline de TiO_2 , ne peut être réalisée sans des mesures de transmittance.

Lors du dépôt des couches minces de TiO_2 sur verre, il a été possible d'intervenir sur différents paramètres. Le premier a été la température de dépôt, puis la quantité d'oxygène dans l'enceinte de dépôt et enfin la durée de dépôts. En modifiant la durée de dépôt l'objectif a été de faire varier l'épaisseur de la couche mince. Intervenir sur tous ces paramètres a permis d'obtenir la couche mince de TiO_2 la plus photoactive.

Les conditions retenues sont une température de dépôt de 440°C avec 3% d'oxygène dans l'enceinte avec des paramètres de dépôts fixés. Ces conditions permettent d'obtenir une couche mince de TiO₂ de forme anatase d'une épaisseur de 80 nm, qui permet de décolorer de près de 20% une solution de BM après 60 minutes d'illumination sous UVA. De plus cette couche mince a permis de réduire la population adhérente de différentes espèces bactériennes. En revanche, cette couche mince ne possède pas d'effet anti-adhésif.

En ce qui concerne l'épaisseur de la couche mince de TiO₂, six couches minces d'épaisseur différente ont été obtenues. À faible épaisseur, les couches minces de TiO₂ présentaient toutes une phase anatase. À partir d'une épaisseur de 300 nm, le TiO₂ déposé n'était plus uniquement sous forme anatase. En effet, la croissance d'une phase rutile a également lieu. Ce mélange anatase/rutile constitue un atout pour nos couches minces étant donné qu'un photocatalyseur, le Degussa P25® constitué d'un mélange 80% anatase et 20% rutile est commercialisé comme étant l'un des plus actifs. De plus, à partir d'une certaine épaisseur, une saturation de l'activité photocatalytique est atteinte. Ce phénomène déjà observé, n'avait jamais été étudié jusqu'à ce jour par rapport à l'activité antibactérienne.

L'effet antibactérien de nos couches minces a été testé sur deux souches de *L. monocytogenes*. Aucun effet anti-adhésif n'a été obtenu sur ces souches. Toutefois *L. monocytogenes* ECL136, la souche environnementale, a montré une sensibilité maximale à partir de la couche mince de TiO₂ d'une épaisseur de 240nm. Une corrélation existe entre l'amplitude de l'activité photocatalytique et celle de l'effet antibactérien. Toutefois, quelques variations ont été observées entre les souches testées. Ceci est certainement lié à des caractéristiques génétiques et physiologiques différentes. En effet, les deux souches de *L. monocytogenes* testées sont de sérotypes différents. La sensibilité de la souche de référence, *L. monocytogenes* ScottA possède une sensibilité maximale avec la couche mince la plus épaisse. Un compromis entre épaisseur des couches minces et effet antibactérien a été nécessaire. Le choix s'est porté sur une couche mince d'épaisseur de 240 nm. Ce choix a également été fait en prenant en considération les conditions de durée de dépôt en laboratoire et la réalisation des couches minces.

Étude de couches minces de TiO₂

Il s'est avéré plus compliqué d'obtenir des couches minces identiques à celles obtenues sur verre. En effet, les couches minces obtenues sur verre présentaient toutes une structure anatase du TiO_2 et la phase rutile n'est apparue, en plus de la phase anatase, qu'à partir d'une certaine épaisseur. Sur acier inoxydable, toutes les couches minces d'épaisseur ~ 210 nm, ont présenté un TiO_2 sous forme rutile.

Dans un premier temps, la température du substrat a été remise en question du fait de la nature conducteur de chaleur de l'acier inoxydable. En effet, à température plus élevée, la croissance du TiO_2 pourrait s'orienter de manière préférentielle vers la phase rutile. La température de consigne lors du dépôt a donc été abaissée par palier de 40°C . Aucun changement de phase n'a été observé, la phase rutile était toujours uniquement détectée. À trop faible température, 320°C , une amorphisation du TiO_2 a pu être observée. La croissance sous forme rutile du TiO_2 à la surface de l'acier inoxydable pourrait être due à l'utilisation d'une phase d'accroche de titane nécessaire pour assurer l'adhérence de la couche mince.

Cependant, l'activité photocatalytique est améliorée pour les couches minces déposées à 400 et 360°C par rapport à celle de référence à 440°C . L'effet antibactérien de la couche mince déposée à 360°C a été testé sur les deux souches de *L. monocytogenes*. Cette couche mince a permis de réduire la population bactérienne adhérente de 2 Log pour ces deux souches après illumination de 20 minutes sous UVA. Ce résultat est apparu comme étant assez surprenant. En effet de nombreuses études mettent en avant que la phase rutile du TiO_2 ne possède aucune activité antibactérienne exceptée dans certains cas. Les couches minces déposées sur verre ou acier inoxydable possèdent une activité photocatalytique similaire. Il semble cependant qu'en fonction de la nature du substrat et donc la nature de la couche mince, l'effet antibactérien soit différent. Ceci pourrait être dû à une production différente d'EROs. Pour la souche *L. monocytogenes* ScottA est plus sensible à la couche mince déposée sur acier inoxydable alors que la souche environnementale *L. monocytogenes* ECL136 ne présente pas de sensibilité plus importante.

Mécanismes impliqués dans la photocatalyse.

Afin d'optimiser au mieux les couches minces et leur effet sur les bactéries, il apparaît indispensable de mieux comprendre les mécanismes impliqués dans l'action photocatalytique et le stress oxydatif généré.

Tout d'abord, l'étude des réponses des souches bactériennes face aux stress provoqué par le TiO_2 photoactivé, nous a permis de mettre en évidence que des espèces et souches différentes ne répondent pas de la même façon. Certaines, comme *P. fragi* sont plus sensibles voire extrêmement sensibles, comme dans le cas de *P. fragi* CIP55.4T. Ceci est un constat intéressant car ces souches sont des bactéries que l'on retrouve très fréquemment dans les

biofilms car elles ont la capacité de coloniser facilement les surfaces. Par conséquent, il est important de pouvoir limiter le développement de ces bactéries sur les surfaces des ateliers des IAA. Elles sont très souvent associées à des bactéries pathogènes telles que *L. monocytogenes*. Cette dernière, quant à elle, s'est montrée plus résistante à l'action de la photocatalyse. C'est donc sur cette espèce que les travaux se sont focalisés pour pouvoir étudier la réponse bactérienne.

En utilisant une méthode de marquage fluorescent différentiel directement sur les bactéries adhérentes aux surfaces de TiO₂, il a été possible de visualiser *in situ*, l'action antibactérienne du TiO₂. Ce marquage, en partant de l'hypothèse qu'une atteinte de la membrane cytoplasmique est un reflet de la viabilité cellulaire, a permis de montrer que le TiO₂ au contact des bactéries joue un rôle direct sur la membrane. Cette méthode semble toutefois avoir des limites pour quantifier avec précision les bactéries viables vs les bactéries mortes.

D'après la littérature, l'activité antibactérienne du TiO₂ est liée à la production d'EROs. Une connaissance de la nature de ces EROs produites après illumination UV à la surface de nos couches minces pourrait contribuer à l'amélioration de leur efficacité. En effet, compte tenu des mécanismes de résistance au stress oxydatif des bactéries, il est préférable de favoriser la production de radicaux hydroxyles, les plus délétères pour la cellule microbienne. Il a été possible de mettre en évidence que si de l'H₂O₂ était produit à la surface de la couche mince, ce composé était directement converti en un autre composé. Ce composé est certainement le radical hydroxyle. En effet, l'implication de cette ERO a pu être déterminée en utilisant le test de décoloration du bleu de méthylène en présence d'une molécule piégeant les $\bullet\text{OH}$, le mannitol. C'est cette espèce réactive qui semble jouer un rôle prépondérant dans l'activité photocatalytique de nos couches minces. En revanche, il n'a pas été possible, certainement du fait de la méthode utilisée, de détecter des anions superoxydes sur nos couches minces après illumination UV.

D'après nos résultats, il est possible d'envisager un principe de fonctionnement schématique de l'action des couches minces de TiO₂ synthétisées. Les UV permettent d'activer la couche mince de TiO₂. Cela entraîne la formation d'EROs, dont des radicaux hydroxyles formés par réaction avec l' H₂O₂ produit. Ces radicaux ont différentes actions, l'altération de la paroi bactérienne, modifications de l'ADN ainsi que la dénaturation de protéines cytoplasmique (Cabiscol, 2000; Gogniat et Dukan, 2007; Carré *et al.*, 2014; Ezraty *et al.*, 2017).

Les bactéries possèdent cependant des mécanismes leur permettant de résister au stress oxydatif. Parmi les réponses bactériennes, nous avons orienté les tests sur une méthode de suivi de l'expression des gènes *sod* ; *kat* ; *perR* ; *recA*, *fri* et *sigB*. Cette méthode, réalisée tout

d'abord sur culture, a nécessité une mise au point, tant au niveau des extractions d'ARN que sur le plan de la RT-PCRq. Les résultats obtenus avec deux agents oxydants (peroxyde d'hydrogène et viologène de méthyle) ont mis en évidence chez *L. monocytogenes* ScottA une surexpression, notamment le gène *sigB* codant un facteur régulant l'expression d'autres gènes impliqués dans la réponse aux stress et le gène *fri* impliqué dans la séquestration du fer. En revanche, aucune différence significative de surexpression de ces gènes n'a été mise en évidence entre la présence de H₂O₂ ou celle du MV connu pour générer des EROs différentes.

La même étude réalisée avec les bactéries adhérentes aux coupons n'a malheureusement pas permis d'arriver à des résultats exploitables. Une phase de mise au point est donc encore nécessaire pour accéder à l'expression des gènes impliqués dans la réponse bactérienne suite à la photocatalyse au TiO₂.

II. Perspectives

Vers des couches minces de TiO₂ photoactives sous lumière visible ?

Une nouvelle étape dans l'optimisation des couches minces concerne la source de rayonnements nécessaires pour permettre la photocatalyse. Dans notre cas, il s'agit d'illuminations UVA qui permettent de rendre la couche mince photoactive. Il est cependant envisageable de doper nos couches minces de manière à les rendre actives sous lumière visible, ou sous lumière LED. Cette optimisation pourrait rendre la couche mince de TiO₂ active en continu. Une méthode pour doper le TiO₂, consiste à réduire l'énergie d'activation c'est-à-dire réduire la largeur du band-gap en associant le TiO₂ à un autre composé, métal ou non (Figure 64). Il est par exemple possible d'ajouter au moment du dépôt de l'or (Zaleska, 2008), de l'argent (Gupta *et al.*, 2013) ou encore du cuivre ou même du fer (Leyland *et al.*, 2016). En ce qui concerne les dopants non métalliques, il existe majoritairement du TiO₂ dopé avec de l'azote (Zaleska, 2008; Dunnill et Parkin, 2011; Pelaez *et al.*, 2012).

Figure 64 : Mécanisme de la photocatalyse du TiO₂. h

Vers des couches minces de TiO_2 applicables dans les IAA ?

