



HAL
open science

Synthèse de nanoparticules d'oxydes métalliques et leur activité antibactérienne

Rania Dadi

► **To cite this version:**

Rania Dadi. Synthèse de nanoparticules d'oxydes métalliques et leur activité antibactérienne. Matériaux. Université Paris-Nord - Paris XIII, 2019. Français. NNT : 2019PA131039 . tel-03119316

HAL Id: tel-03119316

<https://theses.hal.science/tel-03119316v1>

Submitted on 23 Jan 2021

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

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



UNIVERSITÉ PARIS 13

Institut Galilée
UNIVERSITÉ PARIS 13



THESE DE DOCTORAT DE L'UNIVERSITE PARIS 13

Mention **Sciences de l'Ingénieur**

Option **Génie des Procédés**

Présentée et soutenue publiquement par

Rania DADI

Pour obtenir le titre de

Docteur de l'Université Paris 13

Synthèse de nanoparticules d'oxydes métalliques et leur activité
antibactérienne

Soutenue le **03 Décembre 2019**

Devant le jury composé de :

Rabah AZOUANI	MCF, Ecole de Biologie Industrielle	Co-encadrant
Christel BARBAUD	Professeur, Université Paris 13	Examineur
Sophie CASSAIGNON	Professeur, Sorbonne Université	Examineur
Erwann GUENIN	MCF HDR, Université de Technologie de Compiègne	Rapporteur
Andrei KANAEV	Directeur de recherche CNRS	Co-directeur
Vadim KESSLER	Professeur, Université d'Uppsala	Rapporteur
Christine MIELCAREK	MCF, Ecole de Biologie Industrielle	Examineur
Mamadou TRAORE	MCF HDR, Université Paris 13	Directeur de thèse
Florence DUFOUR	Directrice générale, Ecole de Biologie Industrielle	Invitée

Je dédie ce travail

A la mémoire de mes grands-parents : Abdellah DADI, Hassania SKALLI et Mohamed

LAOBIDI

A ma grand-mère : Malika

A mes chers parents : Chafik et Najat

A ma sœur : Wissal

Et une douce pensée à ceux qui nous ont quittés un peu tôt : Moulay Driss Tahiri, Said Dadi et

Abderrahim LAOBIDI

Remerciements

Je tiens d'abord à remercier Mme Florence Dufour directrice générale de l'Ecole de Biologie Industrielle, M. Khalid Hassouni et M. Dominique VREL, directeurs successifs du LSPM de m'avoir permis d'effectuer mes travaux au sein de leurs établissements.

Je remercie également les membres du jury, le Pr Vadim Kessler et le Dr Erwan Guénin d'avoir accepté de rapporter mon travail, le Pr Christel Barbaud ainsi que le Pr Sophie Cassaignon d'avoir accepté d'examiner mon travail.

Je souhaite adresser mes sincères remerciements pour, le DR. Andrei Kanaev pour son encadrement, ses conseils avisés et son amabilité. Sa notoriété dans le domaine des nanomatériaux a été très constructive pour moi.

Je remercie aussi mon directeur de thèse, le Dr Mamadou Traoré d'avoir accepté de m'accueillir dès le stage de Master 2, et de m'avoir permis ainsi d'entrer dans le monde de la recherche. Je le remercie pour son encadrement, sa constante bonne humeur et ses encouragements au cours de ses trois années et demie passées au sein de l'équipe.

Je remercie tout particulièrement mon co-directeur de thèse, le Dr Rabah Azouani pour son dévouement, sa disponibilité et son optimisme. J'ai beaucoup apprécié sa façon de travailler en me laissant une grande liberté de manœuvre mais en s'appuyant toujours sur des analyses scientifiques rigoureuses. Les échanges permanents que nous avons eus ont soutenu ce travail et sont pour beaucoup dans sa réussite.

Ma reconnaissance va également au Dr. Christine Mielcarek, pour m'avoir fait profiter de son expertise en microbiologie, de sa disponibilité et de ses nombreux conseils. Je lui suis également très reconnaissante pour son aide lors de la rédaction de ce manuscrit.

Du fait du caractère pluridisciplinaire de ce travail, j'ai été mené à interagir avec différentes personnes de différentes spécialités. Merci à tous ceux de l'EBI qui ont consacré leur temps à m'aider et me conseiller. Je remercie notamment le Dr. Abdellatif ELM'SELMI, le Dr Samar ISSA et le Dr Karim SENNI pour leur précieux conseils pour les tests de culture cellulaire. Je remercie également Guilhem, Marjorie et Anne pour leur accueil chaleureux et leur convivialité durant ces 3 années de thèse à l'EBI.

Je remercie le Dr. Didier Lutomski du laboratoire d'ingénierie tissulaire et protéomique de m'avoir permis de réaliser les tests de culture cellulaire au sein de son laboratoire. Et le Dr. Sylvie Changotade pour son aide pour la réalisation de ces tests.

Au LSPM, je souhaite adresser mes plus sincères remerciements à Ovidiu Brinza pour les nombreuses caractérisations des produits. Ainsi qu'à tous ceux que j'ai pu rencontrer au cours de ma thèse.

Un grand merci à l'ensemble des doctorants que j'ai côtoyé pendant ma thèse : Lahcence, Kader, Siham, Nabil, Benoit, Pauline, Zak, Roland, Amal, Ahmed... . Et parce qu'une thèse ce n'est pas toujours facile, mais ça l'est un peu plus qu'on n'est pas tout seul dans la même galère... C'est donc plein d'émotion que j'adresse mes sincères remerciements à ma Sarah Dine, Amouunti et Saddam « ppt » qui ont partagé cette expérience avec moi depuis le début. Je les remercie pour les bons moments passés ensemble, pour leur soutien indénombrable et leur aide permanente.

Je remercie mes amis Amoune, Solène, Ismail, Sofia, Houda, Salma et Amine pour m'avoir entouré pendant ces années de thèse, dans les bons et mauvais moments, et de m'avoir permis de tenir jusqu'au bout.

Pour terminer je tiens à remercier profondément mes parents pour leur confiance, leurs sacrifices et leur soutien inconditionnel. Un grand merci à ma sœur Wissal, pour sa présence malgré la distance qui nous sépare et son support.

Liste des abréviations

ADN : acide désoxyribonucléique

ADP : adénosine diphosphate

AMP : adénosine monophosphate

ATD : analyse thermique différentiel

ATG : analyse thermogravimétrique

ARN : acide ribonucléique

BG- : Bacille Gram négatif

CG+ : Cocci Gram positif

CMI : concentration minimale inhibitrice

DeNOx : procédé basé sur la réduction des NOx en molécules de diazote et d'eau en utilisant de l'ammoniaque ou de l'urée comme réactif

DLS : diffusion dynamique de la lumière

DMEM : dubelcco's modified eagle's medium

EDTA : Éthylènediaminetétraacétique

FDA: Food and Drug Administration

ICU : unités de soins intensifs

ISO : infection du site opératoire

LED: light-emitting diode

LPS : lipopolysaccharides

MEA : monoéthanolamine

MEB : microscopie électronique à balayage

MEB-EDX : microscopie électronique à balayage et énergie dispersive de rayons X

MET : microscopie électronique à transmission

NM: nanomatériaux

NPs: nanoparticules

RLU : unité de luminescence relative

ROS : espèces réactives d'oxygène

SARM : Staphylococcus aureus résistant à la méticilline

TSA : tryptone soja agar

TSB : tryptone soja bouillon

TTIP : tétraisopropoxyde de titanium

UV : rayonnement ultraviolet

VIH : virus de l'immunodéficience humaine

Sommaire

1	Introduction générale	21
2	Etude bibliographique	25
2.1	Contexte clinique.....	25
2.1.1	Résistance des bactéries	26
2.1.2	Infections nosocomiales.....	29
2.2	Les nanoparticules.....	31
2.2.1	Généralités	31
2.2.2	Voies de synthèses des nanoparticules	34
2.2.3	L'activité antibactérienne des nanoparticules	36
2.2.3.1	Les mécanismes d'actions des nanoparticules	37
2.2.3.2	Les facteurs influençant l'activité antibactérienne.....	39
2.2.3.3	Les nanoparticules inorganiques	42
2.2.4	La classification des nanomatériaux	43
2.3	L'oxyde de zinc	44
2.3.1	Structure de l'oxyde de zinc	44
2.3.2	Propriétés de l'oxyde de zinc.....	45
2.3.3	Les applications de l'oxyde de zinc	46
2.3.4	Les propriétés antibactériennes	46
2.4	L'oxyde de Cuivre	47
2.4.1	Structure de l'oxyde de cuivre.....	48
2.4.2	Les propriétés de l'oxyde de cuivre	48
2.4.3	Les applications de CuO	49
2.4.4	Les propriétés antibactériennes	49
2.5	Le dioxyde de Titane TiO ₂	50
2.5.1	Structure du dioxyde de titane.....	50
2.5.2	Les propriétés du dioxyde du titane	51
2.5.3	Les applications du dioxyde du titane.....	52

2.5.4	Les propriétés antibactériennes du dioxyde de titane	53
2.6	La méthode Sol-Gel	54
2.6.1	Définition.....	54
2.6.2	Les précurseurs.....	55
2.6.3	Les mécanismes réactionnels.....	56
2.6.4	Les paramètres influençant les réactions	56
2.6.5	Les oxydes métalliques dans le sol-gel.....	57
2.7	Les couches minces	58
2.8	Conclusion.....	60
3	Dispositifs expérimentaux et outils de caractérisations.....	62
3.1	Systèmes biologiques	62
3.1.1	Les souches bactériennes.....	63
3.1.1.1	Escherichia coli.....	64
3.1.1.2	Staphylococcus aureus	65
3.1.1.3	Pseudomonas aeruginosa	66
3.1.1.4	Candida albicans	67
3.2	Conditions de conservations des souches	68
3.3	Conditions de croissance des souches.....	69
3.3.1	Croissance en milieu liquide (TSB).....	69
3.3.2	Croissance en milieu solide (TSA)	69
3.3.3	La croissance bactérienne	69
3.4	Méthodes d'étude de l'activité antibactérienne des nanoparticules	71
3.4.1	Méthode de diffusion sur disque.....	72
3.4.2	La méthode de diffusion en puits	73
3.4.3	La bioluminescence : ATP métrie.....	73
3.4.3.1	L'ATP en tant qu'indicateur de la viabilité cellulaire.....	73
3.4.3.2	Détermination de la concentration en ATP par dosage de bioluminescence.	74
3.4.4	Méthode de décrochage sur lames (porte-germes).....	76
3.5	Méthode de caractérisation des nanomatériaux.....	77
3.5.1	Analyse thermogravimétrique (ATG) et analyse thermique différentielle (ATD).....	77
3.5.2	Microscopie électronique à balayage (MEB).....	78

3.5.3	Microscopie électronique à balayage et énergie dispersive de rayon X (MEB-EDX)	79
3.5.4	Microscopie électronique en transmission (MET)	79
3.5.5	Spectroscopie Raman.....	81
3.5.6	Diffusion dynamique de la lumière.....	82
3.5.7	MasterSizer : Laser Doppler Electrophorèse	85
4	Elaboration et caractérisation des nanodépôts d'oxyde de zinc (ZnO), d'oxyde de cuivre (CuO) et du dioxyde de titane (TiO ₂).	87
4.1	Elaboration de couches minces de ZnO, CuO et TiO ₂	88
4.1.1	Préparation des substrats	88
4.1.2	Traitements des substrats	88
4.1.3	Synthèse des solutions de ZnO et de CuO.....	89
4.1.4	Synthèse de la solution de TiO ₂	90
4.1.5	Dépôt de ZnO, CuO et TiO ₂	92
4.1.5.1	Techniques de dépôt.....	92
4.1.5.2	Choix d'une technique de dépôt en couche mince	93
4.1.6	Traitement thermique.....	93
4.1.7	Préparations des échantillons sous forme de gel et de poudre	96
4.2	Caractérisations des nanoparticules	96
4.2.1	Qualité des plaques	96
4.2.2	Distribution et tailles des nanoparticules en suspensions	98
4.2.2.1	Diffusion dynamique de la lumière (DLS).....	98
4.2.2.2	Microscopie électronique à transmission (MET)	99
4.2.3	Morphologie des nanodépôts par MEB	100
4.2.3.1	Cas de l'oxyde de zinc et de l'oxyde de cuivre.....	100
4.2.3.2	Cas du dioxyde de titane	101
4.2.4	Analyse élémentaire et quantitative des dépôts par EDX.....	101
4.2.5	Analyses thermiques par ATD/ATG.....	103
4.2.5.1	Oxyde de Zinc	103
4.2.6	Etude vibrationnelle par spectroscopie Raman.....	104
4.2.6.1	Caractérisation du complexe Acétate monoethanolamine.....	104

4.2.6.2	Analyse du spectre de l'oxyde de zinc	106
4.2.6.3	Analyse du spectre de l'oxyde de cuivre	107
4.2.7	Potentiel Zêta	109
4.3	Conclusion.....	110
5	Activité antibactérienne des nanoparticules d'oxyde de zinc, de cuivre et du dioxyde de titane	112
5.1	La méthode de diffusion sur disque et en puits.....	112
5.1.1	Evaluation de l'activité antibactérienne contre <i>E. coli</i> , <i>S. aureus</i> et <i>P. aeruginosa</i>	113
5.1.2	Evaluation de l'activité fongicide contre <i>C. albicans</i>	117
5.2	Modélisation sur la diffusion des nanoparticules Vs ions.....	118
5.3	Bioluminescence : ATP métrie.....	124
5.3.1	Effet de la concentration sur l'activité antibactérienne	125
5.3.2	Cinétique de l'activité antibactérienne de ZnO et CuO	127
5.4	Méthode de décrochage sur lames.....	129
5.4.1	Validation du protocole de lavage des lames selon la norme NF EN 14561	129
5.4.1.1	Essais sur des suspensions de <i>E. coli</i> et <i>S. aureus</i> avec Eugon LT100	130
5.4.1.2	Essais sur des suspensions de <i>E.coli</i> et <i>S.aureus</i> avec Lauryl Sulfate de Sodium (LSS) 131	
5.4.1.3	Essais sur des suspensions de <i>E. coli</i> et <i>S. aureus</i> avec l'éthylènediaminetétraacétique (EDTA)	132
5.4.2	Protocole de lavage des lames	133
5.5	Etude de cytotoxicité	137
5.5.1	Lignée cellulaire	137
5.5.2	Entretien des cellules.....	137
5.5.3	Test de viabilité.....	137
5.6	Discussion	139
5.7	Conclusion.....	141
6	Conclusion générale.....	143

Liste des figures

Figure 1: Niveau de résistance des microorganismes.....	25
Figure 2 : Mécanismes de la résistance bactérienne aux désinfectants	28
Figure 3: Illustration de la résistance bactérienne aux antibiotiques [40].....	29
Figure 4 : (a) Prévalence des principaux sites d'infections nosocomiales, (b) prévalence des patients infectés par région en France en 2017 [47]	31
Figure 5: Gamme de tailles des nanoparticules comparée à celle des principales structures [48].....	32
Figure 6: Domaines d'applications des nanoparticules [55]	33
Figure 7: Approches physique/chimique d'élaborations des nanoparticules [63]	34
Figure 8 : Les principales voies de synthèse des nanoparticules [65].....	36
Figure 9 : Mécanismes d'action supposés des nanoparticules [68]	37
Figure 10: Classifications des nanomatériaux (a) 0D sphères et clusters, (b) 1D nanofibres, fils et tiges, (c) 2D films, plates, et réseaux, (d) 3D nanomatériaux [116].....	44
Figure 11: Différentes structures de l'oxyde de Zinc [119]	45
Figure 12 : Structure de l'oxyde de Cuivre [143]	48
Figure 13: Différentes structures du dioxyde de titane [158]	51
Figure 14: Schéma de synthèse par la méthode sol-gel	55
Figure 15: Schéma représentant les différentes étapes du Dip-coating.....	59
Figure 16: Structure bactérie à Gram positive (à gauche) / à Gram négative (à droite) [186]	62
Figure 17: image microscopique d'E.coli [190].....	65
Figure 18: Image microscopique de S. aureus [193].....	66
Figure 19: Image microscopique de P. aeruginosa [198].....	67
Figure 20: Image microscopique de C.albicans [201]	68
Figure 21: Allure typique de la croissance bactérienne en bouillon nutritif	69
Figure 22: Illustration de la méthode de diffusion sur disques	72
Figure 23: Principe de la méthode bioluminescence	76
Figure 24: Montage d'un appareil d'analyse thermique différentielle [210]	78
Figure 25: Représentation schématique de l'interaction entre un faisceau d'électrons et la surface d'un échantillon [212]	79
Figure 26: Principe de la microscopie à transmission [213].....	80
Figure 27: Mécanisme de diffusion Rayleigh et Raman [216]	82