Aboutir à une couche mince de TiO_2 applicable pour les surfaces dans les IAA demande de nombreuses étapes. Les premières ont été menées au travers de cette thèse, bien qu'il s'agisse véritablement des prémices d'un tel projet.

Pour appliquer les couches minces dans des environnements comme ceux rencontrés dans les IAA. Il serait maintenant nécessaire de pouvoir apprécier leur adhérence à l'acier inoxydable ainsi que leur résistance à l'usure. En effet, les couches minces élaborées devront être testées afin de déterminer la force d'accroche de cette couche mince sur le substrat. Une couche d'accroche a été ajoutée pour permettre le dépôt de la couche mince de TiO_2 et les couches minces obtenues sont restées adhérentes au substrat tout au long des tests. Cependant, il existe des méthodes utilisées en laboratoire qui permettent de quantifier l'adhérence d'une couche à un support : il s'agit de la méthode « scratch-test ».

Ce test consiste à déplacer à la surface de la couche mince une pointe en diamant (avec une géométrie pouvant varier). Au cours de ce déplacement, une force normale croissante est appliquée sur la pointe jusqu'à endommagement du dépôt. Une valeur est ainsi déterminée il s'agit de la charge critique à l'endommagement notée classiquement CL (Critical Load) (Figure 65).

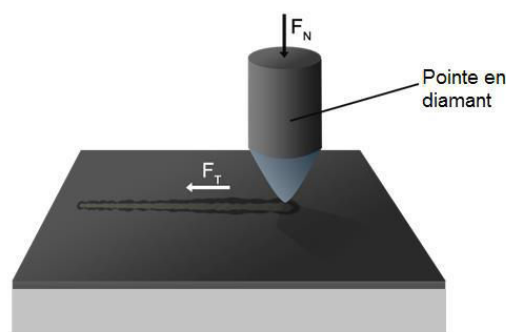


Figure 65 : Principe du Scratch-test.

Un aspect non négligeable dans la lutte contre la formation de biofilm est de limiter la rugosité de la surface. Bien qu'il ait été possible d'apprécier de manière qualitative l'aspect de la surface grâce aux observations effectuées par MEB, il pourrait être envisagé de mesurer sa rugosité.

Approfondir la caractérisation des couches minces pourrait également passer par la détermination des angles de contact des couches minces, avec et sans illumination UVA. Cet aspect, qui pourrait être mis en parallèle avec les résultats des tests de MATS des bactéries, serait un atout pour prédire le comportement des souches à la surface des couches minces.

Vers une meilleure compréhension de la photocatalyse et ses cibles ?

Dans l'objectif de rendre nos couches minces de TiO_2 toujours plus efficaces dans la lutte contre la présence de bactéries dans les environnements agroalimentaires, la compréhension des mécanismes photocatalytiques restent une étape clé. La détermination des EROs responsables de l'activité photocatalytique et antibactérienne à la surface des couches minces pourrait permettre de les améliorer mais aussi de mettre en parallèle la nature de la

phase cristalline du TiO_2 et les EROs produites. Cependant, des méthodes plus spécifiques mais malheureusement plus coûteuses pourraient s'avérer utiles, comme la chimioluminescence ou la méthode ESR.

Une toute autre approche pourrait être envisagée. En effet, connaître les EROs produites est un aspect important, mais connaître les cibles bactériennes revêt une grande importance. En effet, ceci permettrait de prédire quels types de microorganismes seraient plus sensibles. Il semble que la membrane bactérienne soit la première cible du TiO_2 . Afin de vérifier cela avec nos couches minces, la peroxydation lipidique pourrait être étudiée. Elle peut modifier la fluidité membranaire et ainsi perturber les fonctions de la bactérie. Parmi les produits de la peroxydation lipidique, il est possible de suivre la formation de cétones ou d'aldéhydes comme le malondialdéhyde. De plus, il pourrait être important de tester l'effet de la photocatalyse les EPS, composés qui assurent l'établissement et le maintien d'un biofilm (Qian *et al.*, 2017). Ceci pourrait être réalisé, en utilisant des souches capables de produire différents EPS et en quantités différentes.

Nos couches minces ont été testées sur des bactéries adhérentes d'une seule souche. L'étude de flores complexes prélevées sur des surfaces recouvertes ou non de ces couches minces permettrait d'observer l'influence du TiO_2 sur la diversité des flores qui résisteraient ou non à la photocatalyse.

De plus, les couches minces pourraient également être testées dans des conditions d'ateliers en présence de biocides et/ou de résidus organiques. En effet, les surfaces fonctionnalisées au TiO_2 n'ont pas pour vocation de supplanter les procédures de nettoyage et désinfection mais d'être des mesures complémentaires. Il convient donc d'évaluer leur efficacité dans ces conditions. La présence de résidus de biocides (peroxyde d'hydrogène, ammoniums quaternaires...) pose des problèmes dans les IAA du fait de rinçages insuffisants des surfaces. Les aliments peuvent alors être contaminés par ces résidus posant alors un problème sanitaire. De plus, des études ont démontré que les bactéries présentes peuvent s'adapter à des concentrations faibles de ces produits. Or nos résultats ont montré que le TiO_2 pourrait permettre d'éliminer des traces résiduelles de biocides, tels que le peroxyde d'hydrogène.

Après traitement des cellules adhérentes, les dénombrements sur milieux gélosés ont permis d'évaluer la perte de cultivabilité. Des marquages fluorescents *in situ* et les observations au MEB des bactéries sur coupons ont permis de lier cette perte de cultivabilité à la perte de viabilité qui serait due à une perte d'intégrité membranaire après contact avec la couches minces de TiO_2 activée. Cet aspect pourrait être compléter en évaluant le nombre de bactéries viables non cultivables (VNC). Ces VNC peuvent être observées par une méthode de PCRq en présence de Monoazide de propidium (PMA). Ce composé pénètre dans les

cellules endommagées et s'intègre à l'ADN empêchant ainsi la réaction d'amplification qui a lieu au cours de la PCRq. En comparant les résultats d'une telle PCRq avec une PCRq en absence de PMA alors il est possible de quantifier les cellules VNC présentes dans les échantillons.

Il est acquis dans la littérature que les formes VNC sont dues aux stress qu'ont subis les cellules. Il a été démontré dans ce travail que le stress généré par le TiO₂ est majoritairement un stress oxydatif. Par conséquent, il paraît important de mieux comprendre les mécanismes impliqués dans la réponse de ces bactéries. Afin de compléter l'étude de l'expression différentielle des gènes de stress oxydatif, l'étude de mutants de ces gènes (*sod*, *kat*, *perR*...) sera envisagée. Elle aura pour but d'étudier le comportement de ces mutants et leur éventuelle sensibilité vis-à-vis de la couche mince. Ainsi, il sera possible d'estimer l'importance relative de chacun de ces gènes dans la réponse à la photocatalyse.

Vers des couches minces de TiO₂ actives sur un large panel de pathogènes en IAA ?

Nos travaux ont porté sur 3 genres bactériens impliqués dans les infections humaines ou dans l'altération des aliments, et reconnus pour se multiplier au froid ou se maintenir aux surfaces. Au sein même de ces genres, nous avons vu que des différences pouvaient exister entre les souches en terme de sensibilité à l'action photocatalytique du TiO₂.

Les filières animales sont sources de pathogènes zoonotiques, et avec pour certains un portage important en terme de prévalence. Pour la France, *L. monocytogenes* est retrouvé dans 32% des élevages de poulets de chair (Chemaly *et al.*, 2008) et dans 25% des élevages naisseurs-engraisseurs de porcs (Boscher *et al.*, 2012). Nous pouvons citer également *Campylobacter* (1^{er} agent zoonotique) avec des animaux qui excrètent cette bactérie dans 77% des élevages de poulets de chair (Allain *et al.*, 2014) et dans 62,9% des exploitations de porcs (Denis *et al.*, 2011). De même *Salmonella* est aussi une bactérie importante en termes de santé publique (2^{ème} agent zoonotique). En France, 7,5% des carcasses de poulets (Hue *et al.*, 2011) et 18,6 % des carcasses de porcs (EFSA, 2008) sont porteuses de *Salmonella* à l'abattoir.

Il est donc important de valider l'efficacité de nos matériaux aussi sur ces agents pathogènes qui arrivent dans l'abattoir. C'est pourquoi, il doit aussi être envisagé de tester un panel plus important de genres bactériens et de souches pathogènes pour l'homme pour évaluer la performance de ces surfaces antibactériennes en tant qu'outil de maîtrise tant à l'abattoir que lors de la transformation des aliments.

Références bibliographiques

-A-

- Aarik, J., Aidla, A., Kiisler, A.-A., Uustare, T., et Sammelselg, V. (1997) Effect of crystal structure on optical properties of TiO₂ films grown by atomic layer deposition. *Thin Solid Films* **305**: 270–273.
- Abdallah, M., Benoliel, C., Drider, D., Dhulster, P., et Chihib, N.-E. (2014) Biofilm formation and persistence on abiotic surfaces in the context of food and medical environments. *Arch. Microbiol.* **196**: 453–472.
- Abee, T., Kovács, Á.T., Kuipers, O.P., et van der Veen, S. (2011) Biofilm formation and dispersal in Gram-positive bacteria. *Curr. Opin. Biotechnol.* **22**: 172–179.
- Allain, V., Chemaly, M., Laisney, M.-J., Rouxel, S., Quesne, S., et Le Bouquin, S. (2014) Prevalence of and risk factors for *Campylobacter* colonisation in broiler flocks at the end of the rearing period in France. *Br. Poult. Sci.* **55**: 452–459.
- Allion, A. (2004) Environnement des bactéries et sensibilité aux biocides : mise au point d'une technique rapide pour déterminer in situ l'efficacité bactéricide d'agents antimicrobiens Massy, ENSIA.
- Allion, A., Merlot, M., Boulangé-Petermann, L., Archambeau, C., Choquet, P., et Damasse, J.-M. (2007) Thin Photocatalytic TiO₂ Coatings: Impact on Bioadhesion and Cell Viability. *Plasma Process. Polym.* **4**: S374–S379.
- Anses (2011) Fiche de description de danger biologique transmissible par les aliments.
- de Arauz, L.J., Jozala, A.F., Mazzola, P.G., et Vessoni Penna, T.C. (2009) Nisin biotechnological production and application: a review. *Trends Food Sci. Technol.* **20**: 146–154.
- Arrage, A.A., Phelps, T.J., Benoit, R.E., et White, D.C. (1993) Survival of subsurface microorganisms exposed to UV radiation and hydrogen peroxide. *Appl. Environ. Microbiol.* **59**: 3545–3550.
- Arts, I.S., Gennaris, A., et Collet, J.-F. (2015) Reducing systems protecting the bacterial cell envelope from oxidative damage. *FEBS Lett.* **589**: 1559–1568.

-B-

- Bai, A.J. and Rai, V.R. (2011) Bacterial Quorum Sensing and Food Industry. *Compr. Rev. Food Sci. Food Saf.* **10**: 183–193.
- Baig, S. (2010) Oxydation et réduction appliquées au traitement de l'eau - Ozone – Autres oxydants – Oxydation avancée – Réducteurs. *Tech. Ing. Génie Procédés Prot. Environ.*

- Barnes, R.J., Molina, R., Xu, J., Dobson, P.J., et Thompson, I.P. (2013) Comparison of TiO₂ and ZnO nanoparticles for photocatalytic degradation of methylene blue and the correlated inactivation of gram-positive and gram-negative bacteria. *J. Nanoparticle Res.* **15**: 1–11.
- Bazaka, K., Jacob, M.V., Crawford, R.J., et Ivanova, E.P. (2012) Efficient surface modification of biomaterial to prevent biofilm formation and the attachment of microorganisms. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **95**: 299–311.
- Beauclair, J. (2011) Usines agroalimentaires. Intégrer le nettoyage et la désinfection à la conception des locaux. INRS - Prévention Risques Prof.
- Bhatkhande, D.S., Pangarkar, V.G., et Beenackers, A.A.C.M. (2002) Photocatalytic degradation for environmental applications – a review. *J. Chem. Technol. Biotechnol.* **77**: 102–116.
- Birben, E., Sahiner, U.M., Sackesen, C., Erzurum, S., et Kalayci, O. (2012) Oxidative Stress and Antioxidant Defense. *World Allergy Organ. J.* **5**: 9–19.
- Bonetta, Silvia, Bonetta, Sara, Motta, F., Strini, A., et Carraro, E. (2013) Photocatalytic bacterial inactivation by TiO₂-coated surfaces. *AMB Express* **3**: 59.
- Bornert, G. (2000) Importance des bactéries psychrotrophes en hygiène des denrées alimentaires. *Rev. Médecine Vét.* **151**: 1003–1010.
- Boscher, E., Houard, E., et Denis, M. (2012) Prevalence and distribution of *Listeria monocytogenes* serotypes and pulsotypes in sows and fattening pigs in farrow-to-finish farms (France, 2008). *J. Food Prot.* **75**: 889–895.
- Bottone, E.J. (1999) *Yersinia enterocolitica*: overview and epidemiologic correlates. *Microbes Infect.* **1**: 323–333.
- Brauge, T., Sadovskaya, I., Faille, C., Benezech, T., Maes, E., Guerardel, Y., et Midelet-Bourdin, G. (2016) Teichoic acid is the major polysaccharide present in the *Listeria monocytogenes* biofilm matrix. *FEMS Microbiol. Lett.* **363**: fnv229. <https://doi.org/10.1093/femsle/fnv229>
- Briandet, R. (2013) Biofutur N° 341 : Biofilm. La société des microbes (Mars 2013). Éditions Lavoisier.
- Briandet, R., Dubois-Brissonnet, F., Naitali, M., Meylheuc, T., Herry, J.-M., Boubetra, A., et Bellon-Fontaine, M.N. (2006) La microbiologie des surfaces dans les bio-industries. *Bull.Soc.Fr.Microbiol* **21**: 93–98.
- Briandet, R., Fechner, L., Naïtali, M., et Dreanno, C. (2012) Biofilms, quand les microbes s'organisent. Editions Quae.
- Briandet, R., Meylheuc, T., Maher, C., et Bellon-Fontaine, M.N. (1999) *Listeria monocytogenes* Scott A: Cell Surface Charge, Hydrophobicity, and Electron Donor and Acceptor Characteristics under Different Environmental Growth Conditions. *Appl. Environ. Microbiol.* **65**: 5328–5333.

- Bridier, A., Briandet, R., Thomas, V., et Dubois-Brissonnet, F. (2011) Resistance of bacterial biofilms to disinfectants: a review. *Biofouling* **27**: 1017–1032.
- Bridier, A., Sanchez-Vizute, P., Guilbaud, M., Piard, J.-C., Naïtali, M., et Briandet, R. (2015) Biofilm-associated persistence of food-borne pathogens. *Food Microbiol.* **45**, Part B: 167–178.
- Bucher, T., Oppenheimer-Shaanan, Y., Savidor, A., Bloom-Ackermann, Z., et Kolodkin-Gal, I. (2015) Disturbance of the bacterial cell wall specifically interferes with biofilm formation. *Environ. Microbiol. Rep.* **7**: 990–1004.

-C-

- Cabiscol, E. (2000) Oxidative stress in bacteria and protein damage by reactive oxygen species. *Int. Microbiol. Off. J. Span. Soc. Microbiol.* **3**: 3–8.
- Cai, Y., Strömme, M., et Welch, K. (2014) Disinfection Kinetics and Contribution of Reactive Oxygen Species When Eliminating Bacteria with TiO₂ Induced Photocatalysis. *J. Biomater. Nanobiotechnology* **5**: 200–209.
- Calhoun, L.N. et Kwon, Y.M. (2011) Structure, function and regulation of the DNA-binding protein Dps and its role in acid and oxidative stress resistance in *Escherichia coli*: a review. *J. Appl. Microbiol.* **110**: 375–386.
- Campbell, N. et Reece, J. (2004) Chapitre 27 : Les procaryotes et l'origine de la diversité métabolique. In, *Biologie*. De Boeck & Larcier s.a.
- Camper, A.K., LeChevallier, M.W., Broadaway, S.C., et McFeters, G.A. (1985) Growth and persistence of pathogens on granular activated carbon filters. *Appl. Environ. Microbiol.* **50**: 1378–1382.
- Campoccia, D., Montanaro, L., et Arciola, C.R. (2013) A review of the biomaterials technologies for infection-resistant surfaces. *Biomaterials* **34**: 8533–8554.
- Carpentier, B. et Cerf, O. (1993) Biofilms and their consequences, with particular reference to hygiene in the food industry. *J Appl Bacteriol* **75**: 499–511.
- Carpentier, B. et Cerf, O. (2011) Review — Persistence of *Listeria monocytogenes* in food industry equipment and premises. *Int. J. Food Microbiol.* **145**: 1–8.
- Carpentier, B. et Chassaing, D. (2004) Interactions in biofilms between *Listeria monocytogenes* and resident microorganisms from food industry premises. *Int. J. Food Microbiol.* **97**: 111–122.
- Carré, G. (2013) Compréhension des mécanismes lors de la photocatalyse appliquée à la dégradation des microorganismes : application au traitement de l'air et aux textiles auto-décontaminants Strasbourg.
- Carré, G., Hamon, E., Ennahar, S., Estner, M., Lett, M.-C., Horvatovich, P., et al. (2014) TiO₂ Photocatalysis Damages Lipids and Proteins in *Escherichia coli*. *Appl. Environ. Microbiol.* **80**: 2573–2581.

- Casaletto, M.P., Ingo, G.M., Kaciulis, S., Mattogno, G., Pandolfi, L., et Scavia, G. (2001) Surface studies of in vitro biocompatibility of titanium oxide coatings. *Appl. Surf. Sci.* **172**: 167–177.
- Chae, M.S. et Schraft, H. (2000) Comparative evaluation of adhesion and biofilm formation of different *Listeria monocytogenes* strains. *Int J Food Microbiol* **62**: 103–11.
- Charlier, C., Even, S., Gautier, M., et Le Loir, Y. (2008) Acidification is not involved in the early inhibition of *Staphylococcus aureus* growth by *Lactococcus lactis* in milk. *Int. Dairy J.* **18**: 197–203.
- Chasseignaux, E. (1999) Ecologie de *Listeria monocytogenes* dans les ateliers de transformation de viandes de volailles et de porcs. Thèse, Lyon 1.
- Chasseignaux, E., Gérault, P., Toquin, M.-T., Salvat, G., Colin, P., et Ermel, G. (2002) Ecology of *Listeria monocytogenes* in the environment of raw poultry meat and raw pork meat processing plants. *FEMS Microbiol. Lett.* **210**: 271–275.
- Chasseignaux, E., Toquin, M.T., Ragimbeau, C., Salvat, G., Colin, P., et Ermel, G. (2001) Molecular epidemiology of *Listeria monocytogenes* isolates collected from the environment, raw meat and raw products in two poultry- and pork-processing plants. *J Appl Microbiol* **91**: 888–99.
- Cheigh, C.-I., Park, M.-H., Chung, M.-S., Shin, J.-K., et Park, Y.-S. (2012) Comparison of intense pulsed light- and ultraviolet (UVC)-induced cell damage in *Listeria monocytogenes* and *Escherichia coli* O157:H7. *Food Control* **25**: 654–659.
- Chemaly, M., Toquin, M.-T., Le Nôtre, Y., et Fravalo, P. (2008) Prevalence of *Listeria monocytogenes* in poultry production in France. *J. Food Prot.* **71**: 1996–2000.
- Chiou, A.H., Kuo, C.G., Huang, C.H., Wu, W.F., Chou, C.P., et Hsu, C.Y. (2012) Influence of oxygen flow rate on photocatalytic TiO₂ films deposited by rf magnetron sputtering. *J. Mater. Sci. Mater. Electron.* **23**: 589–594.
- Chorianopoulos, N.G., Tsoukleris, D.S., Panagou, E.Z., Falaras, P., et Nychas, G.J. (2011) Use of titanium dioxide (TiO₂) photocatalysts as alternative means for *Listeria monocytogenes* biofilm disinfection in food processing. *Food Microbiol* **28**: 164–70.

-D-

- Daude, N., Gout, C., et Jouanin, C. (1977) Electronic band structure of titanium dioxide. *Phys. Rev. B* **15**: 3229–3235.
- Davey, M.E. et O'toole, G.A. (2000) Microbial Biofilms: from Ecology to Molecular Genetics. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **64**: 847–867.
- Davidðdóttir, S., Canulescu, S., Dirscherl, K., Schou, J., et Ambat, R. (2013) Investigation of photocatalytic activity of titanium dioxide deposited on metallic substrates by DC magnetron sputtering. *Surf. Coat. Technol.* **216**: 35–45.