Figure 28: Schéma du principe de la diffusion dynamique de la lumière	83
Figure 29: Schéma détaillant le montage utilisé pour la préparation des solutions de ZnO et CuO.....	89
Figure 30: Réacteur de précipitation sol-gel	90
Figure 31: Mécanisme de fixation des nanoparticules sur le substrat	92
Figure 32: représentation d'un dip-coater	92
Figure 33: représentation d'un spin-coater	93
Figure 34: Cycle du traitement thermique.....	94
Figure 35: Processus d'élaboration des couches minces de ZnO et de CuO	95
Figure 36 : Processus d'élaboration des couches minces de TiO ₂	96
Figure 37: Photos des dépôts obtenus selon la technique Dip-coating a) ZnO, b) CuO et c) TiO ₂ (T =500°C, n couches =5).....	97
Figure 38: Mesure DSL des colloïdes de ZnO	98
Figure 39: Caractéristiques ACF des nanoparticules de TiO ₂ après leur préparation dans le réacteur T-mixer [224]	99
Figure 40: Images MET des colloïdes de a) ZnO et b) CuO.....	99
Figure 41 : Images MEB de couches minces de a) CuO, b) ZnO et d) TiO ₂ ; 5 couches; traitées à 500°C	100
Figure 42: Image MEB de couche mince de TiO ₂ , 5 couches traitées à 500°C	101
Figure 43: Spectre du film ZnO (C _{Zn} =0.75M, T = 500°C, dépôt de 5 couches)	102
Figure 44 : Spectre du film CuO (C _{CuO} = 0.75 M, T= 500°C, dépôt de 5 couches)	102
Figure 45 : ATG/ATD du gel de ZnO (C _{Zn} =0.75, t= 80°C)	104
Figure 46 : Structure octaédrique de l'ion Zn ²⁺	105
Figure 47 : Spectre Raman dans le domaine 200-1800 cm ⁻¹ , (a) Acétate de zinc à l'état solide, (b) MEA, (c) Gel (mélange de a et b) traité à 80°C pendant 1 heure	105
Figure 48 : Molécule du MEA	107
Figure 49 : Spectre Raman de a) Acétate de cuivre à l'état solide, b) Gel de CuO traité à 80°C pendant 1 heure	107
Figure 50 : Méthode de diffusion sur disque avec le propan-2-ol à 99.5%	112
Figure 51: Méthode de diffusion sur disque ZnO/E.coli (a), ZnO/S.aureus (b), ZnO/P.aeruginosa (c), CuO/E.coli (d), CuO/S.aureus (e) and CuO/P.aeruginosa (f).Les nombres indiquent la concentration en colloïds en mol/l.	113
Figure 52: Méthode de diffusion en puits TiO ₂ /E.coli (a), TiO ₂ /P.aeruginosa (b), TiO ₂ /S.aureus (c), ZnO/E.coli.....	113
Figure 53 : Méthode de diffusion en puits CuO/E. coli (a), CuO/P. aeruginosa (b), CuO/S. aureus (c), ZnO/E. coli (d), ZnO/S. aureus (e) and ZnO/P. aeruginosa (f).	115

Figure 54: Dépendance de la zone d'inhibition en fonction de la concentration of ZnO and CuO nanoparticules.....	116
Figure 55: Méthode de diffusion en puits CuO/ <i>C. albicans</i> (a) et ZnO/ <i>C. albicans</i> (b)	117
Figure 56: Concentration maximale des ions de Cu^{2+} et Zn^{2+} au rayon d'inhibition en fonction du temps	120
Figure 57: Test de l'efficacité antibactérienne d'un cristal de ZnO sur <i>S.aureus</i>	122
Figure 58: Cinétique de croissance de <i>E.coli</i> (a), <i>S.aureus</i> (b) et <i>P.aeruginosa</i> (c).	123
Figure 59 : Mesure d'ATP des suspensions bactériennes en contact avec les nanoparticules ZnO and CuO (1.5 mol/l).	125
Figure 60: Mesures d'ATP des colloïdes de ZnO et CuO (1=1.5 mol/l, 2=1 mol/l, 3=0.75 mol/l, 4= 0.5 mol/l) contre <i>E. coli</i> , <i>S. aureus</i> , <i>P. aeruginosa</i>	126
Figure 61: Cinétique de l'activité antibactérienne des nanoparticules de ZnO et CuO par bioluminescence.....	127
Figure 62: Schéma récapitulatif des essais 1 et 2 du protocole de lavage des lames	130
Figure 63 : Etapes du protocole de lavage des plaques.....	134
Figure 64 : Résultats après 24h d'incubation à 37°C des lames de NPs en contact avec les bactéries TiO_2 / <i>E. coli</i> (a), TiO_2 / <i>S. aureus</i> (b), TiO_2 / <i>P. aeruginosa</i> (c) CuO/ <i>E. coli</i> (d), CuO/ <i>P. aeruginosa</i> (e), CuO/ <i>S. aureus</i> (f), ZnO/ <i>E. coli</i> (g), ZnO/ <i>S. aureus</i> (h) and ZnO/ <i>P. aeruginosa</i> (i).....	135
Figure 65: Mesure de DO à 540 nm après coloration au rouge neutre	139

Liste des tableaux

Tableau 1 : Tableau représentant les caractères des bactéries Gram positif Vs Gram négatif	63
Tableau 2 : Principales souches bactériennes, leurs morphologies et leurs principales caractéristiques	64
Tableau 3 : Produits chimiques, leur propriétés physico chimiques et leur provenance	87
Tableau 4: Conditions expérimentales de la préparation dioxyde de titane	91
Tableau 5 : Mesures du Zeta potentiel des nanoparticules de ZnO	109
Tableau 6: Concentration maximale des espèces actives C _{max} atteinte aux rayons d'inhibition r au temps t lors de la propagation aléatoire dans les solutions aqueuses à température ambiante	119
Tableau 7 : Ajustements des paramètres de la phase de croissance exponentielle	122
<i>Tableau 8 : Résultats de l'essai 1 sur la souche E.coli</i>	<i>131</i>
Tableau 9 : Résultats de l'essai 2 sur la souche S.aureus	131
Tableau 10 : Résultats de l'essai 3 sur la souche E.coli	132
Tableau 11: Résultats de l'essai 3 sur la souche S.aureus.....	132
Tableau 12 : Résultats de l'essai 4 sur S.aureus	132
Tableau 13 : Résultats de l'essai 4 sur E.coli	133
Tableau 14 : Résultats du protocole de lavage des lames de nanoparticules au contact de E. coli, S. aureus et P. aeruginosa.....	136
Tableau 15: Densité optique des cellules à 540 nm en réponse à la coloration au rouge neutre	138
Tableau 16: Viabilité cellulaire après un contact de 24h avec les nanoparticules	138

Introduction générale

1 Introduction générale

Les infections bactériennes restent une cause majeure de morbidité et de mortalité. L'inquiétude croissante concernant les souches bactériennes multirésistantes et les infections associées aux biofilms appelle à la mise au point de moyens bactéricides supplémentaires. Par conséquent, une attention particulière est portée aux matériaux nouveaux et émergents à base de nanoparticules dans le domaine de la chimiothérapie antimicrobienne. Les bactéries se retrouvent naturellement dans les milieux cliniques et industriels en association avec les surfaces. Bien que les recherches microbiologiques modernes se concentrent principalement sur des bactéries planctoniques en culture pure, il est maintenant généralement reconnu que la plupart des bactéries vivent dans des communautés microbiennes, souvent composées de multiples espèces interagissant entre elles et avec leur environnement. La contamination bactérienne de la surface, l'adhésion, la persistance et la colonisation des surfaces par des bactéries, est de plus en plus reconnue comme étant néfaste pour la santé [1]. Les maladies infectieuses associées aux biofilms représentent plus de 80% des infections microbiennes dans l'organisme, entraînant une augmentation de la morbidité des patients et la prise en charge hospitalière/ médicale [2,3].

L'avancée dans le domaine des nanobiotechnologies, en particulier la capacité à préparer des nanomatériaux à base d'oxyde métalliques de taille et de forme spécifiques, sont susceptibles de conduire au développement de nouveaux agents antibactériens. Les activités fonctionnelles des nanoparticules sont influencées en grande partie par leurs tailles [4-7]. Par conséquent, les nanoparticules sont intéressantes en raison de leurs propriétés biologiques physiques, chimiques uniques dans divers champs, y compris la médecine. Les propriétés des nanoparticules peuvent facilement être modifiées par la réduction ou le changement de leur taille. L'utilisation de matériaux inorganiques à l'échelle nanométrique est importante en raison de leur stabilité chimique et thermique, mais également l'existence de phénomènes intéressants tels qu'une augmentation remarquable du rapport surface-volume, un changement important de l'énergie de surface et des effets de confinement quantique se produisent lorsque les oxydes métalliques sont réduits à la dimension nanométrique [8-12]. Ces phénomènes résultent en une variété de nouvelles propriétés physiques et chimiques qui ne sont pas réalisables pour des matériaux ayant une

dimensionnalité globale. De même, l'adaptation des matériaux au niveau atomique afin d'atteindre des propriétés uniques a été largement rapportée. Ces propriétés nanométriques, des particules organiques et inorganiques sont utilisées dans la recherche biomédicale, tels que les oxydes métalliques de zinc, de cuivre et de fer. En outre, les nanoparticules ont démontré une bonne activité antimicrobienne [10]. Cette dernière a été largement étudiée avec des bactéries pathogènes telles que *Escherichia coli* et *Staphylococcus aureus* [12,13]. De plus, ces germes semblent être très sensibles aux nanoparticules de ZnO et CuO [13,14]. L'activité bactéricide de ces nanoparticules dépend de plusieurs facteurs ; la taille, la stabilité et la concentration dans le milieu de croissance. Il y a inhibition de la croissance des populations bactériennes par des interactions spécifiques, lors de la croissance des bactéries en milieu modifié avec des nanoparticules. En général, la taille des cellules bactériennes est comprise dans la gamme du micromètre, tandis que ses membranes cellulaires externes, eux, ont des pores dans la gamme nanométrique. Puisque les nanoparticules peuvent avoir une taille plus petite que celle des pores bactériens, ils auront une capacité unique de traverser la membrane cellulaire. L'effet bactéricide peut également être lié à la génération d'espèce réactive d'oxygène (ROS). Le défi aujourd'hui, réside en la préparation de nanomatériaux d'oxyde métallique assez stable pour restreindre la croissance bactérienne de manière significative en milieu nutritif.

Les principaux désinfectants actuellement utilisés affectent généralement trois cibles bactériennes : la synthèse de la paroi cellulaire, la machinerie traductionnelle et la réplication de l'ADN. Malheureusement, une résistance bactérienne peut se développer contre chacun de ces modes d'action. Les mécanismes de résistance comprennent des enzymes qui modifient ou dégradent les agents antibactériens, telles que les lactamases et les aminosides, la modification de composants cellulaires tels que des éléments de la paroi cellulaire comme l'indique la résistance à la vancomycine et les ribosomes pour la résistance aux tétracyclines et enfin les pompes à efflux fournissant une résistance à de multiples biocides [15,16]. Puisque le mode d'action des nanoparticules est principalement par contact direct avec la paroi cellulaire bactérienne, sans qu'il soit nécessaire de pénétrer dans les cellules, la plupart des mécanismes de résistance observés avec les antibiotiques par exemple, n'ont aucune pertinence. Cela laisse espérer que les nanoparticules seraient moins susceptibles que les antibiotiques de promouvoir des bactéries résistantes.

Ce travail vise à élaborer des nanoparticules d'oxydes métalliques sous forme de colloïdes et sous forme de couches minces afin d'évaluer leur activité antibactérienne. Le but est l'utilisation de ces nanomatériaux pour la décontamination de surfaces notamment dans le milieu hospitalier.

Après l'introduction générale, le premier chapitre présentera une étude bibliographique introduisant le contexte actuel sur les infections nosocomiales liées à la résistance bactérienne, ainsi que l'état de l'art de l'activité antibactérienne des nanoparticules d'oxydes métalliques et leurs principaux mécanismes d'actions. Puis une revue de littérature sur la méthode sol-gel, ses mécanismes réactionnels et les paramètres influençant les réactions.

Le second chapitre est dédié à la description dans une première partie du système biologique étudié : les différentes souches bactériennes utilisées, leurs conditions de conservations et de croissance. Dans une seconde partie, il développe les principales méthodes d'étude de l'activité antibactérienne utilisé lors de ce travail, ainsi que la description des différentes techniques de caractérisation des nanomatériaux en suspension colloïdales ou en couches minces. Il s'agit des techniques d'analyses microscopiques, spectroscopiques, structurale et thermique.

Le troisième chapitre est consacré à l'élaboration des nanoparticules et les nanocouches de ZnO, CuO et TiO₂. De même, les résultats de caractérisation de ces produits par les différentes techniques exposées dans le chapitre 2, seront présentés dans ce chapitre.

Le quatrième est dernier chapitre englobe les résultats obtenus sur l'étude de l'activité antibactérienne pour les trois oxydes métalliques choisis. Cette étude est réalisée à différentes concentrations en nanoparticules. Une analyse portant sur l'effet cytotoxique de ces nanoparticules est également présentée.

Enfin, la conclusion générale de ce manuscrit apporte un récapitulatif global sur l'ensemble des résultats obtenus dans cette étude, et dégage les principales perspectives ouvertes par nos aboutissements.

Chapitre 1 : Etude bibliographique

2 Etude bibliographique

2.1 Contexte clinique

Les infections bactériennes sont une cause majeure d'infections chroniques et de mortalité. Les antiseptiques et les désinfectants (biocides) sont largement utilisés pour contrôler les infections en milieu hospitalier. Leur activité dépend de plusieurs facteurs ; la concentration, le temps du contact, le pH, la température, le type, la nature et le nombre de microorganismes à inactiver.

Les réactions des bactéries aux antiseptiques et aux désinfectants varient considérablement. Les spores bactériennes sont les moins sensibles comme le montre la figure 1, suivies par les mycobactéries, puis par les bactéries à Gram négatif, notamment les *Pseudomonaceae*. Les cocci à Gram positif, y compris les staphylocoques résistants aux antibiotiques, sont facilement inactivées par les désinfectants.

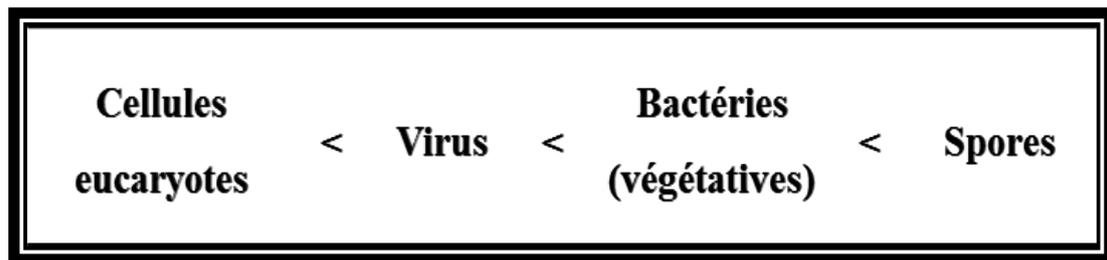


Figure 1: Niveau de résistance des microorganismes

Les méthodes employées à ce jour pour décontaminer les surfaces de l'équipement médical font appel à des produits chimiques hautement toxiques et aux hautes températures. Elles présentent cependant de sérieux inconvénients.

Pour se débarrasser d'un agent pathogène en utilisant des produits chimiques hautement toxiques, on nettoie et désinfecte les instruments dans des mélanges chimiques durant environ une minute. Les instruments sont ensuite rincés dans de l'eau distillée pendant environ une heure pour éliminer les traces des produits toxiques. Il s'agit d'un traitement très long, qui consomme non seulement beaucoup d'énergie, mais qui produit également des quantités de déchets, puisqu'il faut ensuite éliminer les produits chimiques.

Dans les procédures faisant intervenir de hautes températures, il peut arriver que les instruments ou équipements médicaux soient endommagés. Les polymères comme ceux que l'on trouve dans les implants ne peuvent être exposés à une chaleur importante ni à des produits chimiques toxiques et agressifs, car le plastique se dissoudrait.

Comme les matériaux utilisés pour la fabrication de dispositifs médicaux sont de plus en plus sensibles à la chaleur, il n'est pas possible d'utiliser une seule méthode de stérilisation pour tous les matériaux et toutes les applications. En parallèle, les formes complexes des objets à stériliser, comme par exemple des indentations ou des ouvertures étroites, exigent des méthodes qui agissent efficacement dans tous les recoins.