- De Nardi, F., Delaunay, D., Talibart, R., Castel, X., Le Gendre, L., Castillo, A., et Pissavin, C. (2016) Antimicrobial activity of stainless steel with a modified TiN upperlayer on meat related contaminants. *J. Food Sci. Eng.* **6**: 332–343.
- Denis, M., Henrique, E., Chidaine, B., Tircot, A., Bougeard, S., et Fravallo, P. (2011) *Campylobacter* from sows in farrow-to-finish pig farms: risk indicators and genetic diversity. *Vet. Microbiol.* **154**: 163–170.
- Díaz, C., Schilardi, P., et de Mele, M.F.L. (2008) Influence of surface sub-micropattern on the adhesion of pioneer bacteria on metals. *Artif. Organs* **32**: 292–298.
- Ditta, I.B., Steele, A., Liptrot, C., Tobin, J., Tyler, H., Yates, H.M., et al. (2008) Photocatalytic antimicrobial activity of thin surface films of TiO₂, CuO and TiO₂/CuO dual layers on *Escherichia coli* and bacteriophage T4. *Appl Microbiol Biotechnol* **79**: 127–33.
- Dizaj, S.M., Lotfipour, F., Barzegar-Jalali, M., Zarrintan, M.H., et Adibkia, K. (2014) Antimicrobial Activity of the Metals and Metal Oxides Nanoparticles. *Mater. Sci. Eng. C.*, **44**, 278-284.
- Doberva, M. (2016) Le quorum sensing bactérien dans l’environnement marin : diversité moléculaire et génétique des auto-inducteurs. Thèse, Paris 6.
- Donlan, R.M. (2002) Biofilms: microbial life on surfaces. *Emerg. Infect. Dis.* **8**: 881–890.
- Donlan, R.M. (2009) Preventing biofilms of clinically relevant organisms using bacteriophage. *Trends Microbiol.* **17**: 66–72.
- Dufour, D., Leung, V., et Lévesque, C.M. (2010) Bacterial biofilm: structure, function, and antimicrobial resistance. *Endod. Top.* **22**: 2–16.
- Dufour, M., Simmonds, R.S., et Bremer, P.J. (2003) Development of a method to quantify in vitro the synergistic activity of “natural” antimicrobials. *Int. J. Food Microbiol.* **85**: 249–258.
- Dumas, E. (2007) *Listeria monocytogenes* : Caractérisation fonctionnelle d’un mutant ferritine. Etude de la biodiversité par une approche protéomique. Thèse, Clermont-Fd.
- Dunnill, C.W. et Parkin, I.P. (2011) Nitrogen-doped TiO₂ thin films: photocatalytic applications for healthcare environments. *Dalton Trans.* **40**: 1635–1640.

-E-

- Ede, S., Hafner, L., Dunlop, P., Byrne, J., et Will, G. (2012) Photocatalytic disinfection of bacterial pollutants using suspended and immobilized TiO₂ powders. *Photochem. Photobiol.* **88**: 728–735.
- EFSA (2008) Report of the Task Force on Zoonoses. Data Collection on the analysis of the baseline survey on the prevalence of *Salmonella* in slaughter pigs. EFSA Journal **135**: 1–111.
- Esnault, E. et Denis, M. (2015) Chapitre 5 : *Yersinia enterocolitica*. In, Sécurité sanitaire des aliments : épidémiologie et moyens de lutte contre les principaux contaminants zoonotiques. Paris, France, pp. 98–121.

Ezraty, B., Gennaris, A., Barras, F., et Collet, J.-F. (2017) Oxidative stress, protein damage and repair in bacteria. *Nat. Rev. Microbiol.* **15**: 385–396.

-F-

Ferreira, A., O'Byrne, C.P., et Boor, K.J. (2001) Role of ζ B in Heat, Ethanol, Acid, and Oxidative Stress Resistance and during Carbon Starvation in *Listeria monocytogenes*. *Appl. Environ. Microbiol.* **67**: 4454–4457.

Fleming, D.W., Cochi, S.L., MacDonald, K.L., Brondum, J., Hayes, P.S., Plikaytis, B.D., et al. (1985) Pasteurized Milk as a Vehicle of Infection in an Outbreak of Listeriosis. *N. Engl. J. Med.* **312**: 404–407.

Fondrevez, M., Labbé, A., Houard, E., Fravalo, P., Madec, F., et Denis, M. (2010) A simplified method for detecting pathogenic *Yersinia enterocolitica* in slaughtered pig tonsils. *J. Microbiol. Methods* **83**: 244–249.

Forney, L.J. et Moraru, C.I. (2009) Ultraviolet Light in Food Technology: Principles and Applications CRC Press. 300p.

Foster, H.A., Ditta, I.B., Varghese, S., et Steele, A. (2011) Photocatalytic disinfection using titanium dioxide: spectrum and mechanism of antimicrobial activity. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **90**: 1847–1868.

Franco Arias, L.M., Kleiman, A., Vega, D., Fazio, M., Halac, E., et Márquez, A. (2017) Enhancement of rutile phase formation in TiO₂ films deposited on stainless steel substrates with a vacuum arc. *Thin Solid Films* **638**: 269–276.

Franzetti, L. et Scarpellini, M. (2007) Characterisation of *Pseudomonas spp.* isolated from foods. *Ann. Microbiol.* **57**: 39–47.

Fratamico, P.M., Annous, B.A., et Guenther, N.W. (2009) Biofilms in the Food and Beverage Industries Elsevier. 601p.

Fu, P., Luan, Y., et Dai, X. (2004) Preparation of activated carbon fibers supported TiO₂ photocatalyst and evaluation of its photocatalytic reactivity. *J Mol Catal -Chem* **221**: 81–88.

Fujishima, A. et Honda, K. (1972) Electrochemical Photolysis of Water at a Semiconductor Electrode. *Nature* **238**: 37–38.

-G-

Gennaris, A., Ezraty, B., Henry, C., Agrebi, R., Vergnes, A., Oheix, E., et al. (2015) Repairing oxidized proteins in the bacterial envelope using respiratory chain electrons. *Nature* **528**: 409–412.

Giaouris, E., Heir, E., Hébraud, M., Chorianopoulos, N., Langsrud, S., Møretrø, T., et al. (2014) Attachment and biofilm formation by foodborne bacteria in meat processing environments: causes, implications, role of bacterial interactions and control by alternative novel methods. *Meat Sci.* **97**: 298–309.

- Gibson, H., Taylor, J.H., Hall, K.E., et Holah, J.T. (1999) Effectiveness of cleaning techniques used in the food industry in terms of the removal of bacterial biofilms. *J. Appl. Microbiol.* **87**: 41–48.
- Giovannacci, I., Ermel, G., Salvat, G., Vendevre, J.L., et Bellon-Fontaine, M.N. (2000) Physicochemical surface properties of five *Listeria monocytogenes* strains from a pork-processing environment in relation to serotypes, genotypes and growth temperature. *J. Appl. Microbiol.* **88**: 992–1000.
- Glaze, W.H. (1987) Drinking-water treatment with ozone. *Environ. Sci. Technol.* **21**: 224–230.
- Goerlich, O., Quillardet, P., et Hofnung, M. (1989) Induction of the SOS response by hydrogen peroxide in various *Escherichia coli* mutants with altered protection against oxidative DNA damage. *J. Bacteriol.* **171**: 6141–6147.
- Gogniat, G. et Dukan, S. (2007) TiO₂ Photocatalysis Causes DNA Damage via Fenton Reaction-Generated Hydroxyl Radicals during the Recovery Period. *Appl. Environ. Microbiol.* **73**: 7740–7743.
- Gogniat, G., Thyssen, M., Denis, M., Pulgarin, C., et Dukan, S. (2006) The bactericidal effect of TiO₂ photocatalysis involves adsorption onto catalyst and the loss of membrane integrity. *FEMS Microbiol. Lett.* **258**: 18–24.
- Gohin, M. (2009) Films photocatalytiques par voie sol-gel pour applications vitrages en intérieur.
- Goldstein, S. et Czapski, G. (1984) Mannitol as an OH[•] scavenger in aqueous solutions and in biological systems. *Int. J. Radiat. Biol. Relat. Stud. Phys. Chem. Med.* **46**: 725–729.
- Gross, M., Cramton, S.E., Götz, F., et Peschel, A. (2001) Key Role of Teichoic Acid Net Charge in *Staphylococcus aureus* Colonization of Artificial Surfaces. *Infect. Immun.* **69**: 3423–3426.
- Gu, H. et Ren, D. (2014) Materials and surface engineering to control bacterial adhesion and biofilm formation: A review of recent advances. *Front. Chem. Sci. Eng.* **8**: 20–33.
- Guerrero, G., Amalric, J., Mutin, P.-H., Sotto, A., et Lavigne, J.-P. (2009) Inhibition de l'adhésion bactérienne et prévention de la formation d'un biofilm : utilisation de monocouches autoassemblées organiques sur des surfaces inorganiques. *Pathol. Biol.* **57**: 36–43.
- Guettaï, N. et Ait Amar, H. (2005) Photocatalytic oxidation of methyl orange in presence of titanium dioxide in aqueous suspension. *Part I: Parametric study. Desalination* **185**: 427–437.
- Guillard, C., Kartheuser, B., et Lacombe, S. (2011) La photocatalyse : dépollution de l'eau ou de l'air et matériaux autonettoyants. *Tech. Ing. Génie Procédés Prot. Environ.* base documentaire : TIB327DUO:
- Guillaumin, B. (2002) Nettoyage et désinfection dans l'industrie de l'embouteillage, des aliments transformés et des surfaces ouvertes. *Bull. Académie Vétérinaire Fr.* 155.

Gupta, K., Singh, R.P., Pandey, Ashutosh, et Pandey, Anjana (2013) Photocatalytic antibacterial performance of TiO₂ and Ag-doped TiO₂ against *S. aureus*, *P. aeruginosa* and *E. coli*. *Beilstein J. Nanotechnol.* **4**: 345–351.

Gutiérrez, D., Rodríguez-Rubio, L., Martínez, B., Rodríguez, A., et García, P. (2016) Bacteriophages as Weapons Against Bacterial Biofilms in the Food Industry. *Front. Microbiol.* **7**.

-H-

Haiko, J. et Westerlund-Wikström, B. (2013) The Role of the Bacterial Flagellum in Adhesion and Virulence. *Biology* **2**: 1242–1267.

Hajipour, M.J., Fromm, K.M., Akbar Ashkarran, A., Jimenez de Aberasturi, D., Larramendi, I.R. de, Rojo, T., et al. (2012) Antibacterial properties of nanoparticles. *Trends Biotechnol.* **30**: 499–511.

Heikkilä, M., Puukilainen, E., Ritala, M., et Leskelä, M. (2009) Effect of thickness of ALD grown TiO₂ films on photoelectrocatalysis. *J. Photochem. Photobiol. Chem.* **204**: 200–208.

Helali, S. (2012) Application de la photocatalyse pour la dégradation des polluants chimiques et bactériologiques dans l'eau en utilisant des catalyseurs irradiés par des photons de lumière naturelle ou artificielle (UV-A /UV-B).Thèse, Lyon.

Henkel, B., Neubert, T., Zabel, S., Lamprecht, C., Selhuber-Unkel, C., Rätzke, K., et al. (2016) Photocatalytic properties of titania thin films prepared by sputtering versus evaporation et aging of induced oxygen vacancy defects. *Appl. Catal. B Environ.* **180**: 362–371.

Houas, A., Lachheb, H., Ksibi, M., Elaloui, E., Guillard, C., et Herrmann, J.-M. (2001) Photocatalytic degradation pathway of methylene blue in water. *Appl. Catal. B Environ.* **31**: 145–157.

Houry, A., Gohar, M., Deschamps, J., Tischenko, E., Aymerich, S., Gruss, A., et Briandet, R. (2012) Bacterial swimmers that infiltrate and take over the biofilm matrix. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **109**: 13088–13093.

Hsu, L.C., Fang, J., Borca-Tasciuc, D.A., Worobo, R.W., et Moraru, C.I. (2013) Effect of Micro- and Nanoscale Topography on the Adhesion of Bacterial Cells to Solid Surfaces. *Appl. Environ. Microbiol.* **79**: 2703–2712.