2.1.1 Résistance des bactéries

La résistance antimicrobienne est un terme plus large englobant la résistance aux biocides qui traitent les agents pathogènes, tels que les parasites (le paludisme ou les helminthes), les virus (le VIH) et les champignons (*Candida*). La résistance est souvent intrinsèque, mais elle peut être acquise par mutation ou par acquisition d'éléments génétiques. La rotation des désinfectants est pratiquée dans plusieurs hôpitaux, mais le problème reste controversé, même si les isolats hospitaliers sont souvent plus résistants aux biocides que les souches de laboratoire ou « standard ».

Les bactéries ont la capacité de s'adapter rapidement aux nouvelles conditions environnementales et peuvent survivre à l'exposition aux antimicrobiens en utilisant une batterie de mécanismes de résistance. La fréquence de la résistance antimicrobienne chez les bactéries a augmenté parallèlement à l'utilisation croissante de composés antimicrobiens. Des prescriptions erronées, les faibles processus de prévention et de contrôle des infections encouragent également le développement et la propagation de la pharmaco-résistance. La résistance bactérienne à différents types de biocides n'a été rapportée et est caractérisée que relativement récemment par rapport à la résistance aux antibiotiques [17,18].

Dans le secteur de la santé, la résistance bactérienne aux biocides a longtemps été rapportée avec des composés tels que la chlorhexidine, les composés d'ammonium quaternaire, le bisphénol, le triclosan, l'iodophore, les parabènes et des biocides plus réactifs

tels que le glutaraldéhyde et les peroxygènes [19]. Dans une étude récente, Smith et Hunter ont rapporté que, bien que les biocides puissent être efficaces contre des populations de bactéries planctoniques, tels que *Staphylococcus aureus* (SARM) résistant à la méticilline et *Pseudomonas aeruginosa*, certains biocides actuellement utilisés dans les hôpitaux sont inefficaces contre les pathogènes nosocomiaux se développant sous forme de biofilms et empêchent ainsi de contrôler ce réservoir d'infections nosocomiales. Cependant, la plupart des preuves de la résistance bactérienne aux biocides proviennent d'expériences menées en laboratoire, qui ont étudié un large éventail d'agents tels que : les biocides cationiques, les isothiazolones, les composés phénoliques, le peroxyde d'hydrogène, l'acide peracétique et d'autres composé [20-23].

Les mécanismes de résistance ont été définis de manière empirique comme intrinsèques ou acquises. La résistance intrinsèque est une propriété naturelle d'un microorganisme et elle a été décrite dans la littérature [19,24-26]. Elle englobe les propriétés de la paroi cellulaire chez les mycobactéries [27,28] et la membrane externe des bactéries à Gram négatif qui agissent comme une barrière d'imperméabilité [29-31]. Même le peptidoglycane de la paroi cellulaire peut servir de barrière à certaines bactéries à Gram négatif telles que *Klebsiella aerogenes*, *Proteus mirabilis* et *Pseudomonas aeruginosa* [26]. La perte ou l'altération de porines peut entraver la diffusion des biocides à travers l'enveloppe de la cellule [32,33]. L'hydrophobie globale des cellules est une propriété importante de la cellule bactérienne et l'altération de cette hydrophobicité de surface altère la réponse bactérienne aux biocides [34]. Il est également apparu récemment que le potentiel de charge à la surface des cellules, notamment le point isoélectrique, pouvait être impliqué dans la résistance bactérienne observée avec la réponse des mutants de *P.aeruginosa* à l'ammonium quaternaire [35]. La dégradation du biocide et la présence de système de flux sont d'autres mécanismes intrinsèques. Il est peu probable que la concentration de biocides soit utilisée, bien qu'ils soient plus probablement impliqués dans les mécanismes de stratégie de survie globale disponibles pour les bactéries résistantes. En effet, il est de plus en plus évident qu'une combinaison de mécanismes permet la survie des bactéries. Par exemple, Gomez Escalada et al. [36] ont observé qu'une combinaison d'imperméabilité à la membrane et d'efflux était probablement responsable de la résistance accrue des isolats d'*Escherichia coli* au triclosan.

La résistance acquise est l'acquisition d'une nouvelle propriété par les microorganismes, par mutation, mais également par transfert de gènes conférant une résistance (comme le flux et la dégradation) [37-39]. Une telle résistance acquise pourrait ne pas être stable [19,26]. Les définitions de la résistance intrinsèque et acquise ne sont pas toujours claires, à moins que le mécanisme de résistance ne soit génétiquement identifié, il est difficile de déterminer si la résistance bactérienne est acquise ou non. L'ensemble des mécanismes de résistance des bactéries aux désinfectants sont représenté dans la figure 2.

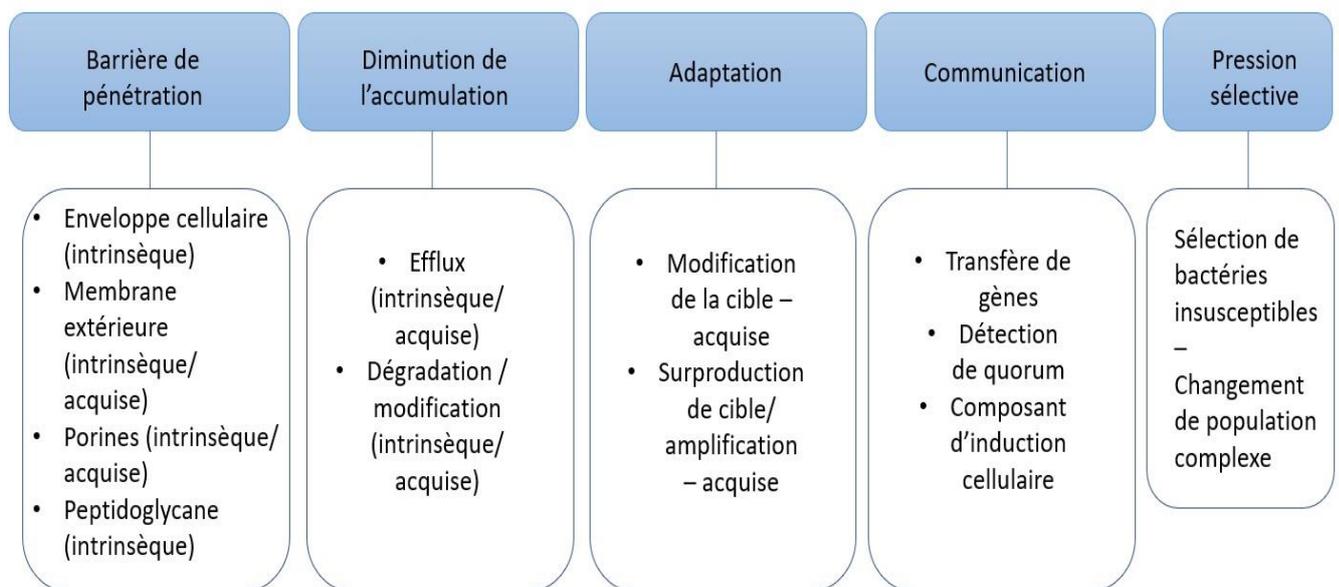


Figure 2 : Mécanismes de la résistance bactérienne aux désinfectants

L'illustration de cellules bactériennes devenant résistantes aux antibiotiques est présentée en figure 3. Cette résistance est acquise à partir du plasmide d'une cellule donneuse (unité circulaire de l'acide désoxyribonucléique, ADN), qui présente une résistance en haut à gauche (rouge / jaune, le rouge étant une résistance). La transmission virale implique qu'un virus (rose, en bas à gauche) obtient un gène résistant et le transmette à une cellule bactérienne qui l'intègre dans son plasmide. Les cellules bactériennes acquièrent également des segments d'ADN libérés par les cellules mortes (en haut à gauche). Des mutations peuvent également se produire, engendrant une résistante aux antibiotiques et permettre ainsi à la bactérie de survivre et de se reproduire



Figure 3: Illustration de la résistance bactérienne aux antibiotiques [40]

2.1.2 Infections nosocomiales

Les infections nosocomiales ou liées aux soins de santé apparaissent chez un patient sous soins médicaux à l'hôpital ou dans un autre établissement de soins et qui était absent au moment de l'admission [41]. Ces infections peuvent survenir au cours de la prestation de soins de santé pour d'autres maladies et même après le congé des patients. En outre, ils comprennent des infections professionnelles parmi le personnel médical. Les dispositifs invasifs tels que les cathéters et les ventilateurs utilisés dans les soins de santé modernes sont associés à ces infections. Sur cent patients hospitalisés, sept dans les pays développés et dix dans les pays en développement peuvent contracter l'une des infections associées aux soins de santé. Les populations en cause sont les patients des unités de soins intensifs (ICU), des unités de brûlures, des greffes d'organes et des nouveau-nés. Selon la prévalence étendue de l'infection dans l'étude de soins intensifs, la proportion de patients infectés au sein de l'institut atteint souvent 51%. D'après des études approfondies menées aux États-Unis et en Europe, la densité d'incidence des infections nosocomiales variait de 13 à 20,3 épisodes par millier de jours-patients. L'augmentation du nombre d'infections entraîne une augmentation des séjours prolongés à l'hôpital, une invalidité de longue durée, une résistance accrue aux antimicrobiens, une perturbation socioéconomique et un taux de mortalité important. Il existe des informations de réserve sur le fardeau des infections

nosocomiales en raison de systèmes de surveillance peu développés et de méthodes de contrôle inexistantes. Par exemple, lors du traitement d'autres maladies, de nombreux patients contractent probablement des infections respiratoires et il devient difficile de détecter la prévalence de toute infection nosocomiale dans le prolongement d'un établissement de soins primaires. Ces infections ne sont remarquées que lorsqu'elles deviennent épidémiques. Pourtant, aucune institution ni aucun pays ne peut prétendre avoir résolu ce problème endémique [42-44].

Les types d'infections les plus fréquents comprennent les infections de la circulation sanguine associées à la ligne centrale, les infections des voies urinaires associées au cathéter, les infections du site opératoire et la pneumonie associée à la ventilation. Les agents pathogènes responsables des infections nosocomiales sont les bactéries, les virus et les champignons microscopiques. Ces microorganismes varient en fonction de la population de patients, des installations médicales et même de l'environnement dans lequel les soins sont prodigués.

Les bactéries sont les agents pathogènes les plus courants responsables d'infections nosocomiales. Certains appartiennent à la flore naturelle du patient et ne provoquent une infection que lorsqu'il est immunodéprimé. *Clostridium difficile* provoque une inflammation du côlon, entraînant une diarrhée et une colite associées aux antibiotiques, principalement en raison de l'élimination des bactéries bénéfiques et des bactéries pathogènes. Les *Enterobacteriaceae* (résistants au carbapénème) provoquent des infections par translocation depuis l'intestin ; où il se trouve habituellement. Les entérobactéries contiennent des espèces de *Klebsiella sp* et *Escherichia coli*. Leurs résistances élevées au carbapénème rendent la défense contre eux plus difficile. *S.aureus* résistant à la méticilline (SARM) se transmet par contact direct, plaies ouvertes et mains contaminées. Il provoque une septicémie, une pneumonie et une ISO (infection du site opératoire) en se déplaçant entre les organes ou de la circulation sanguine. Il est très résistant à la famille des antibiotiques appelés bêtalactamines [45,46]. La répartition des infections nosocomiales ainsi que le pourcentage de surfaces contaminées sont chiffrées dans la figure 4.

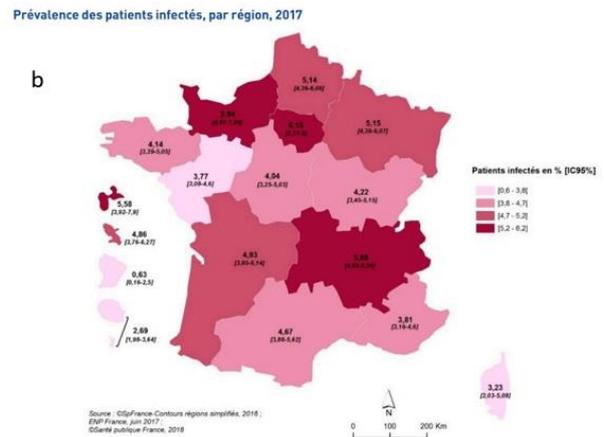
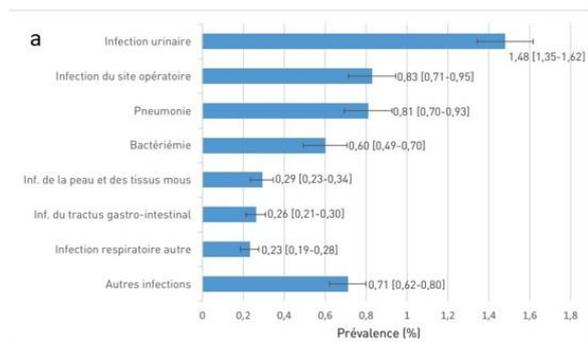


Figure 4 : (a) Prévalence des principaux sites d'infections nosocomiales, (b) prévalence des patients infectés par région en France en 2017 [47]

2.2 Les nanoparticules

2.2.1 Généralités

Les nanomatériaux se caractérisent en partie par leur taille minuscule, mesurée en nanomètres. Le nanomètre est un millionième de millimètre - environ 100 000 fois plus petit que le diamètre d'un cheveu humain.

Les nanoparticules existent dans la nature et peuvent être créées à partir de divers produits, tels que le carbone ou des minéraux tels que l'argent, mais les nanomatériaux doivent par définition avoir au moins une dimension inférieure à environ 100 nanomètres. La plupart des matériaux nanométriques sont trop petits pour être vus à l'œil nu et même avec les microscopes de laboratoire conventionnels.

Les matériaux développés à une si petite échelle sont souvent appelés nanomatériaux d'ingénierie, qui peuvent posséder des propriétés optiques, magnétiques, électriques et autres uniques.

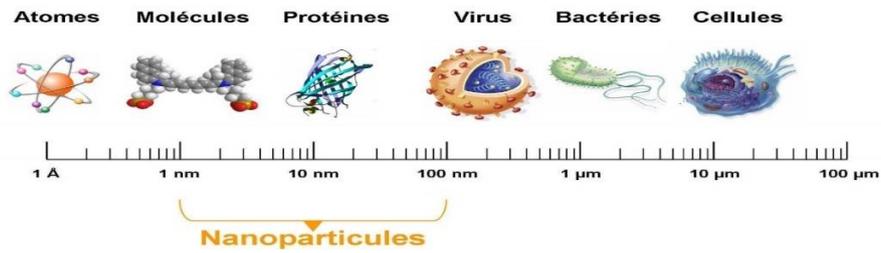


Figure 5: Gamme de tailles des nanoparticules comparée à celle des principales structures [48]

La petitesse des particules leur confère des propriétés très utiles [49]. La figure 5 illustre la gamme de tailles des nanoparticules comparée à celle des principales structures. Certaines de ces propriétés résultent de l'énorme augmentation de la surface lorsque, par exemple, un matériau en poudre est converti en particules de quelques nanomètres de diamètre. Cette augmentation de surface entraînera une augmentation du taux de réactions éventuelles à la surface du matériau. Les petites dimensions des nanomatériaux laissent également la possibilité de former des mélanges intimes avec d'autres matériaux en vue d'en améliorer leurs propriétés. Dans les traitements médicaux, ils peuvent être adaptés pour permettre de cibler plus précisément certains médicaments [50].

Ces propriétés émergentes peuvent avoir un impact important sur l'électronique, la médecine et d'autres domaines. Certains nanomatériaux peuvent être d'origine naturelle, tels que les protéines sanguines essentielles à la vie et les lipides présents dans le sang et la graisse corporelle [51]. Cependant, les scientifiques s'intéressent particulièrement aux nanomatériaux d'ingénierie, conçus pour être utilisés dans de nombreux matériaux et dispositifs. Déjà, des milliers de produits courants, tels que les écrans solaires, les cosmétiques, les articles de sport, les vêtements résistant aux taches, les pneus et les appareils électroniques sont fabriqués avec des nanomatériaux. Ils interviennent également dans le diagnostic médical, l'imagerie, l'administration de médicaments et l'assainissement de l'environnement [52-54].

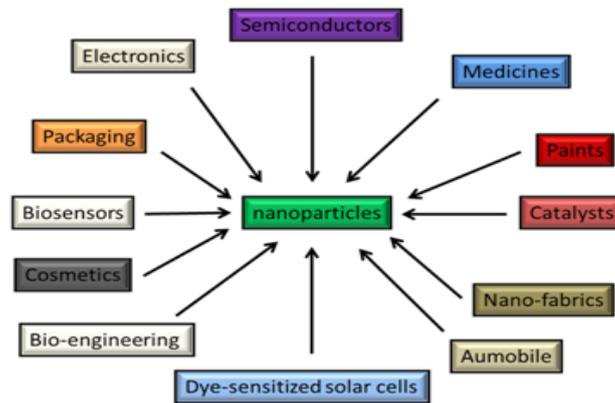


Figure 6: Domaines d'applications des nanoparticules [55]

La nanotechnologie aura un impact énorme sur les industries de la santé et des soins personnels, en raison des dimensions extrêmement réduites des nanoparticules et de leur mobilité. Le taux de réactivité chimique, l'emplacement de l'effet et le moment du traitement dépendent tous de la taille des particules. L'administration efficace de médicaments est déjà testée. Des dispositifs microélectromécaniques biologiques (bioMEMS) implantés dans le corps pour administrer des doses de médicaments ou transporter de nouvelles cellules vers des tissus endommagés donnent vie au concept de nanochirurgie [56]. Dans le domaine de l'imagerie biomédicale, l'utilisation de nanoparticules en tant qu'améliorateurs d'image est en cours de développement [57]. Les sondes d'imagerie et les revêtements d'implant peuvent être insérés dans le corps humain avec des tailles de particules comprises entre 2 et 10 nm. Les propriétés magnétiques améliorées des nanoparticules d'oxyde de fer (III) les rendent aptes à être utilisées comme agents de contraste en imagerie par résonance magnétique (IRM) [58]. Dans l'étude et le traitement médical des cancers, les nanopORTEURS peuvent être utilisés pour administrer des agents d'imagerie aux cellules cancéreuses, ce qui facilite la localisation précise des cellules cancéreuses et rend le traitement beaucoup plus efficace [50-61]. La figure 6 illustre les différents domaines d'applications des nanoparticules.

2.2.2 Voies de synthèses des nanoparticules

D'une manière générale, il existe dans la littérature deux types d'approches (figure 7) pour les procédés de synthèse d'oxydes de métaux nanostructurés (couches minces, nanofils, nanoparticules ...) [62].

- Les méthodes physiques : sont des méthodes dites « **Top-Down** », car elles partent généralement du matériau massif pour aller vers les plus petites tailles. Les particules ainsi synthétisées présentent généralement une grande disparité en taille et en forme.
- Les méthodes chimiques : quant à elles, sont dites « **Bottom-Up** », car elles partent de molécules et utilisent les atomes métalliques comme des briques de construction des particules. Elles sont assez variées, généralement faciles à mettre en œuvre, moins coûteuses et offrent un large éventail de paramètres permettant généralement un bon contrôle morphologique.

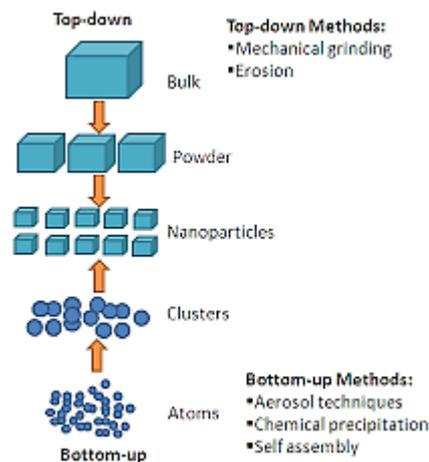


Figure 7: Approches physique/chimique d'élaborations des nanoparticules [63]

Il existe trois grandes voies pour la synthèse des nanoparticules : physiques, chimiques et biologiques [64]. Ils sont représentés dans la figure 8.

- **Les voies physiques** : Parmi les méthodes utilisées pour les produire figurent le dépôt physique et chimique en phase vapeur. En dépôt physique en phase vapeur (PVD), le matériau est vaporisé à la chaleur dans un four ou au moyen de lasers à impulsions. La vapeur est ensuite condensée sur une surface froide. Par exemple, des nanotubes de carbone à paroi unique peuvent être préparés en vaporisant une cible de carbone dans un four à environ 1500 K à l'aide d'un laser et en laissant la vapeur se condenser sur une surface froide. Un gaz inerte est injecté dans le réacteur pendant le processus pour empêcher l'oxydation de la vapeur de carbone. Dans le dépôt chimique en phase vapeur (CVD), une réaction se produit dans la phase vapeur entre deux matériaux ou plus et / ou la vapeur réagit avec le matériau cible.
- **Les voies chimiques** : elles ont l'avantage d'être simple, peu coûteuse en termes d'instrumentations avec des températures de synthèse assez basse (<350°C) et présente la possibilité de dopages d'atomes ou ions étrangers lors de la synthèse. Ce sont des méthodes facilement industrialisables ; une grande quantité des matériaux peut être obtenus à différentes tailles et formes. Enfin, ce type de méthode permet l'autoassemblage ou la structuration. Introduire le sol gel ici
- **Les voies biologiques** : Elles reposent sur l'utilisation de microorganismes tels que les champignons, bactéries ou actinomycètes (procaryotes), l'utilisation d'extraits de plantes ou d'enzymes et l'utilisation de matrices telles que l'ADN, les membranes, les virus et les diatomées.

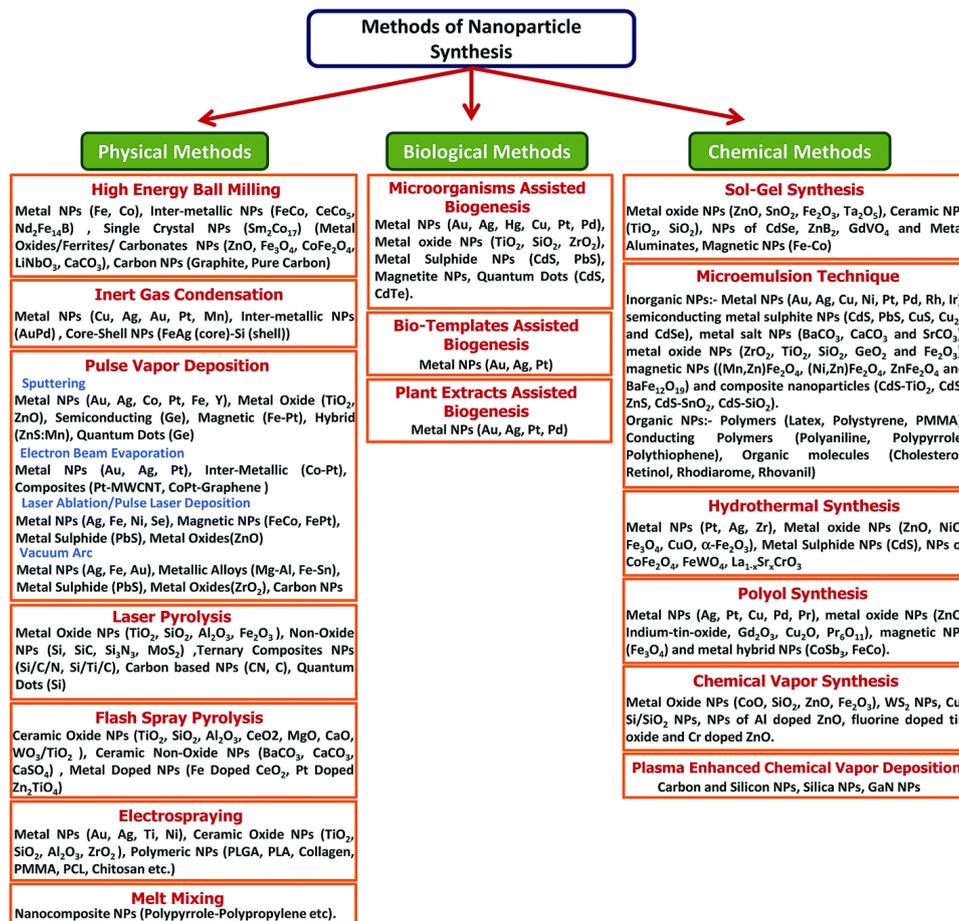
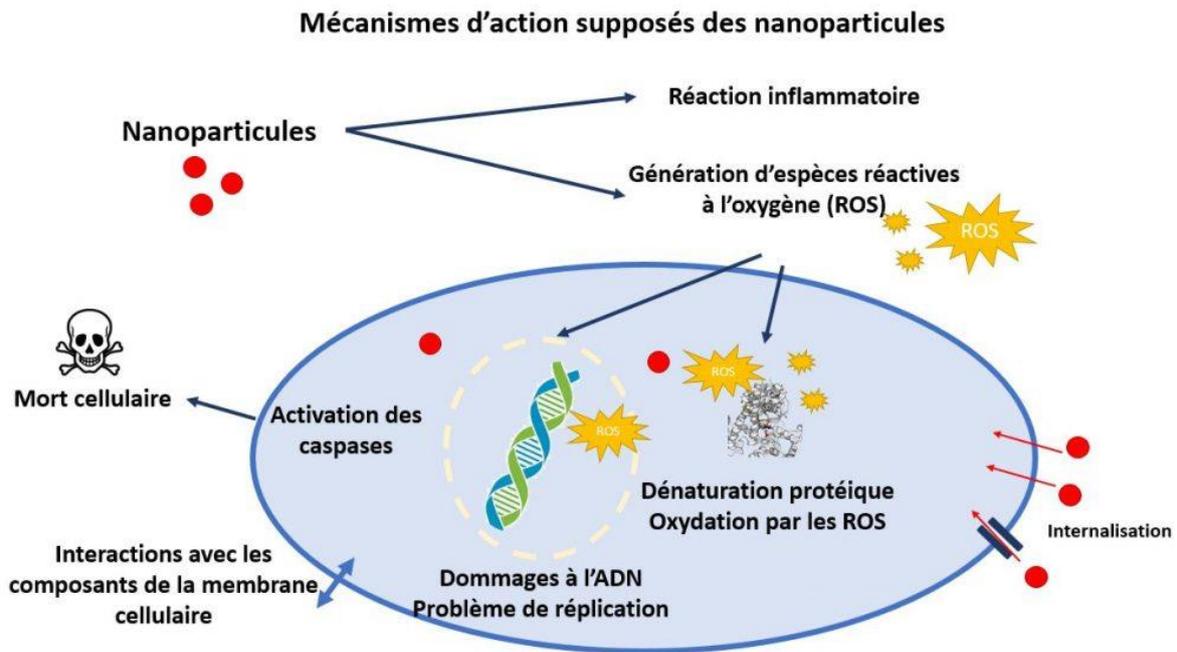


Figure 8 : Les principales voies de synthèse des nanoparticules [65]

2.2.3 L'activité antibactérienne des nanoparticules

Les nanomatériaux en tant qu'antibactériens sont très prometteurs et suscitent un grand intérêt car ils pourraient combler les lacunes là où les désinfectants par exemple ont une activité limitée. Cela inclut la lutte contre les mutants multirésistants et les biofilms [66,67]. Les nanomatériaux (NM) antimicrobiens actuellement utilisés (c'est-à-dire les métaux, les oxydes métalliques (Au, Ag et les nanoparticules organiques) présentent une diversité de propriétés de composition chimique intrinsèques et modifiées. Ainsi, il n'est pas surprenant qu'ils aient de nombreux modes d'action (figure 9).



www.quoidansmonassiette.fr

Figure 9 : Mécanismes d'action supposés des nanoparticules [68]

De plus, les bactéries cibles varient considérablement dans leur génétique et par conséquent dans la structure de leur paroi cellulaire, leurs voies métaboliques essentielles et dans de nombreux composants qui, une fois perturbés, pourraient être entraînés à une mortalité des micro-organismes. En outre, l'état physiologique de la bactérie, c'est-à-dire la forme planctonique, le biofilm, le taux de croissance, peut grandement contribuer à la sensibilité des bactéries aux NPs [69,70]. Dans certains cas, le rapport entre les bactéries et les NPs est essentiel à la toxicité de ces dernières. En outre, de nombreux facteurs environnementaux jouent un rôle et ont une incidence sur la létalité des NPs sur les bactéries, notamment le pH et la température. Les propriétés physicochimiques des particules, notamment leur taille, leur forme, et leur mélange dans divers rapports avec d'autres nanoparticules et solvant utilisés, affectent grandement leur activité antibactérienne [71]. Ainsi, avec cette complexité, il n'est pas étonnant que de grandes parties du mode d'action antibactérien et du niveau de risque qu'elles posent soient encore obscures et que l'on trouve dans la littérature des articles contradictoires [72,73].

2.2.3.1 Les mécanismes d'actions des nanoparticules

Le mécanisme létal des nanoparticules métalliques est toujours en discussion, mais trois mécanismes principaux sont supposés, à savoir ; premièrement, la formation d'espèces

oxydantes réactives (ROS), deuxièmement, le processus de libération des ions, et, enfin, l'interaction des NP avec la membrane cellulaire. Les NP métalliques comparés à leurs sels ont un potentiel accru de lutte contre les infections bactériennes [74-77]. La taille des NPs influence principalement le mécanisme antibactérien [12,78].

2.2.3.1.1 Contact avec la paroi

La première étape du mécanisme antibactérien est constituée par les ions métalliques de la gamme nanométrique qui parviennent à la cellule via une protéine transmembranaire. Après fixation aux cellules bactériennes, on constate la production de changements structurels dans la membrane cellulaire et un blocage des canaux de transport [79], le processus entier dépend de la taille. Les petites NPs sont plus efficaces, tandis que les NPs plus grandes ont une surface absolue supérieure permettant une meilleure propriété d'adhérence des forces de Van der Waals. Ensuite, les NPs peuvent être internalisées, produire une ionisation à l'intérieur de la cellule et endommager les structures intracellulaires, entraînant la mort cellulaire [80].

2.2.3.1.2 Génération des espèces oxydantes réactives (ROS)

La production d'espèces oxydantes réactives (ROS) par les NPs métalliques joue un rôle important dans leur efficacité antibactérienne. Les ROS sont constitués d'oxydants à vie courte, tels que les radicaux superoxydes ($O_2^{\cdot-}$), le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2), les radicaux hydroxyles (OH^{\cdot}) et l'oxygène singulet (O_2^{\cdot}) [81,82]. En raison de la haute réactivité de ces espèces, les ROS peuvent endommager le peptidoglycane et les membranes cellulaires, l'ADN, l'ARNm, les ribosomes et les protéines [83]. Les ROS peuvent également inhiber la transcription, la traduction, l'activité enzymatique et la chaîne de transport d'électrons. Certains NPs d'oxydes métalliques reposent sur la génération de ROS en tant que mécanisme principal de toxicité [72,84].

2.2.3.1.3 L'inactivation des protéines et destruction de l'ADN

Les atomes de métaux ont tendance à se lier au groupe thiol des enzymes et à désactiver ensuite la fonction des enzymes. Il est également suggéré que des ions métalliques se fixent entre les paires de bases pyrimidine et purine, perturbant ainsi la liaison de l'hydrogène entre deux brins antiparallèles et détruisant la molécule d'ADN. Bien que cela doive être approfondi, il est constaté que les ions métalliques ont tendance à se fixer à l'ADN, une fois qu'ils pénètrent dans la cellule [85,86].

2.2.3.2 Les facteurs influençant l'activité antibactérienne

Les propriétés physicochimiques des nanoparticules incluent leur taille, leur charge, leur potentiel zêta, leur morphologie de surface et leur structure cristalline, qui sont des éléments importants qui régulent les actions des nanoparticules sur les cellules bactériennes. De plus, les conditions environnementales, la souche bactérienne et le temps d'exposition sont d'autres facteurs importants qui influencent les effets antibactériens des nanoparticules [87]. De nombreuses données ont également montré qu'une grande surface spécifique, une énergie de surface élevée et un déficit en ligand atomique conduisent à l'agrégation des nanoparticules d'oxydes métalliques. Par conséquent, il est important de discuter des principaux facteurs influençant l'activité antibactérienne des nanoparticules d'oxydes métalliques.