Hue, O., Allain, V., Laisney, M.-J., Le Bouquin, S., Lalande, F., Petetin, I., et al. (2011) *Campylobacter* contamination of broiler caeca and carcasses at the slaughterhouse and correlation with *Salmonella* contamination. *Food Microbiol.* **28**: 862–868.

-I-

Imlay, J.A. (2013) The molecular mechanisms and physiological consequences of oxidative stress: lessons from a model bacterium. *Nat. Rev. Microbiol.* **11**: 443–454.

InVS (2015a). Listériose : données épidémiologiques. <http://www.invs.sante.fr/Dossiers-thematiques/Maladiesinfectieuses/Risques-infectieux-d-origine-alimentaire/Listeriose/Donnees-epidemiologiques>.

Ioannidis, A., Kyratsa, A., Ioannidou, V., Bersimis, S., et Chatzipanagiotou, S. (2014) Detection of biofilm production of *Yersinia enterocolitica* strains isolated from infected children and comparative antimicrobial susceptibility of biofilm versus planktonic forms. *Mol. Diagn. Ther.* **18**: 309–314.

-K-

Kaan, C.C., Aziz, A.A., Ibrahim, S., Matheswaran, M., et Saravanan, P. (2012) Heterogeneous Photocatalytic Oxidation an Effective Tool for Wastewater Treatment – A Review. *Studies on Wat. Manag. Issues.* 219-236.

Kamiko, M., Ha, J.-G., Aotani, K., et Yamamoto, R. (2010) Influences of underlayers on structure of TiO₂ thin films prepared by radio frequency magnetron sputtering. *J. Ceram. Soc. Jpn.* **118**: 5–8.

Kanna, M. et Wongnawa, S. (2008) Mixed amorphous and nanocrystalline TiO₂ powders prepared by sol–gel method: Characterization and photocatalytic study. *Mater. Chem. Phys.* **110**: 166–175.

Karas, V.O., Westerlaken, I., et Meyer, A.S. (2015) The DNA-Binding Protein from Starved Cells (Dps) Utilizes Dual Functions To Defend Cells against Multiple Stresses. *J. Bacteriol.* **197**: 3206–3215.

Karatan, E. et Watnick, P. (2009) Signals, regulatory networks, and materials that build and break bacterial biofilms. *Microbiol. Mol. Biol. Rev. MMBR* **73**: 310–347.

Kartheuser, B. et Boonaert, C. (2016) Photocatalysis: A Powerful Technology for Cold Storage Applications. *J. Adv. Oxid. Technol.* **10**: 107–110.

Kassir, M. (2013) Modification contrôlée des propriétés cristallochimiques et physico-chimique de matériaux nanostructurés à base de TiO₂ pour la maîtrise des propriétés photocatalytiques. Thèse, Université de Lorraine.

Katsikogianni, M. et Missirlis, Y.F. (2004) Concise review of mechanisms of bacterial adhesion to biomaterials and of techniques used in estimating bacteria-material interactions. *Eur. Cell. Mater.* **8**: 37–57.

Kazmierczak, M.J., Mithoe, S.C., Boor, K.J., and Wiedmann, M. (2003) *Listeria monocytogenes* ?B Regulates Stress Response and Virulence Functions. *J. Bacteriol.* **185**: 5722–5734.

Kérouanton, A., Marault, M., Petit, L., Grout, J., Dao, T.T., et Brisabois, A. (2010) Evaluation of a multiplex PCR assay as an alternative method for *Listeria monocytogenes* serotyping. *J. Microbiol. Methods* **80**: 134–137.

Kim, C.-H., Lee, E.-S., Kang, S.-M., de Josselin de Jong, E., et Kim, B.-I. (2017) Bactericidal effect of the photocatalytic reaction of titanium dioxide using visible wavelengths on *Streptococcus mutans* biofilm. *Photodiagnosis Photodyn. Ther.* **18**: 279–283.

- Kim, S., Ghafoor, K., Lee, J., Feng, M., Hong, J., Lee, D.U., et Park, J. (2013) Bacterial inactivation in water, DNA strand breaking, and membrane damage induced by ultraviolet-assisted titanium dioxide photocatalysis. *Water Res* **47**: 4403–11.
- Kim, S.Y., Nishioka, M., et Taya, M. (2004) Promoted proliferation of an SOD-deficient mutant of *Escherichia coli* under oxidative stress induced by photoexcited TiO₂. *FEMS Microbiol. Lett.* **236**: 109–114.
- Kim, T.-J., Young, B.M., et Young, G.M. (2008) Effect of Flagellar Mutations on *Yersinia enterocolitica* Biofilm Formation. *Appl. Environ. Microbiol.* **74**: 5466–5474.
- Kőrösi, L., Prato, M., Scarpellini, A., Kovács, J., Dömötör, D., Kovács, T., et Papp, S. (2016) H₂O₂-assisted photocatalysis on flower-like rutile TiO₂ nanostructures: Rapid dye degradation and inactivation of bacteria. *Appl. Surf. Sci.* **365**: 171–179.
- Kostaki, M., Chorianopoulos, N., Braxou, E., Nychas, G.-J., et Giaouris, E. (2012) Differential Biofilm Formation and Chemical Disinfection Resistance of Sessile Cells of *Listeria monocytogenes* Strains under Monospecies et Dual-Species (with *Salmonella enterica*) Conditions. *Appl. Environ. Microbiol.* **78**: 2586–2595.
- Krishna, D.S.R., Sun, Y., et Chen, Z. (2011) Magnetron sputtered TiO₂ films on a stainless steel substrate: Selective rutile phase formation and its tribological and anti-corrosion performance. *Thin Solid Films* **519**: 4860–4864.

-L-

- Lavilla Lerma, L., Benomar, N., Gálvez, A., et Abriouel, H. (2013) Prevalence of bacteria resistant to antibiotics and/or biocides on meat processing plant surfaces throughout meat chain production. *Int. J. Food Microbiol.* **161**: 97–106.
- Le Guern, A.-S., Martin, L., Savin, C., et Carniel, E. (2016) Yersiniosis in France: overview and potential sources of infection. *Int. J. Infect. Dis.* **46**: 1–7.
- Lebert, I., Begot, C., et Lebert, A. (1998) Growth of *Pseudomonas fluorescens* and *Pseudomonas fragi* in a meat medium as affected by pH (5.8–7.0), water activity (0.97–1.00) and temperature (7–25°C). *Int. J. Food Microbiol.* **39**: 53–60.
- Leriche, V. et Carpentier, B. (2000) Limitation of adhesion and growth of *Listeria monocytogenes* on stainless steel surfaces by *Staphylococcus sciuri* biofilms. *J. Appl. Microbiol.* **88**: 594–605.
- Leriche, V., Chassaing, D., et Carpentier, B. (1999) Behaviour of *L. monocytogenes* in an artificially made biofilm of a nisin-producing strain of *Lactococcus lactis*. *Int. J. Food Microbiol.* **51**: 169–182.
- Leyland, N.S., Podporska-Carroll, J., Browne, J., Hinder, S.J., Quilty, B., et Pillai, S.C. (2016) Highly Efficient F, Cu doped TiO₂ anti-bacterial visible light active photocatalytic coatings to combat hospital-acquired infections. *Sci. Rep.* **6**: 24770.
- Li, Y.-H. et Tian, X. (2012) Quorum Sensing and Bacterial Social Interactions in Biofilms. *Sensors* **12**: 2519–2538.

- Liu, X., Zhang, H., Liu, C., Chen, J., Li, G., An, T., et al. (2014) UV and visible light photoelectrocatalytic bactericidal performance of 100% {111} faceted rutile TiO₂ photoanode. *Catal. Today* **224**: 77–82.
- Livak, K.J. et Schmittgen, T.D. (2001) Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real-Time Quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta C_t}$ Method. *Methods* **25**: 402–408.
- Luttrell, T., Halpegamage, S., Tao, J., Kramer, A., Sutter, E., et Batzill, M. (2014) Why is anatase a better photocatalyst than rutile? - Model studies on epitaxial TiO₂ films. *Sci. Rep.* 4: srep04043.

-M-

- Maness, P.-C., Smolinski, S., Blake, D.M., Huang, Z., Wolfrum, E.J., et Jacoby, W.A. (1999) Bactericidal Activity of Photocatalytic TiO₂ Reaction: toward an Understanding of Its Killing Mechanism. *Appl. Environ. Microbiol.* **65**: 4094–4098.
- Massiani, Y., Medjahed, A., Crousier, J.P., Gravier, P., et Rebatel, I. (1991) Corrosion of sputtered titanium nitride films deposited on iron and stainless steel. *Surf. Coat. Technol.* **45**: 115–120.
- Masson, R. (2012) Matériaux photocatalytiques structurés à base de mousses alvéolaires de β -SiC : applications au traitement de l'air. Thèse, Strasbourg.
- Mazzette, R., Fois, F., Consolati, S.G., Salza, S., Tedde, T., Soro, P., et al. (2015) Detection of Pathogenic *Yersinia enterocolitica* in Slaughtered Pigs by Cultural Methods and Real-Time Polymerase Chain Reaction. *Ital. J. Food Saf.* **4**.
- Meyer, B. (2003) Approaches to prevention, removal and killing of biofilms. *Int. Biodeterior. Biodegrad.* **51**: 249–253.
- Meyer, B. (2006) Does microbial resistance to biocides create a hazard to food hygiene? *Int. J. Food Microbiol.* **112**: 275–279.
- Meylheuc, T., Herry, J.-M., et Bellon-Fontaine, M.-N. (2001) Les biosurfactants, des biomolécules à forte potentialité d'application. *Sci. Aliments* **21**: 591–649.
- Milane, H. (2004) La quercétine et ses dérivés : molécules à caractère pro-oxydant ou capteurs de radicaux libres; études et application thérapeutiques. Thèse, Strasbourg.
- Moré, F. (2012) Elaboration de couches minces de TiO₂ pour applications antibactériennes. Master, Rennes.
- Mulet, M., Lalucat, J., et García-Valdés, E. (2010) DNA sequence-based analysis of the *Pseudomonas* species. *Environ. Microbiol.* **12**: 1513–1530.
- Myszka, K. et Czaczyk, K. (2011) Bacterial Biofilms on Food Contact Surfaces - a Review. *Pol. J. Food Nutr. Sci.* **61**: 173–180.