2.2.3.2.1 La Taille

L'adhésion bactérienne est un processus bien connu dans la formation de biofilms bactériens qui rend les organismes individuels beaucoup plus résistants ou invulnérables aux antibiotiques conventionnels. Les recherches actuelles ont montré que la taille des nanoparticules métalliques peut grandement affecter son activité antibactérienne. Le diamètre et la longueur des nanotubes ont été ajustés à l'aide du paramètre du processus d'oxydation anodique, qui permet de prolonger la libération du médicament contre *S.aureus*. Lors de l'évaluation de l'activité antibactérienne, il convient de prêter plus d'attention aux caractéristiques des nanoparticules [88]. Une étude a démontré l'effet synergique des nanotubes de TiO_2 et des nanoparticules de silice sur l'activité antibactérienne de films composite, l'étendue et le mécanisme d'action antibactérien [89]. Les nanoparticules plus petites ont des surfaces spécifiques plus grandes, ce qui entraîne une probabilité plus élevée d'être en contact avec la membrane cellulaire bactérienne et de passer à travers celle-ci [90]. Cependant des nanoparticules de $Mg(OH)_2$ ont été analysés et les plus petites nanoparticules ont eu l'effet antibactérien le plus faible. Ainsi, l'effet de taille n'est pas le facteur dominant. Il convient donc d'accorder une attention particulière aux autres propriétés physicochimiques des nanoparticules lors de l'exploration de leurs mécanismes antibactériens [91].

2.2.3.2.2 La forme

La forme est un facteur important lié à l'activité antimicrobienne. Des interactions avec les enzymes périsplasmiques peuvent provoquer des lésions de cellules bactériennes à des degrés divers avec des nanoparticules [92]. Une comparaison des nanoparticules de ZnO en forme de pyramide, de plaque et de sphère a montré que la combinaison de β -galactosidase (GAL) et de spécifique à la forme de ZnO. Les nanoparticules ont produit une activité photocatalytique via l'obstruction et la restructuration de l'enzyme. Il a également été démontré que le ZnO en forme de pyramide empêche la dégradation des enzymes [93].

Les nanoparticules d'argent ont d'abord été appliqués dans le domaine de la biomédecine en tant qu'agents bactéricides à libération prolongée. Les nanoparticules d'argent en forme de cube présentent une activité antibactérienne plus forte que les nanoparticules d'argent sous forme de sphère et de fil ayant un diamètre similaire, ce qui semble indiquer que l'effet de forme sur l'activité antibactérienne est dû à la surface spécifique et à la réactivité de facettes [94]. La forme des nanoparticules d'Ag, n'a pas d'effet sur la sensibilité vis-à-vis des microorganismes [95,96].

2.2.3.2.3 La rugosité

Contrairement aux recherches approfondies sur les effets de différentes caractéristiques des nanoparticules sur les cellules bactériennes, peu d'études ont porté sur l'effet de la rugosité. Lorsque la rugosité des nanoparticules augmente, la taille et le rapport surface/masse favorisent l'adsorption des protéines bactériennes, ce qui entraîne une réduction de l'adhérence bactérienne [97,98].

2.2.3.2.4 Le potentiel Zeta

Des études récentes ont démontré que le potentiel zêta des nanoparticules avait une forte influence sur l'adhésion bactérienne. En raison de l'attraction électrostatique entre les nanoparticules chargées positivement et la membrane de la cellule bactérienne, chargée négativement. Les nanoparticules, qui ont une charge de surface positive, sont susceptibles de s'adsorber sur la surface bactérienne et sont étroitement liés aux bactéries, contrairement à leurs homologues chargés négativement [99,100]. Le potentiel des nanoparticules à se rassembler sélectivement sur les sites d'infection bactérienne augmente la perméabilité vasculaire (dans le cas de l'administration médicamenteuses) [101].

L'accumulation des nanoparticules cationiques est bénéfique pour inhiber la croissance bactérienne en limitant l'attachement bactérien. La faible pénétration des nanoparticules dans les régions extérieures de l'enveloppe de *S.aureus* confère en quelque sorte une efficacité germicide élevée, probablement parce que les nanoparticules peuvent atteindre des structures clés par échange d'ions [102].

Comparés aux nanoparticules chargées négativement et neutres, on pense que leurs homologues chargés positivement améliorent la production des ROS. Une étude récente a montré que les nanoparticules chargées négativement n'adhèrent pas aux bactéries en raison de leur potentiel négatif. Cependant, à des concentrations plus élevées, les nanoparticules chargées négativement ont un certain niveau d'activité antibactérienne en raison de leur encombrement moléculaire, ce qui entraîne des interactions entre les nanoparticules et la surface bactérienne [103].

2.2.3.2.5 L'environnement

Diverses études ont montré que différentes conditions environnementales entraînent des différences significatives d'activité antimicrobienne. Par exemple, la température de l'environnement influe fortement sur l'activité antibactérienne en raison de son effet sur le taux de génération de ROS. Lorsque les nanoparticules de ZnO sont stimulées par la température, les électrons sont capturés sur les sites actifs. Ensuite, les électrons interagissent avec l'oxygène O₂ pour produire des ROS, renforçant ainsi l'efficacité antimicrobienne des nanoparticules de ZnO. De plus, le pH de l'environnement influence l'activité antimicrobienne in vitro. Une diminution de ce dernier augmente la vitesse de dissolution des nanoparticules de ZnO, ce qui se traduit par de meilleures propriétés antimicrobiennes [104].

Les caractéristiques du milieu, telles que le pH et la pression osmotique, peuvent influencer sur l'agrégation, la charge de surface et la solubilité des nanoparticules. Des tests antibactériens des nanoparticules de ZnO dans cinq types de milieu ont montré que l'activité antimicrobienne de ces nanoparticules est principalement due aux ions Zn libres (Zn²⁺) et aux complexes de zinc. En outre, le milieu peut fournir des nutriments aux bactéries pour améliorer leur tolérance aux nanoparticules due à un effet matrice qui permet de piéger les nanoparticules [105].

2.2.3.3 Les nanoparticules inorganiques

Les métaux ont été utilisés comme agents antimicrobiens pendant des milliers d'années. Ils remontent à 1125 av. J.-C. En effet les Égyptiens utilisaient des sels de cuivre comme astringent [106]. Les Indiens, les Égyptiens, les rois persans, les Phéniciens, les Grecs et les Romains employaient également le cuivre, de l'argent pour préserver les aliments et désinfecter l'eau [107,108]. Plus récemment, l'argent a été utilisé comme fil de suture et comme agent de prévention des infections [109]. Les propriétés antimicrobiennes des métaux ont été utilisées dans diverses applications au cours de l'histoire, mais son utilisation dans les applications médicales a rapidement diminué à la découverte des antibiotiques en 1920 [106].

Face aux préoccupations croissantes suscitées par les souches bactériennes résistantes et les infections associées aux biofilms, il existe un besoin clinique de disposer d'un traitement antibactérien efficace à long terme et d'un traitement préventif des biofilms. Étant donné l'utilisation des métaux à travers l'histoire, ces matériaux ont fait l'objet de nombreuses études en tant qu'agents antimicrobiens. Les métaux sont capables d'inhiber sélectivement les voies métaboliques [110,111], d'interagir avec l'activité bactéricide [112] et de tuer les bactéries multirésistantes [113,114]. Comme les antibiotiques, les composés métalliques peuvent discerner les cibles bactériennes et cellules mammifères, car leurs systèmes de transport de métaux et métalloprotéines divergents [106]. Cette différence autorise l'utilisation de métaux comme matériau antibactérien efficace à long terme et pour la prévention des biofilms. Pour comprendre l'utilisation des métaux en tant qu'agent antimicrobien, une récente recherche bibliographique réalisée par ISI Web of Science (février 2018) a montré l'intérêt croissant pour l'étude des agents antimicrobiens, en particulier de l'utilisation de métaux, de médicaments et de leurs combinaisons.

L'activité antimicrobienne de métaux tels que l'argent (Ag), le cuivre (Cu), l'or (Au), le titane (Ti) et le zinc (Zn), chacun ayant des propriétés, des puissances et des spectres d'activité variés, est connue et appliquée depuis des siècles. Récemment, la nanotechnologie a offert de grandes possibilités dans divers domaines de la science et de la technologie. Plusieurs types de nanoparticules et leurs dérivés ont fait l'objet d'une grande attention pour leurs

effets antimicrobiens potentiels. Les nanoparticules métalliques telles que l'argent Ag, oxyde d'argent (Ag_2O), dioxyde de titane (TiO_2), l'or (Au), oxyde de calcium (CaO), silicium (Si), oxyde de zinc (ZnO), oxyde de cuivre (CuO) et oxyde de magnésium (MgO) ont été identifiées comme présentant une activité antimicrobienne. Des études in vitro ont révélé que des nanoparticules métalliques inhibaient plusieurs espèces microbiennes. Le type de matériaux utilisés pour préparer les nanoparticules ainsi que la taille des particules étaient deux paramètres importants qui ont affecté l'efficacité antimicrobienne résultante [12,78].

2.2.4 La classification des nanomatériaux

Les nanomatériaux ont une taille extrêmement petite qui a au moins une dimension de 100 nm ou moins. Les nanomatériaux peuvent être à l'échelle nanométrique dans une dimension (films de surface), deux dimensions (fils) ou trois dimensions (particules) (figure 10). Ils peuvent exister sous des formes simples, fondues, agrégées ou agglomérées de formes sphériques, tubulaires et irrégulières. Les types courants de nanomatériaux comprennent les nanotubes, les dendrimères, les points quantiques et les fullerènes. Les nanomatériaux ont des applications dans les domaines de la nanotechnologie et présentent des caractéristiques chimiques physiques différentes de celles des produits chimiques normaux (à savoir, nano argent, nanotube de carbone, fullerène, photocatalyseur, nano carbone, silice). Selon Richard W. Siegel, les matériaux de nanostructures sont classés dans les nanostructures à une dimension, à deux dimensions et à trois dimensions. Les nanomatériaux sont des matériaux caractérisés par une taille de grain ultra fine (<50 nm) ou par une dimensionnalité limitée à 50 nm. Les nanomatériaux peuvent être créés avec différentes dimensionalités de modulation définies par Richard W. Siegel : zéro (grappes atomiques, filaments et assemblages de grappes), une (multicouches), deux (couches superposées à grain ultrafin ou couches enterrées) et trois (matériaux nano phasés grains équiaxes de taille nanométrique) [115].

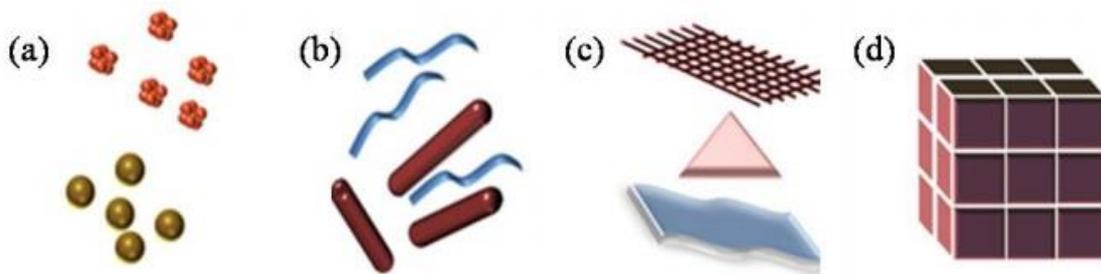


Figure 10: Classifications des nanomatériaux (a) 0D sphères et clusters, (b) 1D nanofibres, fils et tiges, (c) 2D filmes, plates, et réseaux, (d) 3D nanomatériaux [116]

2.3 L'oxyde de zinc

L'oxyde de zinc est composé inorganique de formule ZnO . C'est une poudre blanche insoluble dans l'eau, largement utilisée comme additif dans de nombreux matériaux et produits tels que les caoutchoucs, plastiques, céramiques, verre, ciment, peintures et batteries. On retrouve l'oxyde de zinc naturellement sous forme de zincite minérale (coloration jaune à rouge) comportant souvent du manganèse, mais il est en grande partie produit synthétiquement. Il est également largement utilisé pour traiter une variété d'autres affections cutanées dans des produits tels que le talc pour bébé et les crèmes protectrices pour traiter les éruptions cutanées, la crème de calamine, les shampooings antipelliculaires et les onguents antiseptiques.

2.3.1 Structure de l'oxyde de zinc

Il existe trois structures cristallines de ZnO : la wurtzite hexagonale, la structure cubique zinc-blende et un sel gemme cubique rarement observé (type $NaCl$) comme le montre la figure 11. Dans les conditions normales, la structure la plus thermodynamiquement stable est la forme wurtzite. La structure zinc-blende est métastable et ne peut être stabilisée que par croissance épitaxiale sur des substrats cubiques alors que la structure cubique sel-sel n'est habituellement stable que sous une pression extrême (~ 2 GPa). [117-118].

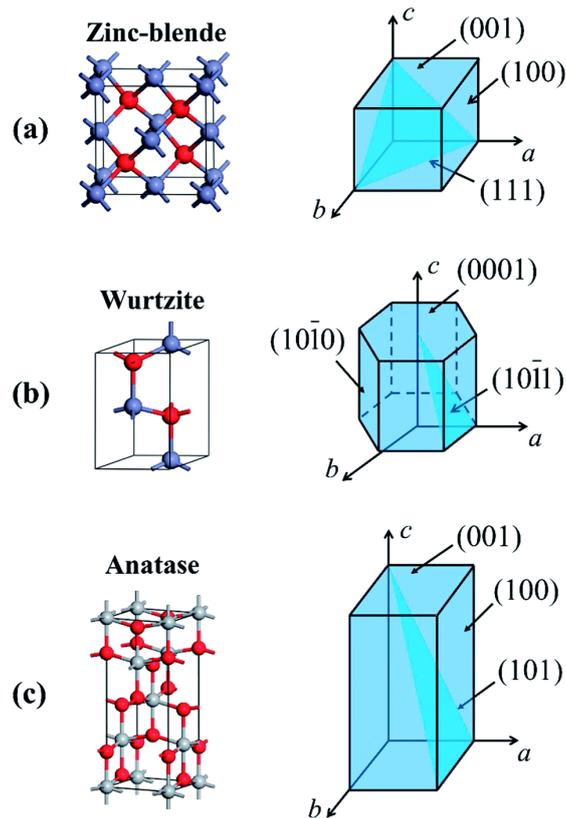


Figure 11: Différentes structures de l'oxyde de Zinc [119]

2.3.2 Propriétés de l'oxyde de zinc

En fonction de l'utilisation finale ZnO, peut être considéré comme un produit chimique vrac ou comme un semi-conducteur spécialisé. Il a des propriétés optiques, électriques et thermiques spécifiques qui sont attrayantes pour une gamme d'applications très diverses. Par exemple, son indice de réfraction élevé (1.95-2.10) est utile dans les applications de pigments, il peut être un conducteur électrique lorsqu'il est convenablement dopé et il est thermiquement stable à des températures extrêmement élevées (avoisinant les 1800°C). Les propriétés physiques et chimiques de la poudre de ZnO garantissent une large prise en tant qu'additif dans le caoutchouc. Également, la grande surface spécifique des qualités « actives » permet de l'utiliser dans le processus de désulfuration des usines chimiques. En tant que semi-conducteur, ZnO a des applications en optoélectronique et en films conducteurs transparents. [120-122].

2.3.3 Les applications de l'oxyde de zinc

Les utilisations de ZnO ont considérablement changé avec le temps. Certaines grandes utilisations, comme pour les papiers de photocopie comme ingrédient photoconducteur (qui était le deuxième plus gros volume consommé en 1970) et dans le linoléum ont presque disparu [123]. Également ZnO n'est plus le principal pigment blanc dans la peinture. Aujourd'hui, ses principales utilisations sont notées dans l'industrie du caoutchouc, suivie par la céramique, mais il a de nombreuses applications de niche comme, par exemple, dans les fluides de forage pour l'industrie pétrolière et gazière. Plus récemment, ZnO est en cours d'investigation pour des applications telles que les LED, transparentes transistors, cellules solaires et dispositifs de mémoire et à la base d'un oxyde conducteur transparent pour dispositifs grand public.

2.3.4 Les propriétés antibactériennes

Les nanoparticules bactéricides à large spectre sont des nanoparticules à base de ZnO [124]. Il a été démontré que les nanoparticules de ZnO avaient une large gamme d'activités antimicrobiennes contre divers micro-organismes, ce qui dépendait de manière significative de la concentration et de la taille des particules choisies [124]. De plus, il a été démontré que les nanoparticules de ZnO inhibent la croissance des souches de *S. aureus* sensibles à la méthicilline (MSSA), de *S. aureus* résistant à la méthicilline (MRSA) et de *S. epidermidis* résistant à la méthicilline (MRSE) et se sont révélées être des agents bactéricides efficaces [125,126]. L'oxyde de zinc (ZnO) NM a un coût relativement bas [127] et sa dépendance en taille est efficace [124] par rapport à un large éventail de bactéries [128,129]. Ceux-ci comprennent des agents pathogènes comme *Klebsiella* (agent de la pneumonie) [130], *Listeria monocytogenes*, *Salmonella enteritidis* [131], *Streptococcus mutans*, *Lactobacillus* [132] et *E. coli* [131,133] présentant une faible toxicité pour les cellules humaines [134]. Leur couleur blanche, leur capacité à bloquer les rayons UV et celle d'empêcher la formation de biofilms les rendent adaptés aux industries du tissu [135] et du verre [136] en tant que matériaux de revêtement destinés aux dispositifs médicaux et autres. En outre, le traitement au zinc a été approuvé par la FDA et de nos jours, le Zn est disponible comme additif alimentaire [137].

Les NMs de ZnO affectent les cellules bactériennes le long des deux voies décrites ci-dessus, en se liant aux membranes, en perturbant leur potentiel et leur intégrité, et en induisant la production de ROS [131, 133, 138].

La fixation des NPs sur la membrane bactérienne est une première étape vitale pour les mécanismes antibactériens du ZnO. Cependant, la méthode de fixation des NPs ZnO à la membrane bactérienne n'est pas complètement comprise. Actuellement, le consensus d'interaction résulte des forces électrostatiques entre les NPs de ZnO et la membrane bactérienne. Une fois que les NPs ZnO se fixent à la membrane bactérienne, des "piqûres" se produisent dans la membrane en raison de la formation de ROS, qui endommagent fatalement la structure pariétale [131,133]. La ROS a été corrélée à la taille des particules, à la surface et à la cristallinité. Les propriétés antimicrobiennes du ZnO augmentent au fur et à mesure que la surface augmente et que la taille des particules et la cristallinité diminuent [139].

Le ZnO est un semi-conducteur à large bande interdite (3,37 eV), ce qui entraîne une sensibilité aux courtes longueurs d'onde [122]. Lors de l'exposition à la lumière, des paires électron-trou sont créées à la surface de ZnO. Ces trous fractionnent les molécules d'eau et entraînent la formation de ROS, en particulier OH^- , H_2O_2 et O_2^{2-} [140,141]. Cela étant lié aux propriétés structurelles du ZnO, les NPs présentant davantage de défauts de surface entraînent une diminution de la cristallinité et une augmentation de la surface. Par conséquent, lorsqu'ils sont exposés à de courtes longueurs d'onde (telles que la lumière), ces défauts entraînent une génération de ROS plus rapide et plus efficace [142]. Une fois formé, le peroxyde d'hydrogène peut pénétrer dans la cellule procaryote et perturber le métabolisme. De plus, une peroxydation lipidique peut se produire sur la membrane bactérienne, affaiblissant l'intégrité de la membrane et favorisant la lyse cellulaire.

2.4 L'oxyde de Cuivre

L'oxyde de cuivre (II), est un composé inorganique de formule chimique CuO . Il est utilisé comme précurseur dans de nombreux produits contenant du cuivre tels que les produits de préservation du bois et les céramiques. Ce composé inorganique se présente naturellement sous forme de cristaux, il est utilisé pour produire des pigments [143]. C'est aussi un semi-conducteur de type p avec une bande interdite de 1,9-2,1 eV.

2.4.1 Structure de l'oxyde de cuivre

L'oxyde de cuivre se trouve sous forme naturelle : La ténorite, il a une structure monoclinique comme le montre la figure 12.

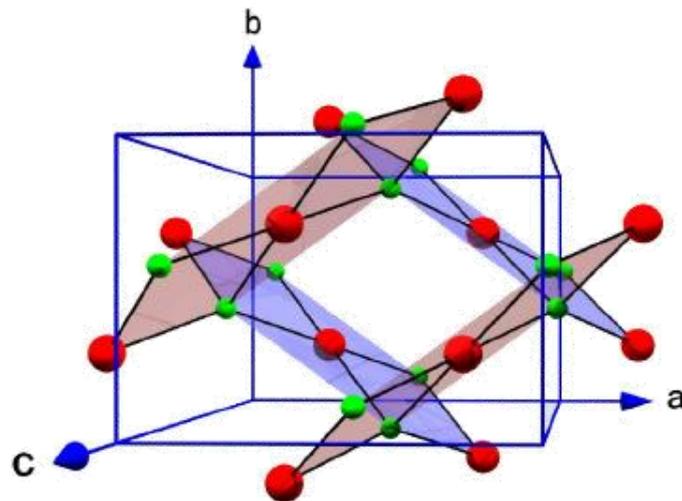


Figure 12 : Structure de l'oxyde de Cuivre [143]

2.4.2 Les propriétés de l'oxyde de cuivre

Les nanostructures de CuO avec de grandes surfaces et des effets de taille potentiels possèdent des propriétés physiques et chimiques supérieures qui diffèrent remarquablement de celles de leurs homologues micro ou en vrac. Ces nanostructures ont été largement étudiées en raison de leurs applications prometteuses dans divers domaines. Les nanostructures CuO sont également considérées comme des matériaux d'électrode pour les batteries rechargeables lithium-ion (LIB) de nouvelle génération en raison de leur capacité théorique élevée, de leur sécurité et de leur respect de l'environnement [144]. Ils sont également considérés comme des matériaux prometteurs pour la fabrication de cellules solaires en raison de leur forte absorbance solaire, de leur faible émittance thermique, de leurs propriétés électriques relativement bonnes et de leur concentration élevée [145]. En outre, les nanostructures CuO sont largement utilisées dans diverses autres applications, y compris les capteurs de gaz, biocapteurs, nanofluides, photodétecteurs, matériaux énergétiques (EM), les supercondensateurs, l'élimination des polluants inorganiques, la photocatalyse et les milieux de stockage magnétique [146]. Des études récentes ont démontré que le CuO à l'échelle nanométrique peut être utilisé pour préparer divers

nanocomposites organiques-inorganiques avec une conductivité thermique élevée, une conductivité électrique élevée, une résistance mécanique élevée, une durabilité à haute température, etc.

2.4.3 Les applications de CuO

Les principales applications des nanoparticules d'oxyde de cuivre sont les suivantes : En tant que catalyseur de taux de combustion dans le propulseur de fusée. Il peut grandement améliorer la vitesse de combustion du propergol homogène, l'indice de pression plus faible, et aussi mieux fonctionner comme catalyseur pour le propergol composite (PCPA). Il peut être appliqué sur le catalyseur, les matériaux supraconducteurs, les matériaux thermoélectriques, les matériaux de détection, le verre, la céramique et d'autres domaines résistances céramiques, supports de stockage magnétiques, capteurs de gaz, bascules dans le proche infrarouge, applications photoconductrices et photothermiques Comme les semi-conducteurs, la transformation de l'énergie solaire, et les supraconducteurs de haute technologie [147].

2.4.4 Les propriétés antibactériennes

Bien que les nanoparticules d'oxyde de cuivre (CuO) se soient révélées efficaces contre divers agents pathogènes bactériens, leur efficacité antibactérienne est légèrement inférieure à celle de l'Ag ou du ZnO. Par conséquent, une concentration comparativement plus élevée de nanoparticules est nécessaire pour obtenir les mêmes résultats [148]. De plus, l'activité des nanoparticules de CuO varie considérablement en fonction de l'espèce bactérienne. Néanmoins, comme le cuivre est beaucoup moins coûteux que d'autres matériaux métalliques de taille réduite, il peut être utilisé pour améliorer l'efficacité sous la forme de nanocomposites. L'oxyde de cuivre (CuO) NM, comme les autres nanoparticules métalliques, exerce son activité antibactérienne [149, 150] par rupture de la membrane et production de ROS [151]. En général, le CuO-NM est moins puissant que l'Ag-NM, bien que dans certains cas, l'inverse soit vrai. Par exemple, *E. coli* et *S. aureus* étaient plus sensibles à l'argent, alors que *B. subtilis* et *B. anthracis* étaient plus sensibles au CuO NM [152, 153]. Une comparaison de NM de CuO avec des NM métalliques autres que l'Ag-NM a montré qu'ils possèdent l'activité antibactérienne la plus forte [154, 155]. Une explication possible

de ces observations est que les bactéries, telles que *B. subtilis*, dont les parois cellulaires sont riches en groupes amine et carboxyle, se lient plus fortement au CuO et y sont donc plus sensibles [156,157]. Il semble donc que dans des cas particuliers, il serait avantageux d'utiliser le CuO NM au lieu d'autres, notamment de l'argent.

2.5 Le dioxyde de Titane TiO₂

Le dioxyde de titane est un composé inorganique blanc, utilisé depuis environ 100 ans dans un grand nombre de produits divers, pour ses propriétés non toxiques, non réactives et lumineuses, qui augmentent en toute sécurité la blancheur et la luminosité de nombreux matériaux. C'est le pigment blanc le plus utilisés, doté de qualité réfléchissante. Il peut aussi disperser et absorber les rayons UV.

Le dioxyde de titane est produit sous deux formes, micrométrique et nanométrique. La forme principale, qui représente plus de 98% de la production totale, est le dioxyde de titane de qualité pigmentaire. La forme pigmentaire tire parti des excellentes propriétés de diffusion de la lumière du dioxyde de titane dans les applications nécessitant une opacité et une luminosité des blancs. L'autre forme sous laquelle le dioxyde de titane est produit est un produit ultrafin (nanomatériau). Cette forme est sélectionnée lorsque différentes propriétés, telles que la transparence et l'absorption maximale de la lumière ultraviolette, sont requises, comme dans les écrans solaires cosmétiques.

2.5.1 Structure du dioxyde de titane

Le dioxyde de Titane cristallise dans trois grandes structures différentes comme le montre la figure 13 ; rutile, anatase et brookite. Seuls le rutile et l'anatase jouent un rôle dans les applications du TiO₂. Dans les deux structures, l'élément de base consiste en un atome de titane entouré de six atomes d'oxygène dans une configuration octaédrique plus ou moins déformée. Dans chaque structure, les deux liaisons entre le titane et les atomes d'oxygène aux sommets de l'octaèdre sont légèrement plus longues. Dans les trois structures de TiO₂, l'empilement des octaèdres produit trois atomes d'oxygènes coordonnés.

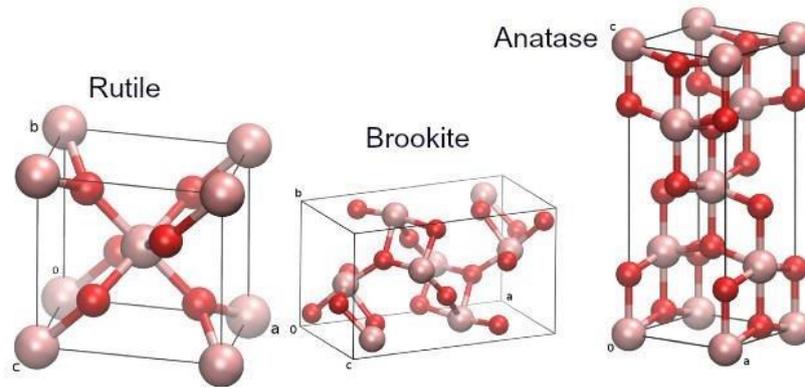


Figure 13: Différentes structures du dioxyde de titane [158]

2.5.2 Les propriétés du dioxyde de titane

Le dioxyde de titane possède un certain nombre de caractéristiques uniques qui le rendent parfaitement adapté à de nombreuses applications différentes.

Son point de fusion extrêmement élevé est de 1843°C et son point d'ébullition de 2972°C. Il se produit donc naturellement sous forme de solide et, même sous forme de particules, il est insoluble dans l'eau. Le TiO_2 est également un isolant [159,160].

Contrairement aux autres matériaux blancs qui peuvent apparaître légèrement jaunes à la lumière, en raison de la manière dont le TiO_2 absorbe les rayons UV, il apparaît en blanc pur.

Le TiO_2 a également un indice de réfraction très élevé (sa capacité à disperser la lumière), supérieur à celui du diamant. Cela en fait une substance extrêmement brillante et un matériau idéal pour une utilisation esthétique.

Une autre propriété cruciale du dioxyde de titane est qu'il peut montrer une activité photocatalytique sous une lumière UV. Cela le rend efficace pour la purification environnementale pour différents types de revêtements protecteurs [161-163].

2.5.3 Les applications du dioxyde de titane

Sa couleur ultra blanche, ses propriétés hautement réfractives et résistantes aux rayons UV font du TiO_2 un produit extrêmement populaire auprès des secteurs de l'industrie et de la consommation, apparaissant dans des dizaines de produits que les gens utilisent et observent quotidiennement.

Outre les peintures, les revêtements catalytiques, les plastiques, le papier, les produits pharmaceutiques et les écrans solaires, les applications moins connues comprennent les emballages, les encres d'imprimerie commerciales, les cosmétiques, les dentifrices et les aliments (où il est répertorié comme colorant E171). Il peut entrer dans la composition des :

- Peintures, revêtements et plastiques : Utilisé spécifiquement comme pigment dans les peintures, le TiO_2 est appelé blanc de titane ou pigment white 6. Il est également appelé « le blanc parfait » en raison de ses puissantes propriétés blanchissantes. Un exemple de son utilisation dans ces applications est le revêtement des éoliennes, fournissant à la fois une couleur blanche appropriée et une protection contre la dégradation par les UV.
- Aliments : Dans les aliments, le TiO_2 est utilisé dans les pigments et est appelé, E171. Dans de nombreux produits alimentaires, il agit comme un agent de blanchiment, mais également comme un rehausseur de couleur et de texture.
- Cosmétiques et soins de la peau : Dans les produits de soin de la peau et de maquillage, le TiO_2 est utilisé à la fois comme pigment et comme épaississant pour les crèmes. Le TiO_2 ultra-fin est utilisé en tant qu'écran solaire en raison de sa transparence et de ses capacités d'absorption des rayons UV.

En raison de ses diverses propriétés, le TiO_2 s'est révélé utile pour de nombreuses applications respectueuses de l'environnement. Lorsqu'il est utilisé comme revêtement de peinture à l'extérieur des bâtiments dans des climats chauds et tropicaux, les qualités blanches de TiO_2 qui réfléchissent la lumière, peuvent entraîner des économies d'énergie considérables, car elles réduisent le besoin de climatisation.

En tant que photocatalyseur, le TiO_2 peut être ajouté aux peintures, aux ciments et aux fenêtres afin de décomposer les polluants environnementaux. En tant que nanomatériau, il

peut également être utilisé comme catalyseur essentiel pour le DeNO_x dans les systèmes de gaz d'échappement des voitures, camions et des centrales électriques, minimisant ainsi leur impact sur l'environnement [164].

2.5.4 Les propriétés antibactériennes du dioxyde de titane

Le dioxyde de titane TiO₂ est un autre oxyde métallique largement étudié pour ses activités antimicrobiennes [165]. Les NPs de TiO₂ ont un large spectre d'activités antimicrobiennes et anti-biofilm contre un large éventail de microorganismes pathogènes, notamment des bactéries, des champignons, des parasites et des virus. Les utilisations récentes du dioxyde de titane ont impliqué diverses applications, y compris dans l'industrie alimentaire. La FDA a approuvé l'utilisation de TiO₂ dans l'alimentation humaine, les médicaments et les cosmétiques. L'activité photocatalytique unique des nanoparticules de TiO₂ et les effets de taille quantique le rendent idéal pour les revêtements antimicrobiens sur les dispositifs biomédicaux. L'activité antimicrobienne des NPs de TiO₂ contre les bactéries à Gram négatif et à Gram positif est bien connue [166].

Les NPs de TiO₂ peuvent détruire les microorganismes lors de l'éclairage en raison de leurs propriétés photocatalytiques. Les espèces réactives d'oxygène générées par les NPs de TiO₂ peuvent oxyder les composants de la membrane cellulaire, entraînant leur destruction. L'activité antimicrobienne du TiO₂ observée à l'abri de la lumière indique que, mis à part l'activité photocatalytique, le contact direct et l'adsorption des cellules sur les NPs de TiO₂ peuvent entraîner une perte de l'intégrité de la membrane [167,168].

2.6 La méthode Sol-Gel

2.6.1 Définition

Le procédé sol-gel correspond à l'abréviation « solution-gélification », il s'agit d'un procédé très similaire à celui de la polymérisation. Il permet de synthétiser des matériaux de types poudres, fibres, céramiques et films minces très purs et de stœchiométrie contrôlée par chimie douce. Il offre plusieurs pluralités du côté du matériau ainsi que de sa mise en forme, ce qu'il lui vaut d'être très utilisé aujourd'hui dans de nombreux domaines tels que la métallurgie, l'aéronautique, l'automobile, l'optique, l'électronique et les biomatériaux [169-172]. Le sol-gel est la méthode la plus utilisée pour générer des oxydes métalliques nanostructurés, en effet il permet de réaliser des couches minces constituées d'empilements de nanoparticules d'oxydes métalliques, comme indiqué dans la figure 14 [174-176].