-N-

- Nair, P.B., Justinivictor, V.B., Daniel, G.P., Joy, K., James Raju, K.C., Devraj Kumar, D., et Thomas, P.V. (2014) Optical parameters induced by phase transformation in RF

- magnetron sputtered TiO₂ nanostructured thin films. *Prog. Nat. Sci. Mater. Int.* **24**: 218–225.
- Nakata, K. et Fujishima, A. (2012) TiO₂ photocatalysis: Design and applications. *J. Photochem. Photobiol. C Photochem. Rev.* **13**: 169–189.
- Nascimento, F.C., Foerster, C.E., Silva, S.L.R. da, Lepienski, C.M., Siqueira, C.J. de M., et Alves Junior, C. (2009) A comparative study of mechanical and tribological properties of AISI-304 and AISI-316 submitted to glow discharge nitriding. *Mater. Res.* **12**: 173–180.
- Navabpour, P., Cooke, K., et Sun, H. (2017) Photocatalytic Properties of Doped TiO₂ Coatings Deposited Using Reactive Magnetron Sputtering. *Coatings* **7**: 433–449.
- Navabpour, P., Ostovarpour, S., Hampshire, J., Kelly, P., Verran, J., et Cooke, K. (2014) The effect of process parameters on the structure, photocatalytic and self-cleaning properties of TiO₂ and Ag-TiO₂ coatings deposited using reactive magnetron sputtering. *Thin Solid Films* **571**: 75–83.
- Nosaka, Y. et Nosaka, A.Y. (2017) Generation and Detection of Reactive Oxygen Species in Photocatalysis. *Chem. Rev.* **117**: 11302–11336.

-O-

- Ojima, Y., Nishioka, M., et Taya, M. (2008) Metabolic alternations in SOD-deficient *Escherichia coli* cells when cultivated under oxidative stress from photoexcited titanium dioxide. *Biotechnol. Lett.* **30**: 1107–1113.
- Overney, A. (2016) Persistance de *Listeria monocytogenes* dans les ateliers agro-alimentaires : influence de facteurs environnementaux et étude des mécanismes d'adaptation aux stress. Thèse, Paris.

-P-

- Parolis, L.A.S., Parolis, H., Dutton, G.G.S., Wing, P.L., et Skura, B.J. (1992) Structure of the glycocalyx polysaccharide of *Pseudomonas fragi* ATCC 4973. *Carbohydr. Res.* **216**: 495–504.
- Pelaez, M., Nolan, N.T., Pillai, S.C., Seery, M.K., Falaras, P., Kontos, A.G., et al. (2012) A review on the visible light active titanium dioxide photocatalysts for environmental applications. *Appl. Catal. B Environ.* **125**: 331–349.
- Perelshtein, I., Applerot, G., Perkash, N., Grinblat, J., et Gedanken, A. (2012) A one-step process for the antimicrobial finishing of textiles with crystalline TiO₂ nanoparticles. *Chem. Weinh. Bergstr. Ger.* **18**: 4575–4582.
- Peruchon, L. (2007) Caractérisation des propriétés photocatalytiques des verres autonettoyants - Corrélation entre paramètres physicochimiques et activité photocatalytique. Thèse, Université Claude Bernard, Lyon.

Pigeot-Rémy, S., Simonet, F., Errazuriz-Cerda, E., Lazzaroni, J.C., Atlan, D., et Guillard, C. (2011) Photocatalysis and disinfection of water: Identification of potential bacterial targets. *Appl. Catal. B Environ.* **104**: 390–398.

Ploux, L., Beckendorff, S., Nardin, M., et Neunlist, S. (2007) Quantitative and morphological analysis of biofilm formation on self-assembled monolayers. *Colloids Surf. B Biointerfaces* **57**: 174–181.

-Q-

Qian, J., Li, K., Wang, P., Wang, C., Shen, M., Liu, J., et al. (2017) Toxic effects of three crystalline phases of TiO₂ nanoparticles on extracellular polymeric substances in freshwater biofilms. *Bioresour. Technol.* **241**: 276–283.

-R-

Rana, S., Srivastava, R.S., Sorensson, M.M., et Misra, R.D.K. (2005) Synthesis and characterization of nanoparticles with magnetic core and photocatalytic shell: Anatase TiO₂–NiFe₂O₄ system. *Mater. Sci. Eng. B* **119**: 144–151.

Raulio, M., Pore, V., Areva, S., Ritala, M., Leskelä, M., Lindén, M., et al. (2006) Destruction of *Deinococcus geothermalis* biofilm by photocatalytic ALD and sol-gel TiO₂ surfaces. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* **33**: 261–268.

Rawat, J., Rana, S., Sorensson, M.M., et Misra, R.D.K. (2007) Anti-microbial activity of doped anatase titania coated nickel ferrite composite nanoparticles. *Mater. Sci. Technol.* **23**: 97–102.

Rawat, Jagdish, Rana, S., Srivastava, R., et Misra, R.D.K. (2007) Antimicrobial activity of composite nanoparticles consisting of titania photocatalytic shell and nickel ferrite magnetic core. *Mater. Sci. Eng. C Biomim. Supramol. Syst.* **27**: 540–545.

Reij, M.W. et Den Aantrekker, E.D. (2004) Recontamination as a source of pathogens in processed foods. *Int. J. Food Microbiol.* **91**: 1–11.

Ren, W., Sheng, X., Huang, X., Zhi, F., et Cai, W. (2013) Evaluation of detergents and contact time on biofilm removal from flexible endoscopes. *Am. J. Infect. Control* **41**: e89–92.

Rizzo, L., Della Sala, A., Fiorentino, A., et Li Puma, G. (2014) Disinfection of urban wastewater by solar driven and UV lamp – TiO₂ photocatalysis: Effect on a multi drug resistant *Escherichia coli* strain. *Water Res.* **53**: 145–152.

Rodrigues, L., Mei, H.C. van der, Teixeira, J., et Oliveira, R. (2004) Influence of Biosurfactants from Probiotic Bacteria on Formation of Biofilms on Voice Prostheses. *Appl. Environ. Microbiol.* **70**: 4408–4410.

Rodríguez-López, P. et Cabo, M.L. (2017) Tolerance development in *Listeria monocytogenes*-*Escherichia coli* dual-species biofilms after sublethal exposures to pronase-benzalkonium chloride combined treatments. *Food Microbiol.* **67**: 58–66.

Rogers, J., Dowsett, A.B., Dennis, P.J., Lee, J.V., et Keevil, C.W. (1994) Influence of temperature and plumbing material selection on biofilm formation and growth of

- Legionella pneumophila* in a model potable water system containing complex microbial flora. *Appl. Environ. Microbiol.* **60**: 1585–1592.
- Rosenberg, M. (2006) Microbial adhesion to hydrocarbons: twenty-five years of doing *Math. Fems Microbiol. Lett.* **262**: 129–134.
- Rosenberg, M., Gutnick, D., et Rosenberg, E. (1980) Adherence of bacteria to hydrocarbons: A simple method for measuring cell-surface hydrophobicity. *FEMS Microbiol. Lett.* **9**: 29–33.
- Roux, A. et Ghigo, J.-M. (2006) Bacterial biofilms, *Bull. De l'Académie vét. De France*, **159**, 261-268.
- S-**
- Saidi, F.Z. (2014) Elimination du Bleu de Méthylène par des Procédés d'Oxydation Avancée. Thèse, Algérie.
- Sarantopoulos, C. et Gleizes, A. (2008) Photocatalyseurs à base de TiO₂ préparés par infiltration chimique en phase vapeur (CVI) sur supports microfibreux. Thèse, INP Toulouse, Toulouse, France.
- Saulou, C. (2009) Evaluation des propriétés anti-adhésives et biocides de films nanocomposites avec inclusions d'argent, déposés sur acier inoxydable par procédé plasma. Thèse, Toulouse, INSA.
- Seki, M., Iida, K., Saito, M., Nakayama, H., et Yoshida, S. (2004) Hydrogen peroxide production in *Streptococcus pyogenes*: involvement of lactate oxidase and coupling with aerobic utilization of lactate. *J. Bacteriol.* **186**: 2046–2051.
- Serna, F. (2014) La diffraction des rayons X : une technique puissante pour résoudre certains problèmes industriels et technologiques. *Chim. Nouv.* 1–12.
- Sharma, D. et Saharan, B.S. (2016) Functional characterization of biomedical potential of biosurfactant produced by *Lactobacillus helveticus*. *Biotechnol. Rep.* **11**: 27–35.
- Shi, H., Magaye, R., Castranova, V., et Zhao, J. (2013) Titanium dioxide nanoparticles: a review of current toxicological data. *Part. Fibre Toxicol.* **10**: 15.
- Shi, X. et Zhu, X. (2009) Biofilm formation and food safety in food industries. *Trends Food Sci. Technol.* **20**: 407–413.
- Shiraishi, F., Nakasako, T., et Hua, Z. (2003) Formation of Hydrogen Peroxide in Photocatalytic Reactions. *J. Phys. Chem. A* **107**: 11072–11081.
- Simões, M. (2010) A review of current and emergent biofilm control strategies. *LWT - Food Sci. Technol.* **43**: 573–583.
- Simões, M., Cleto, S., Pereira, M.O., and Vieira, M.J. (2007) Influence of biofilm composition on the resistance to detachment. *Water Sci Technol* **55**: 473–80.
- Sirimahachai, U., Phongpaichit, S., et Wongnawa, S. (2009) Evaluation of bactericidal activity of TiO₂ photocatalysts: a comparative study of laboratory-made and commercial TiO₂ samples. *Songklanakarin J. Sci. Technol.* **31**: 517–525.

- Skowron, K., Bauza-Kaszewska, J., Dobrzańska, Z., Ski, Z., Paluszak, Z., et Skowron, K.J. (2014) UV-C Radiation as a Factor Reducing Microbiological Contamination of Fish Meal. *Sci. World J.* **2014**, ID928094, 1-8.
- Soni, K.A., Nannapaneni, R., et Tsara, T. (2011) An Overview of Stress Response Proteomes in *Listeria monocytogenes*. *Agric. Food Anal. Bacteriol.* **1**: 66–85.
- Soumet, C., Méheust, D., Pissavin, C., Le Grandois, P., Frémaux, B., Feurer, C., Le Roux, A., Denis, M., Maris, P. (2016) Reduced susceptibilities to biocides and resistance to antibiotics in food-associated bacteria following exposure to quaternary ammonium compounds. *J. Appl. Microbiol.* **121**: 1275–1281.
- Soumet, C. (2017) Efficacité et limites des procédures de nettoyage et de désinfection usuelles. Présentation - Journée technique - Hygiène des environnements agroalimentaires. Saint-Brieuc
- Sunada, K., Watanabe, T., et Hashimoto, K. (2003) Studies on photokilling of bacteria on TiO₂ thin film. *J. Photochem. Photobiol. Chem.* **156**: 227–233.
- Suo, Y., Huang, Y., Liu, Y., Shi, C., et Shi, X. (2012) The expression of superoxide dismutase (SOD) and a putative ABC transporter permease is inversely correlated during biofilm formation in *Listeria monocytogenes* 4b G. *PLoS One* **7**: e48467.
- Suo, Y., Liu, Y., Zhou, X., Huang, Y., Shi, C., Matthews, K., et Shi, X. (2014) Impact of Sod on the Expression of Stress-Related Genes in *Listeria monocytogenes* 4b G with/without Paraquat Treatment. *J. Food Sci.* **79**: M1745–M1749.
- Swem, L.R., Swem, D.L., O’Loughlin, C.T., Gatmaitan, R., Zhao, B., Ulrich, S.M., et Bassler, B.L. (2009) A Quorum-Sensing Antagonist Targets Both Membrane-Bound and Cytoplasmic Receptors And Controls Bacterial Pathogenicity. *Mol. Cell* **35**: 143–153.
- Swoboda, J.G., Campbell, J., Meredith, T.C., et Walker, S. (2010) Wall Teichoic Acid Function, Biosynthesis, and Inhibition. *Chembiochem Eur. J. Chem. Biol.* **11**: 35–45.