La réaction sol-gel s'effectue en deux principales étapes : La première consiste en la formulation du « sol » à partir de précurseurs chimiques en solution à température ambiante, c'est la réaction d'hydrolyse. Le système est dans l'état liquide : il est constitué d'un mélange d'oligomères colloïdaux et de petites macromolécules ainsi que, selon le degré d'avancement de la réaction de polymérisation, de différents monomères partiellement hydrolysés. La taille des particules solides, plus denses que le liquide, doit être suffisamment petite pour que les forces à l'origine de la dispersion ne soient pas surpassées par la gravitation.

Ensuite le « sol » va évoluer au cours de l'étape de gélification par des réactions de condensation pour obtenir un réseau solide tridimensionnel de liaisons de Van der Waals interconnecté et stable à viscosité infini, appelé « gel ». Il est constitué d'oxydes gonflés par le solvant, avec des liaisons chimiques assurant la cohésion mécanique du matériau en lui donnant un caractère rigide et non déformable (un gel peut présenter un caractère élastique mais pas de viscosité macroscopique). Le temps nécessaire au « sol » pour se transformer en « gel » est appelé temps de gel.

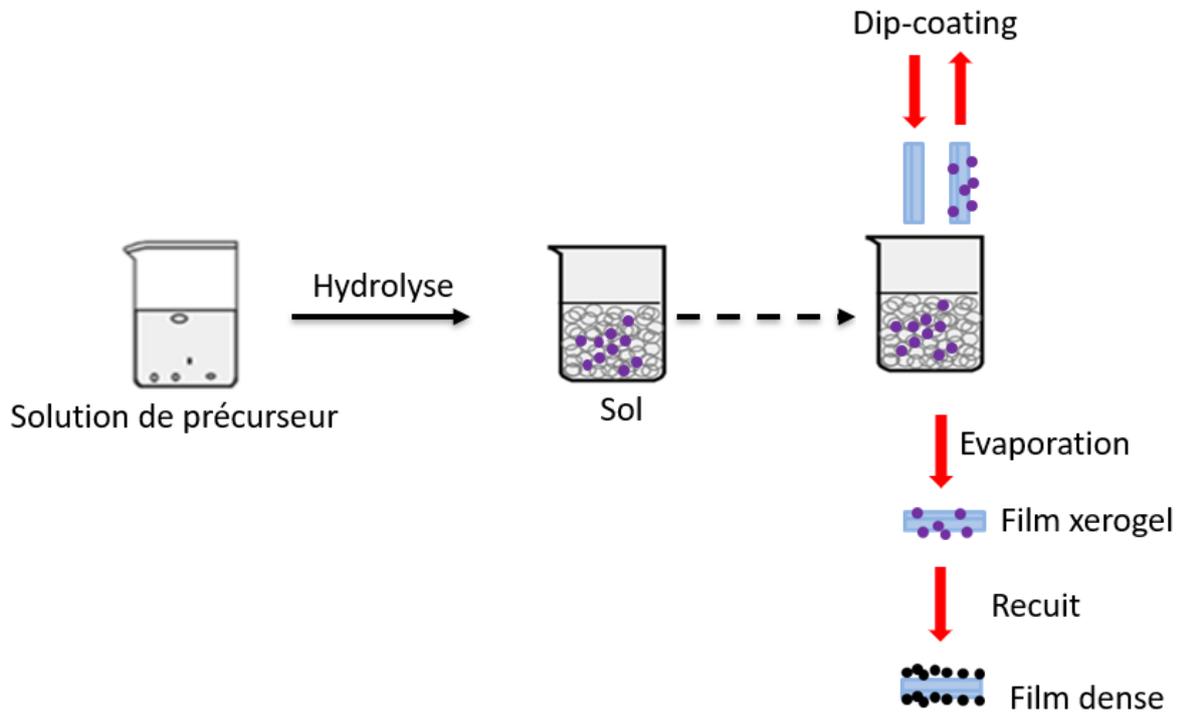


Figure 14: Schéma de synthèse par la méthode sol-gel

2.6.2 Les précurseurs

Les précurseurs sont des réactifs chimiques qui permettent d'amorcer la réaction, ce sont des sels métalliques ou bien des alcoxydes métalliques de formules $M(OR)_n$ où M désigne un métal de valence n et R un groupe organique alkyle C_nH_{n-1} .

Les synthèses par voie sol-gel peuvent être réalisées par deux voies différentes suivant la nature du précurseur moléculaire :

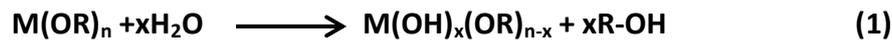
La voie organique mettant en jeu les alcoxydes métalliques dans une solution organique. C'est la voie la plus privilégiée, car elle permet d'obtenir un contrôle de la granulométrie malgré le coût élevé des alcoxydes métalliques.

La voie minérale ou inorganique faisant intervenir les sels métalliques MX_n (chlorures, nitrates, oxychlorures...) en solution aqueuse. Cette méthode présente l'avantage du faible coût des sels métalliques, cependant elle reste peu utilisée car difficile à contrôler.

2.6.3 Les mécanismes réactionnels

Le mécanisme réactionnel de la synthèse sol-gel se décompose en deux principales étapes [177-179].

Hydrolyse partielle ou totale du précurseur organométallique faisant apparaître un groupement alcool ROH.



S'en suit l'étape de **condensation** des groupes M-OH entre eux afin de former des macrochaînes. Ce qui entraîne une compétition entre deux mécanismes :

L'oxolation, c'est-à-dire la formation de liaisons chimiques types M-O-M (métal-oxygène-métal) en éliminant une molécule d'eau par condensation de deux groupements OH.



L'olation où un pont OH remplace une molécule d'eau de coordination et conduit donc à la formation de ponts M-OH-M.



2.6.4 Les paramètres influençant les réactions

Lors de la synthèse par voie sol-gel il est possible de favoriser l'obtention d'une structure particulière en privilégiant soit l'étape d'hydrolyse ou l'une des étapes de condensation. En effet, les cinétiques de ces dernières réactions sont responsables des caractéristiques des gels obtenus. Il existe plusieurs paramètres à prendre en compte qui influence fortement ces cinétiques :

- Le rapport d'hydrolyse, rapport de concentration de l'alkoxyde sur celle de l'eau
- La température de la réaction
- Le pH
- Le choix du solvant
- La nature et la concentration en alcoxyde

2.6.5 Les oxydes métalliques dans le sol-gel

La méthode sol-gel peut être utilisée pour synthétiser les oxydes métalliques dans une approche « bottom-up » avec un contrôle parfait sur la forme et la taille des produits dérivés. En outre, un bon niveau de compréhension du mécanisme de contrôle de la forme et de la taille grâce aux paramètres de contrôle tels que le temps de vieillissement, la concentration en précurseur, le pH de la solution, la température du bain et le traitement thermique est obtenu à partir de la littérature existante. Des idées simples peuvent être exécutées grâce à un traitement sol-gel simple et économique pour faire progresser la technologie au niveau supérieur.

La synthèse de matériaux solides implique souvent des réactions de chimie humide et une chimie sol-gel basées sur la transformation de précurseurs moléculaires en un réseau d'oxydes par réaction d'hydrolyse et de condensation [180-182]. La morphologie joue un rôle essentiel dans l'amélioration des propriétés de tout matériau en améliorant le rapport surface / volume élevé. Le contrôle de la forme, de la taille et de la structure d'emballage des particules dans les matériaux joue un rôle crucial dans la construction de dispositifs et de matériaux thérapeutiques de nouvelle génération [183]. La méthode sol-gel est un excellent outil pour déployer une architecture contrôlée en chimie des matériaux afin de fabriquer des nanostructures d'oxydes métalliques. Les oxydes métalliques préparés en solution sol-gel ont montré d'excellentes propriétés optiques et électriques. L'examen d'importants nanostructures d'oxydes métalliques dérivés de la méthode sol-gel nous aide à comprendre les facteurs qui pourraient être pris en compte pour contrôler la forme et la taille des particules. En général, les solvants, les additifs, le temps de vieillissement et le post-traitement thermique sont quelques facteurs importants qui déterminent la forme et la taille des blocs de construction des matériaux synthétisés [184, 185].

2.7 Les couches minces

Les revêtements minces sont des couches remarquablement fines de matières premières (SiO_2 , TiO_2 , MgF_2 , Au, Al, etc.), qui peuvent être fonctionnalisées au substrat comme le métal, le verre ou les cristaux, la céramique pour modifier ses propriétés opto-électriques. Des propriétés telles que la réfraction, la conductivité, la réflexion et l'antireflet peuvent être mises en forme et personnalisées par un calibrage spécialisé du choix du matériau, des épaisseurs correspondantes de chaque couche mince et du nombre de couches. Tous ces paramètres sont en relation avec les longueurs d'ondes incidentes de la lumière. L'application des films minces sur différents matériaux a pour but d'améliorer et d'obtenir des propriétés brillantes qui donnent des avantages supérieurs et des applications des matériaux qui étaient impossibles autrement. Des films minces d'épaisseurs variables allant du micromètre au nanomètre peuvent être synthétisés selon nos besoins. L'utilité des couches minces d'oxydes est considérablement accrue car elle présente différentes applications et propriétés impliquant des diodes électroluminescentes (dispositifs électriques), des applications de mémoire informatique, des filtres d'interférence et électrochimiques, des couches magnétiques, des cellules solaires...etc.

Le traitement sol-gel chimique en voie humide ouvre la voie à la polyvalence et à la facilité des techniques de dépôt en film liquide pour une variété de matériaux de revêtement inorganiques et hybrides. Le dépôt de film liquide implique généralement l'application d'un film de précurseurs liquides sur un substrat qui est ensuite converti en matériau de revêtement souhaité dans une étape ultérieure de post-traitement.

Parmi les techniques de dépôt disponibles, le revêtement par dip-coating est le plus largement utilisé pour les applications industrielles et en laboratoire. C'est une méthode simple, peu coûteuse, fiable et reproductible qui consiste à déposer un film liquide humide en plongeant le substrat dans une solution contenant des composés métalliques hydrolysables (ou des particules facilement formés). Les paramètres critiques pouvant affectés les revêtements produits par le dip-coating sont illustrés dans la figure 15.

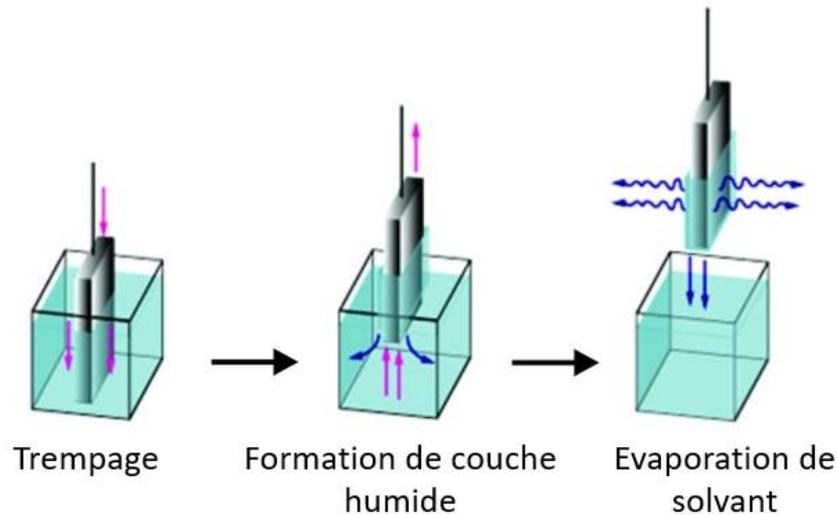


Figure 15: Schéma représentant les différentes étapes du Dip-coating

En règle générale, le revêtement par dip-coating comprend un processus en cinq étapes, comprenant :

1. L'immersion : à une vitesse constante le substrat est plongé dans la solution de revêtement. Sur la base du type de substrat, un processus de prétraitement serait effectué avant cette étape.
2. Démarrage : le substrat reste dans la solution pendant un temps déterminé, puis il commence à être retiré.
3. Dépôt : Pendant le retrait du substrat, le revêtement mince commence à se déposer dessus. L'épaisseur du revêtement dépend directement de la vitesse à laquelle le substrat est retiré. Plus la traction est lente, plus la couche de revêtement est fine.
4. Drainage : Dans cette étape, l'excès de liquide est drainé de la surface du substrat.
5. Evaporation : Le solvant commence à s'évaporer de la surface du substrat pour former un film mince. Si le solvant est volatil, cette étape peut avoir lieu à l'étape 3.

2.8 Conclusion

Cette synthèse bibliographique permet de mettre l'accent sur l'activité antibactérienne des NPs. Les NPs à base de métal constituent une nouvelle alternative au traitement antimicrobien. Ces NPs fournissent une solution pour un matériau antibactérien efficace et pouvant inhiber la formation des biofilms à long terme en présentant des propriétés bactéricides par la génération de ROS, l'adhésion de protéines et l'instabilité de la membrane. Les métaux peuvent faire la distinction entre les types de cellules procaryotes et eucaryotes, mais ils sont limités en raison de leur toxicité potentielle pour les cellules mammaliennes. Les lésions des cellules eucaryotes associées à une intoxication par un métal doivent être clairement identifiées afin de pouvoir utiliser ces agents antimicrobiens dans des applications médicales. Pour que ces nanomatériaux soient utilisés dans les soins de santé modernes, le principal défi sera de veiller à prévenir au minimum la toxicité humaine.

La technique sol-gel quant à elle est l'une des techniques les plus adaptées pour la préparation de couches minces, de poudre, de xérogel, d'aérogels et de verres. Différents paramètres influencent la qualité des produits de la méthode sol-gel, à savoir la concentration, la composition de l'alcoxyde, la température, les solvants et la nature des précurseurs. La modulation et l'optimisation de ces paramètres permettent d'obtenir le matériau avec les qualités requises, notamment la préparation des couches minces. Différentes techniques de dépôt telles que les revêtements par immersion et le revêtement par centrifugation peuvent être facilement exploitées pour obtenir l'épaisseur souhaitée du film.

A la base de cet état de l'art nous avons orienter notre choix vers la synthèse de NPs d'oxydes métalliques notamment celles de CuO, ZnO et TiO₂.

Chapitre 2 : Dispositifs expérimentaux et outils de caractérisations

3 Dispositifs expérimentaux et outils de caractérisations

3.1 Systèmes biologiques

Les bactéries sont des microorganismes unicellulaires. Leur structure cellulaire est plus simple que celle d'autres organismes puisqu'il n'y a pas d'organites liés au noyau ou à la membrane. Au lieu de cela, leur centre de contrôle contenant les informations génétiques est contenu dans une seule boucle d'ADN (le chromosome). Certaines bactéries ont des cercles supplémentaires de matériel génétique appelé plasmides. Le plasmide contient souvent des gènes qui confèrent aux bactéries le portant un avantage par rapport aux autres bactéries qui n'en possède pas. Par exemple, il peut contenir un gène qui rend la bactérie résistante à certains biocides.

Dans ce travail nous avons utilisés deux types de bactéries (voir tableau1) :

Les bactéries à Gram positif ont une importante structure de peptidoglycane. Comme indiqué dans la figure 16, cela explique la coloration différentielle avec la coloration de Gram par diffusion lente du solvant utilisé. Certaines bactéries à Gram positif sont également capables de former des spores. Les spores permettent aux bactéries de survivre à une exposition à des conditions extrêmes et peuvent conduire à une recontamination.

Les bactéries à Gram négatif ont une petite couche de peptidoglycane mais ont une membrane supplémentaire, la membrane externe. Cela crée une barrière de perméabilité supplémentaire et nécessite des mécanismes de transport à travers cette membrane.