-T-

- Tan, L.K., Ooi, P.T., et Thong, K.L. (2014) Prevalence of *Yersinia enterocolitica* from food and pigs in selected states of Malaysia. *Food Control* **35**: 94–100.
- Tang, H., Prasad, K., Sanjinès, R., Schmid, P.E., et Lévy, F. (1994) Electrical and optical properties of TiO₂ anatase thin films. *J. Appl. Phys.* **75**: 2042–2047.
- Tang, W.Z. et Huren An (1995) UV/TiO₂ photocatalytic oxidation of commercial dyes in aqueous solutions. *Chemosphere* **31**: 4157–4170.
- Thabet, S., Weiss-Gayet, M., Dappozze, F., Cotton, P., et Guillard, C. (2013) Photocatalysis on yeast cells: Toward targets and mechanisms. *Appl. Catal. B Environ.* **140–141**: 169–178.
- Trachoo, N. (2003) Biofilms and the food industry. *Songklanakarin J. Sci. Technol.* **25**: 807–815.

- Tremblay, Y.D.N., Hathroubi, S., et Jacques, M. (2014) Les biofilms bactériens : leur importance en santé animale et en santé publique. *Can. J. Vet. Res.* **78**: 110–116.
- Tsuang, Y.-H., Sun, J.-S., Huang, Y.-C., Lu, C.-H., Chang, W.H.-S., et Wang, C.-C. (2008) Studies of Photokilling of Bacteria Using Titanium Dioxide Nanoparticles. *Artif. Organs* **32**: 167–174.
- Tunc, O., Thompson, J., et Tremellen, K. (2010) Development of the NBT assay as a marker of sperm oxidative stress. *Int. J. Androl.* **33**: 13–21.

-V-

- Valencia, S., Marín, J.M., et Restrepo, G. (2009) Study of the Bandgap of Synthesized Titanium Dioxide Nanoparticles Using the Sol-Gel Method and a Hydrothermal Treatment. *Open Mater. Sci. J.* **4**:
- Van Cauteren, D. (2016) Estimation de la morbidité des infections d'origine alimentaire en France. Thèse, Paris Saclay.
- Van der Meulen, T., Mattson, A., et Österlund, L. (2007) A comparative study of the photocatalytic oxidation of propane on anatase, rutile, and mixed-phase anatase–rutile TiO₂ nanoparticles: Role of surface intermediates. *J. Catal.* **251**: 131–144.
- Van der Veen, S. et Abee, T. (2011) Bacterial SOS response: a food safety perspective. *Curr Opin Biotechnol* **22**: 136–42.
- Van Houdt, R. et Michiels, C. w. (2010) Biofilm formation and the food industry, a focus on the bacterial outer surface. *J. Appl. Microbiol.* **109**: 1117–1131.
- Van Meervenne, E., De Weirtdt, R., Van Coillie, E., Devlieghere, F., Herman, L., et Boon, N. (2014) Biofilm models for the food industry: hot spots for plasmid transfer? *Pathog. Dis.* **70**: 332–338.
- Van der Veen, S. et Abee, T. (2010) Importance of SigB for *Listeria monocytogenes* static and continuous-flow biofilm formation and disinfectant resistance. *Appl. Environ. Microbiol.* **76**: 7854–7860.
- Van der Veen, S. et Abee, T. (2011) Mixed species biofilms of *Listeria monocytogenes* and *Lactobacillus plantarum* show enhanced resistance to benzalkonium chloride and peracetic acid. *Int. J. Food Microbiol.* **144**: 421–431.
- Veréb, G., Manczinger, L., Bozsó, G., Sienkiewicz, A., Forró, L., Mogyorósi, K., et al. (2013) Comparison of the photocatalytic efficiencies of bare and doped rutile and anatase TiO₂ photocatalysts under visible light for phenol degradation and *E. coli* inactivation. *Appl. Catal. B Environ.* **129**: 566–574.
- Verran, J., Airey, P., Packer, A., et Whitehead, K.A. (2008) Microbial retention on open food contact surfaces and implications for food contamination. *Adv. Appl. Microbiol.* **64**: 223–246.

-W-

- Walker, R.W., Markillie, L.M., Colotelo, A.H., Geist, D.R., Gay, M.E., Woodley, C.M., et al. (2013) Ultraviolet radiation as disinfection for fish surgical tools. *Anim. Biotelemetry* **1**: 4.
- Wang, Z., Yao, N., Hu, X., et Shi, X. (2014) Structural and photocatalytic study of titanium dioxide films deposited by DC sputtering. *Mater. Sci. Semicond. Process.* **21**: 91–97.
- Weydert, C.J. et Cullen, J.J. (2010) Measurement of superoxide dismutase, catalase, and glutathione peroxidase in cultured cells and tissue. *Nat. Protoc.* **5**: 51–66.
- Widders, P.R., Coates, K.J., Warner, S., Beattie, J.C., Morgan, I.R., et Hickey, M.W. (1995) Controlling microbial contamination on beef and lamb meat during processing. *Aust. Vet. J.* **72**: 208–211.
- Wolfrum, E.J., Huang, J., Blake, D.M., Maness, P.-C., Huang, Z., Fiest, J., et Jacoby, W.A. (2002) Photocatalytic Oxidation of Bacteria, Bacterial and Fungal Spores, and Model Biofilm Components to Carbon Dioxide on Titanium Dioxide-Coated Surfaces. *Environ. Sci. Technol.* **36**: 3412–3419.
- Wu, C.-H. et Chern, J.-M. (2006) Kinetics of Photocatalytic Decomposition of Methylene Blue. *Ind. Eng. Chem. Res.* **45**: 6450–6457.

-Y-

- Yan, G., Chen, J., et Hua, Z. (2009) Roles of H₂O₂ and OH radical in bactericidal action of immobilized TiO₂ thin-film reactor: An ESR study. *J. Photochem. Photobiol. Chem.* **207**: 153–159.
- Yemmireddy, V.K., Farrell, G.D., et Hung, Y.-C. (2015) Development of Titanium Dioxide (TiO₂) Nanocoatings on Food Contact Surfaces and Method to Evaluate Their Durability and Photocatalytic Bactericidal Property. *J. Food Sci.* **80**: N1903–N1911.
- Yuangpho, N., Le, S.T.T., Treerujiraphapong, T., Khanitchaidecha, W., et Nakaruk, A. (2015) Enhanced photocatalytic performance of TiO₂ particles via effect of anatase–rutile ratio. *Phys. E Low-Dimens. Syst. Nanostructures* **67**: 18–22.

-Z-

- Zaleska, A. (2008) Doped-TiO₂: A Review. *Recent Pat. Eng.* **2**: 157–164.
- Zhang, J., Zhou, P., Liu, J., et Yu, J. (2014) New understanding of the difference of photocatalytic activity among anatase, rutile and brookite TiO₂. *Phys. Chem. Chem. Phys.* **16**: 20382–20386.
- Zoltan, T., Rosales, M.C., et Yadarola, C. (2016) Reactive oxygen species quantification and their correlation with the photocatalytic activity of TiO₂ (anatase and rutile) sensitized with asymmetric porphyrins. *J. Environ. Chem. Eng.* **4**: 3967–3980.
- Zottola, E.A. et Sasahara, K.C. (1994) Microbial biofilms in the food processing industry—Should they be a concern? *Int. J. Food Microbiol.* **23**: 125–148.

Annexes :

Annexe 1 : Fiches JCPDS des phases cristallines du TiO_2

Annexe 2 : Valorisation des travaux

Annexe 1 : Fiche JCPDS des phases, anatase et rutile, du TiO₂.

TiO₂- Anatase

71-1167	Quality: C	TiO ₂
CAS Number:		Titanium Oxide
Molecular Weight: 79.90		Ref: Calculated from ICSD using POWD-12++, (1997)
Volume[CD]: 136.93		Ref: Horn, M., Schwerdtfeger, C.F., Meagher, E.P., Z. Kristallogr., Kristallgeom., Kristallphys., Kristallchem., 136, 273 (1972)
Dx: 3.876	Dm:	
Sys: Tetragonal		
Lattice: Body-centered		
S.G.: I4 ₁ /amd (141)		
Cell Parameters:		
a 3.789	b	c 9.537
α	β	γ
I/Cor: 4.95		
Rad: CuK α 1		
Lambda: 1.54060		
Filter:		
d-sp: calculated		
ICSD #: 009853		
Mineral Name:		
Anatase		

2 θ	Int-f	h	k	l	2 θ	Int-f	h	k	l	2 θ	Int-f	h	k	l
25.271	999	1	0	1	54.992	144	2	1	1	74.897	72	2	1	5
36.877	61	1	0	3	62.011	25	2	1	3	75.932	20	3	0	1
37.698	184	0	0	4	62.572	105	2	0	4	80.505	3	0	0	8
38.509	71	1	1	2	68.593	45	1	1	6	82.027	5	3	0	3
47.980	237	2	0	0	70.198	48	2	2	0	82.529	35	2	2	4
53.761	147	1	0	5	73.858	4	1	0	7	83.034	15	3	1	2

TiO₂- Rutile

77-0442	Quality: C	TiO ₂
CAS Number:		Titanium Oxide
Molecular Weight: 79.90		Ref: Calculated from ICSD using POWD-12++, (1997)
Volume[CD]: 62.91		Ref: Seki, H et al., Yogyo Kyokaishi (J. Ceram. Assoc. Jpn.), 92, 219 (1984)
Dx: 4.218	Dm:	
Sys: Tetragonal		
Lattice: Primitive		
S.G.: P4 ₂ /mm (136)		
Cell Parameters:		
a 4.604	b	c 2.967
α	β	γ
I/Cor: 3.50		
Rad: CuK α 1		
Lambda: 1.54060		
Filter:		
d-sp: calculated		
ICSD #: 039168		
Mineral Name:		
Rutile, syn		

2 θ	Int-f	h	k	l	2 θ	Int-f	h	k	l	2 θ	Int-f	h	k	l
27.372	999	1	1	0	62.547	63	0	0	2	76.284	15	2	0	2
35.975	434	1	0	1	63.882	59	3	1	0	79.564	8	2	1	2
39.096	64	2	0	0	65.328	4	2	2	1	82.095	25	3	2	1
41.123	169	1	1	1	68.811	142	3	0	1	84.010	17	4	0	0
43.937	60	2	1	0	69.570	73	1	1	2	87.228	6	4	1	0
54.171	465	2	1	1	72.214	7	3	1	1	89.244	42	2	2	2
56.484	129	2	2	0	74.200	2	3	2	0					

Annexe 2 : Valorisation des travaux

1

4 - Posters

Barthomeuf M., Castel X., Le Gendre L., Pissavin C., Adhésion et viabilité de *Listeria monocytogenes* sur films de TiO₂, Congrès de la Société Française de Microbiologie (SFM). 31 mars 2014 au 1er avril 2014. Paris, France.

Barthomeuf M., Castel C., Le Gendre L., Denis M., Pissavin C. (2014) Adhesion and viability of *Listeria monocytogenes* on TiO₂ thin layers. FoodMicro, 1-4 September 2014, Nantes, France

Barthomeuf M., Raymond P., Castel X., Le Gendre L., Soumet C., Denis M., Pissavin C. (2014) Bactericidal efficiency of UV-active TiO₂ thin films on adhesion and viability of *Listeria monocytogenes* and *Pseudomonas fragi*. ICAR, 1-3 October 2014, Madrid, Spain

Barthomeuf M., Raymond P., Castel X., Le Gendre L., Denis M., Pissavin C., Effet bactéricide de couches minces photoactives de TiO₂ sur différentes souches bactériennes issus de la filière viande, Congrès de la Société Française de Microbiologie (SFM). 30 - 31 mars 2015 Paris, France.

Barthomeuf M., Raymond R., Castel X., Le Gendre L., Denis M., Pissavin C. (2015) Bactericidal efficiency of UV-active TiO₂ thin films on adhesion and viability of pathogenic bacteria. E-MRS 2015 Spring Meeting “European Material Research Society”, 11-15 mai 2015, Lille, France

Louis J., Barthomeuf M., Bernard C., Castel Xavier, Le Gendre L., Denis M. et Pissavin C. (2017) Activité antibactérienne de couches minces de TiO₂ sur *Listeria monocytogenes*. Bioadh'2017, 15-16 novembre 2017, Bouray sur Juine, France.

5 - Communications auprès des professionnelles ou financeurs.

Barthomeuf M., Policarpo N., Castel X., Le Gendre L., Denis M., Pissavin C. (2016) Activité bactéricide de couches minces de TiO₂ photoactivées. Journée Technique Biofilm, Ispaia, Ploufragan, novembre 2016.

Résumé : Les bactéries pathogènes présentes dans les biofilms en industries agroalimentaires (IAA) représentent un problème récurrent ayant un impact économique et des conséquences sur la sécurité sanitaire des aliments. Leur résistance face aux procédures de nettoyage et désinfection fait des biofilms un problème majeur dans les IAA. Le développement de surfaces photoactives avec des propriétés antibactériennes pourrait faciliter l'élimination des biofilms. Une solution serait de déposer un photocatalyseur, le dioxyde de titane (TiO₂) sous forme de couches minces sur des matériaux rencontrés dans les IAA. Les objectifs de cette thèse ont été d'optimiser de couches minces de TiO₂ aux propriétés antibactériennes et d'étudier les mécanismes impliqués dans la photocatalyse. La fonctionnalisation d'un substrat a été possible grâce au dépôt d'une couche mince de TiO₂ par pulvérisation cathodique radio-fréquence. Modifier les conditions de dépôt (température, pression partielle en oxygène, durée) a permis d'obtenir les couches minces les plus photocatalytiques et antibactériennes. La première étape a nécessité l'utilisation d'un matériau inerte et transparent, permettant la caractérisation complète des couches minces. Le second substrat utilisé est l'acier inoxydable 316, matériau rencontré dans les IAA. Ces nouveaux dépôts ont demandé une mise au point des conditions de dépôt. La caractérisation des couches minces par microscopie à balayage (MEB), diffraction des rayons X (DRX), a permis de mettre en évidence des différences notables suite au changement de substrat. Les couches minces de TiO₂ (sur verre ou acier inoxydables) possèdent une activité photocatalytique et des propriétés antibactériennes sur des souches représentatives de la flore retrouvée dans les IAA de la filière « viande » : *Listeria monocytogenes*, *Yersinia enterocolitica* et *Pseudomonas fragi*. Des diminutions de la population bactérienne entre 1,5Log et 3Log ont été observées. La compréhension des mécanismes impliqués dans la photocatalyse a été menée. La production d'espèces réactives de l'oxygène (EROs) telles que le peroxyde d'hydrogène (H₂O₂), les radicaux hydroxyles (•OH) et les anions superoxydes (O₂•⁻) a été étudiée par des méthodes spectro-colorimétriques. Une hypothèse est que l'H₂O₂ à la surface de la couche mince est converti en •OH, ERO principale et *a priori* la plus délétère. Enfin, l'étude des mécanismes de réponses de *L. monocytogenes* face à la photocatalyse, a été initiée par une approche transcriptomique en suivant l'expression de gènes impliqués dans la réponse au stress oxydatif (*sod*, *kat*, *recA*, *perR*, *sigB* ou *fri*). Toutefois la méthode utilisée nécessite une nouvelle mise au point afin d'être utilisée sur les bactéries présentes à la surface des couches minces.

MOTS CLEFS : photocatalyse, TiO₂, industries agroalimentaires, bactéries, biofilm, espèces réactives de l'oxygène.

Abstract: Pathogenic bacteria in biofilms in food industries represent a recurrent problem with an economic impact and food safety consequences. Their high resistance to cleaning and sanitizing procedures is a major concern in food industries. The development of photoactive surfaces with bactericidal properties could facilitate the elimination of such microbial biofilms and may represent an alternative way to biocides. One solution is to deposit a photocatalyst top-layer (TiO₂) on conventional materials used in food plants. The objectives of this thesis were the optimisation of TiO₂ thin layers with antibacterial properties and the study of mechanisms involved in photocatalysis. Different substrates were coated with TiO₂ thin films by radio-frequency magnetron sputtering. Modifying the deposition conditions (temperature, oxygen partial pressure, and duration) made it possible to optimize the thin layers in order to obtain the most photocatalytic and antibacterial one. The first step required the use of glass substrate, an inert and transparent material, allowing the complete characterization of the thin layers. Then, the second substrate used was 316 stainless steel, a material widely used in food plants. Deposition of this substrate required a finalization of the deposit conditions. Indeed the characterization of all thin layers by scanning electron microscopy (SEM), X-ray diffraction (DRX) showed significant differences in TiO₂ phase. TiO₂ thin layers obtained either on glass or stainless steel showed photocatalytic and antibacterial properties on representative strains of the flora found in the meat industry: *Listeria monocytogenes*, *Yersinia enterocolitica* and *Pseudomonas fragi*. Decreases in the bacterial population between 1.5Log and 3Log were observed. In order to optimize TiO₂ thin films, an exploration of the mechanisms involved in photocatalysis was carried out. The production of reactive oxygen species (ROS) such as hydrogen peroxide (H₂O₂), hydroxyl radicals (•OH) and superoxide anions (O₂•⁻) was studied by spectro-colorimetric methods. It seems that H₂O₂ on the surface is converted in another ROS, •OH. Finally, the study of the bacterial response mechanisms to photocatalysis, especially for *L. monocytogenes*, was initiated by a transcriptomic approach by following the expression of genes involved in the response to oxidative stress (*sod*, *kat*, *recA*, *perR*, *sigB* or *fri*). However, the method used requires some optimizations in order to be used with the bacteria present on TiO₂ thin layers.

KEY WORDS: photocatalysis, TiO₂, food industry, bacteria, biofilm, reactive oxygen species.

RÉSUMÉ

Etude de l'effet antibactérien de surfaces traitées à l'aide de composés du titane et de leur applicabilité dans les industries agroalimentaires.

Les biofilms en industries agroalimentaires (IAA) représentent un problème récurrent aux conséquences économiques et de sécurité sanitaire. Le développement de surfaces photoactives aux propriétés antibactériennes pourrait faciliter leur élimination. Une solution serait de déposer une couche mince de dioxyde de titane (TiO₂) sur des matériaux rencontrés dans les IAA. Les objectifs de cette thèse ont donc été d'optimiser des couches minces de TiO₂ aux propriétés antibactériennes et d'étudier les mécanismes impliqués dans la photocatalyse. Les dépôts sont réalisés par pulvérisation cathodique radiofréquence dans différentes conditions (température, PO₂, durée), d'abord sur substrat de verre puis sur acier inoxydable 316. La caractérisation des couches minces par microscopie à balayage, diffraction des rayons X, a montré des différences dues au changement de substrat. Les différentes optimisations ont conduit à l'obtention de couches minces possédant une activité photocatalytique et des propriétés antibactériennes sur des souches représentatives de la flore retrouvée dans les IAA de la filière « viande » : *L. monocytogenes*, *Y. enterocolitica* et *P. fragi*. Des diminutions de la population bactérienne entre 1,5Log et 3Log ont été observées. La production d'espèces réactives de l'oxygène (H₂O₂, •OH, O₂•-) a été étudiée par des méthodes spectrophotométriques. L'H₂O₂ à la surface de la couche mince serait converti en •OH. L'étude des mécanismes de réponse de *L. monocytogenes* face à la photocatalyse des couches minces a été initiée par une approche transcriptomique, en suivant l'expression de gènes impliqués dans la réponse au stress oxydatif.

Mots-clés : photocatalyse, TiO₂, IAA, bactéries, biofilm, espèces réactives de l'oxygène.

ABSTRACT

Study of the antibacterial effect of surfaces treated with titanium compounds and their applicability in the agro-food industries.

Biofilms in food industries represent a recurrent problem with economic and health safety implications. The development of photoactive surfaces with antibacterial properties could facilitate their elimination. One solution would be to deposit a thin layer of titanium dioxide (TiO₂) on conventional materials used in food plants. The objectives of this thesis were the optimization of thin films of TiO₂ with antibacterial properties and to study the mechanisms involved in photocatalysis. Deposits were made by radio-frequency sputtering under different conditions (temperature, oxygen partial pressure, duration), first on a glass substrate and then on 316 stainless steel. Characterization of thin layers by scanning microscopy, diffraction of X-ray, showed differences due to substrate change. TiO₂ thin layers obtained either on glass or stainless steel showed photocatalytic and antibacterial properties on representative strains of the flora found in the meat industry: *Listeria monocytogenes*, *Yersinia enterocolitica* and *Pseudomonas fragi*. Decreases in the bacterial population between 1.5Log and 3Log were observed. The production of reactive oxygen species (ROS) was studied by spectrophotometric methods. It seems that H₂O₂ on the surface is converted in another ROS, •OH. Finally, the study of the bacterial response mechanisms to photocatalysis, especially for *L. monocytogenes*, was initiated by a transcriptomic approach by following the expression of genes involved in the response to oxidative stress. However, the method used requires an optimization in order to be used for the bacteria present on TiO₂ thin layers.

Keywords: Photocatalysis, TiO₂, agro-food industries, bacteria, biofilm, reactive oxygen species.



AGROCAMPUS OUEST • Institut national supérieur des sciences agronomiques, agroalimentaires, horticoles et du paysage
65 rue de Saint-Brieuc – CS84215 – F-35042 Rennes Cedex
Tél. : 02 23 48 50 00
www.agrocampus-ouest.fr