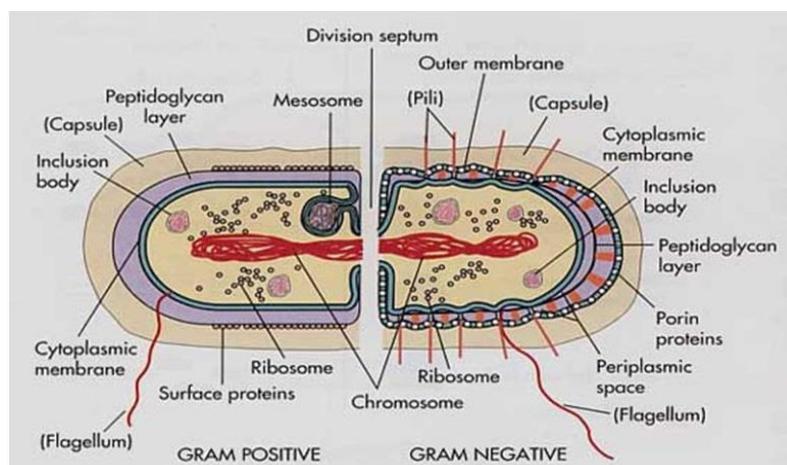


Figure 16: Structure bactérie à Gram positive (à gauche) / à Gram négative (à droite) [186]

Tableau 1 : Tableau représentant les caractères des bactéries Gram positif Vs Gram négatif

Caractéristiques	Gram positif	Gram négatif
Nombre de couches constituant la paroi	Une	Deux
Epaisseur de la paroi	20-80nm	8-10nm
Membrane externe	Absente	Présente
Espace périplasmique	Présent sur certains	Présent
Composition chimique	Peptidoglycane, acide téichoïque et acide lipotéichoïque	Lipopolysaccharide, lipoprotéines et peptidoglycane
Peptidoglycane	couche épaisse	couche fine
Protéines porines	Absentes	Présentes
Lipides	Peu (1 à 2,5 % de la paroi)	Beaucoup (20% de la paroi)
Acides aminés	Faible diversité. Quantité importante d'acide glutamine et d'alanine	Présence de tous les acides aminés
Perméabilité de la paroi	Pénétrable	Peu pénétrable
Résistance aux molécules biocides	Faible	Grande

3.1.1 Les souches bactériennes

L'ensemble des travaux a été réalisés avec 4 espèces pathogènes pour l'homme et qui sont les principales responsables des infections nosocomiales : une entérobactérie à coloration Gram négative (*E. coli*), un coque à coloration Gram positive (*S.aureus*), un bacille à

coloration gram négative (*P.aeruginosa*) et une levure (*C.albicans*). Les germes utilisés sont des germes-tests de normes permettant d'évaluer l'efficacité de différents désinfectants

Tableau 2 : Principales souches bactériennes, leurs morphologies et leurs principales caractéristiques

Noms	Morphologie	Type respiratoire	Commensale	Réservoirs / sites de colonisation, de transmission	Types d'infections
<i>Staphylococcus</i>	CG+ en grappes	Anaérobie facultative (AERf)	Oui	Peau, narines / endogène, contact direct, aérosol	Tissu mou, os, articulation, endocardite, intoxication alimentaire
<i>Enterobacteriaceae</i> (<i>E.coli</i> , <i>Klebsiella</i> , <i>Salmonella</i> ..)	BG-	AERf	Certaines espèces	Tractus gastro-intestinal, animaux / endogène, fécal-oral	Diarrhée, voies urinaires, intoxication alimentaire, septicémie
<i>Pseudomonas</i>	BG-	Aérobie strict (AERs)	Non	Eau, sol / endogène, rupture de la barrière cutanée	Infections chez des hôtes immunodéprimés, fibrose kystique

3.1.1.1 *Escherichia coli*

Escherichia coli (colibacille) est une entérobactérie mobile capable de fermenter le lactose et de produire de l'indole. *E. coli* est un commensal du tube digestif de l'homme et de nombreux animaux. Il représente à lui seul la plus grande partie de la flore bactérienne aérobie de l'intestin (espèce aérobie dominante) à raison de 10^8 par gramme de fèces (flore totale : 10^{11} à 10^{12} bactéries par gramme).

E. coli est un bacille à Gram négative, disposée séparément ou par paires. Il est mobile par les flagelles péritriches, bien que certaines souches ne soient pas mobiles. Des capsules et

des fimbriae se trouvent dans certaines souches. La température de croissance optimale est de 37 ° C. Sur la gélose nutritive, leur croissance donne des colonies, blanc grisâtre, humides, lisses, opaques ou translucides [187-189].



Figure 17: image microscopique d'E.coli [190]

3.1.1.2 *Staphylococcus aureus*

Observés par Pasteur en 1879 dans un pus de furoncle, les staphylocoques doivent leur nom à OGSTON (1881) qui les a mis en évidence dans des abcès aigus et chroniques. Les bactéries du genre *Staphylococcus* sont des cocci à Gram positif, groupés en amas ayant la forme de grappe de raisin, immobiles, non sporulés, catalase positive et oxydase négative. Il existe 27 espèces du genre *Staphylococcus* actuellement répertoriées, dont *S. aureus* est la principale [191].

S. aureus est un commensal de la peau et des muqueuses de l'homme et des animaux (rhino-pharynx, intestin). On le retrouve sur la muqueuse nasale d'un tiers environ des sujets normaux. Éliminé dans le milieu extérieur, cette bactérie peut survivre longtemps dans l'environnement.

L'apparence microscopique du *S. aureus* est ronde et ressemble à celle d'une sphère (cocci). En raison de la manière dont les bactéries se divisent et se multiplient, elles apparaîtront en grappes ou en tétrades. En grec, *staphylococcus* signifie "grappes de raisins". L'utilisation d'une coloration bactériologique courante, la coloration de Gram, aide à identifier *S. aureus*. L'organisme apparaît en violet avec cette technique de coloration et est appelé gram positif. Lorsqu'il est cultivé sur un milieu bactériologique, *Staphylococcus aureus* se présente sous la forme de grandes colonies blanches à dorée. La majorité du temps, la colonie de

Staphylococcus aureus produit une zone d'hémolyse entourant la colonie sur milieu spécifique [192].

Il n'est pas très fastidieux et se développe bien, que ce soit en aérobiose ou dans des conditions anaérobies et produit une bonne croissance en moins de 24 heures.

Les staphylocoques sont des bactéries sphériques à Gram positif qui apparaissent dans des grappes microscopiques ressemblant à une structure semblable à celle du raisin. *S. aureus* est considérée comme la troisième cause de désordres d'origine alimentaire dans le monde

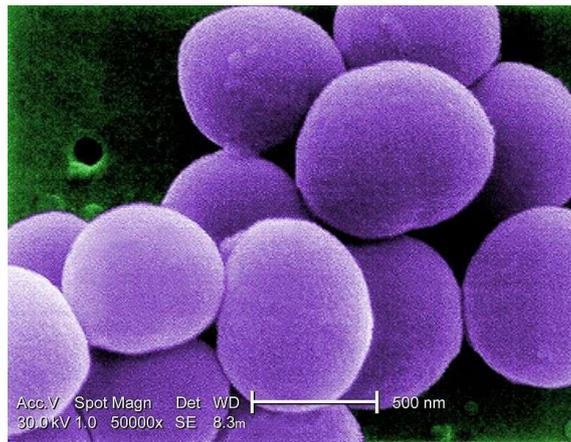


Figure 18: Image microscopique de *S. aureus* [193]

3.1.1.3 *Pseudomonas aeruginosa*

Pseudomonas aeruginosa appartient à la classe des γ protéobactéries. C'est un bâtonnet aérobie à Gram négatif appartenant à la famille *Pseudomonadaceae* dont le biotope est l'environnement (sol, eau). Cependant, il est aussi isolé à la surface des plantes et parfois à la surface des animaux. *P. aeruginosa* est principalement un agent pathogène nosocomial. Selon la CDC, l'incidence globale des infections à *P. aeruginosa* dans les hôpitaux américains est en moyenne d'environ 0,4% (4 cas sur 1 000) et la bactérie est le quatrième agent pathogène nosocomial le plus communément isolé, représentant 10,1% de toutes les infections nosocomiales [194].

Presque toutes les souches sont mobiles au moyen d'un seul flagelle polaire. Son métabolisme est respiratoire et jamais fermentatif, mais il se développera en l'absence d'O₂ si NO₃ est disponible comme accepteur d'électrons respiratoire.

Sa température optimale pour la croissance est de 37 ° C et il est capable de croître à des températures aussi élevées que 42°C. Ses besoins nutritionnels sont très simples. En laboratoire, le milieu le plus simple pour la croissance de *P. aeruginosa* consiste en l'acétate

en tant que source de carbone et en sulfate d'ammonium en tant que source d'azote [195]. Il tolère une grande variété de conditions physiques, y compris la température. Il est résistant aux fortes concentrations de sels et de colorants, aux antiseptiques faibles et à de nombreux antibiotiques couramment utilisés. Les échantillons cliniques de *P. aeruginosa* isolé donnent deux types de colonies lisses. L'un à l'aspect d'œuf au plat qui est grand, lisse, avec des bords plats et un aspect élevé. Et l'autre à un aspect mucoïde, ce qui est attribué à la production d'alginate.

Les souches de *P. aeruginosa* produisent deux types de pigments solubles, le pigment fluorescent pyoverdine et le pigment bleu pyocyanine. Ce dernier est produit abondamment dans les milieux à faible teneur en fer et joue un rôle dans le métabolisme du fer dans la bactérie [196,197].



Figure 19: Image microscopique de *P. aeruginosa* [198]

3.1.1.4 *Candida albicans*

Candida albicans appartient à l'ordre *Saccharomycetales* du phylum *Ascomycota*. Habitant normal des membranes muqueuses chez l'homme, il est également un agent pathogène courant qui cause des infections de la peau et des muqueuses. Bien que ces infections soient généralement locales et faciles à traiter chez les personnes immunocompétentes, elles peuvent être systémiques et mettre la vie en danger chez les personnes immunodéprimées. *C. albicans* est diploïde et présente une hétérozygotie naturelle considérable. Il est également dimorphique avec une forme unicellulaire (levure) et une forme multicellulaire (hyphal) associée à une pathogénicité [199].

Candida albicans est la cause la plus répandue d'infections fongiques chez l'homme [200]. Son nom d'espèce, *albicans*, vient du mot latin "blanc". La levure apparaît blanche lorsqu'elle est cultivée sur une plaque. Et dans le cas de certaines infections, comme le muguet, cela peut créer des plaques blanches.

Les cellules de levure *Candida* peuvent être détectées dans des préparations humides non colorées ou des préparations d'échantillons colorées au Gram. Dans les frottis colorés, *Candida* apparaît sous forme de cellules de levure naissantes blastoconidies et/ou de pseudohyphae présentant des points de constriction réguliers.

Candida albicans pousse bien sur la gélose Sabouraud Dextrose et dans les milieux bactériologiques les plus couramment utilisés. Des colonies rondes, de couleur crème apparaissent généralement après 24 à 48 heures d'incubation de 25 à 37 ° C. Les colonies ont une odeur de levure distinctive et les cellules en formation peuvent être facilement observées par microscopie directe dans des préparations colorées ou non.

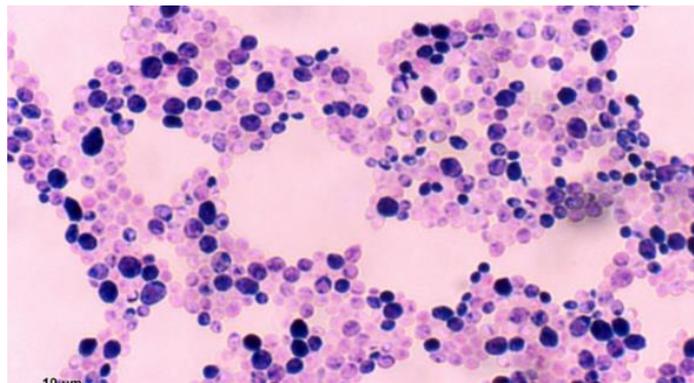


Figure 20: Image microscopique de *C.albicans* [201]

3.2 Conditions de conservations des souches

Les souches sont conservées sous forme de cryobilles à -80°C. Les cryobilles (AES Laboratoire, France) ont été réalisées par une mise en suspension des micro-organismes dans du TSB (Tryptone Soja bouillon, Biomérieux, France), puis étalement sur gélose TSA (Tryptone Soja Agar, Biomérieux, France). Après 24 h d'incubation à 37°C, le tapis bactérien ainsi formé était récupéré dans 10 mL de solution cryoprotectrice. Elle était ensuite répartie dans des cryotubes avant stockage à -80°C.

3.3 Conditions de croissance des souches

3.3.1 Croissance en milieu liquide (TSB)

En croissance en milieu nutritif les cellules bactériennes étaient remises en suspension dans 9 mL de TSB. Après 24h d'incubation à 37°C, 1 mL de ces suspensions bactériennes étaient réensemencé dans 9 mL de TSB stérile puis incubé à 37°C pendant 8h. La culture de travail était obtenue par ensemencement d'un milieu du second repiquage dans 100 mL de TSB suivi d'une incubation à 37°C jusqu'à atteindre la phase stationnaire de croissance.

3.3.2 Croissance en milieu solide (TSA)

Les cultures de travail étaient obtenues après 2 repiquages successifs de 24h à 37°C sur gélose des micro-organismes conservés à -80°C.

3.3.3 La croissance bactérienne

En laboratoire, dans des conditions favorables, une population bactérienne en croissance double à intervalles réguliers. La croissance se fait par progression géométrique : 1, 2, 4, 8, etc. ou 20, 21, 22, 23 .. 2^n (où n = le nombre de générations). C'est ce qu'on appelle la croissance exponentielle. En réalité, la phase exponentielle ne représente qu'une partie du cycle de vie des bactéries. Lorsqu'un milieu frais est inoculé avec un nombre donné de cellules et que la croissance de la population est surveillée sur une période de temps, le traçage des données donnera une courbe de croissance bactérienne typique (Figure 21 ci-dessous).

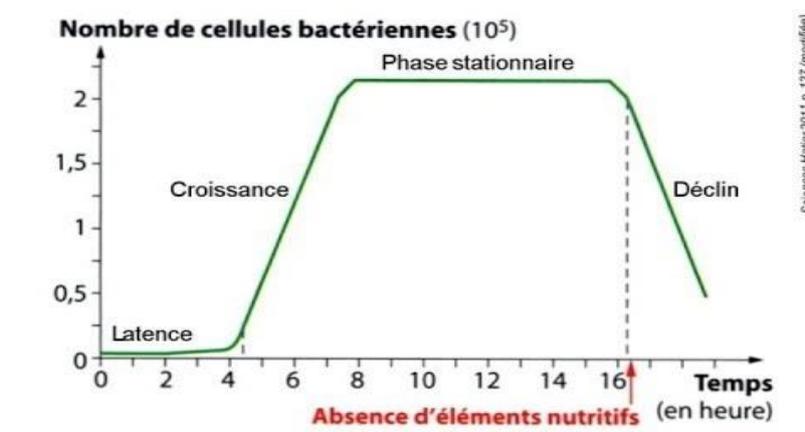


Figure 21: Allure typique de la croissance bactérienne en bouillon nutritif

Les phases caractéristiques du cycle de croissance sont les suivantes :

Phase de latence (lag): Immédiatement après l'inoculation des cellules dans un milieu frais, la population reste temporairement inchangée. Bien qu'aucune division cellulaire apparente ne se produise, les cellules peuvent croître en volume ou en masse, synthétiser des enzymes, des protéines, de l'ARN, etc., et accroître leur activité métabolique. La durée de la phase de latence dépend apparemment d'une grande variété de facteurs, notamment la taille de l'inoculum, le temps nécessaire pour récupérer des dommages physiques ou d'un choc dans le transfert, temps requis pour la synthèse des coenzymes ou des facteurs de division essentiels, et le temps nécessaire à la synthèse de nouvelles enzymes (inductibles) nécessaires pour métaboliser les substrats présents dans le milieu.

Phase exponentielle (log): La phase de croissance exponentielle est un schéma de croissance équilibrée dans lequel toutes les cellules se divisent régulièrement par fission binaire et se développent par progression géométrique. Les cellules se divisent à une vitesse constante en fonction de la composition du milieu de croissance et des conditions d'incubation. Le taux de croissance exponentielle d'une culture bactérienne est exprimé par le temps de génération (G). Il est défini comme le temps (t) par génération (n = nombre de générations). Par conséquent, $G = t / n$ est l'équation à partir de laquelle les calculs du temps de génération sont dérivés.

Phase stationnaire : La croissance exponentielle ne peut pas être poursuivie indéfiniment dans une culture discontinue (par exemple, un système fermé tel qu'un tube à essai ou un ballon). La croissance de la population est limitée par l'un des trois facteurs suivants : l'épuisement des éléments nutritifs disponibles, l'accumulation de métabolites inhibiteurs ou de produits finis, l'épuisement de l'espace, appelé ici "manque d'espace biologique".

Pendant la phase stationnaire, si les cellules viables sont comptées, il est impossible de déterminer si certaines cellules meurent et si un nombre égal de cellules se divisent ou si la population de cellules a tout simplement cessé de croître et de se diviser. La phase stationnaire, comme la phase de latence, n'est pas nécessairement une période de repos. Les bactéries qui produisent des métabolites secondaires, tels que les antibiotiques, le font pendant la phase stationnaire du cycle de croissance (les métabolites secondaires sont définis comme les métabolites produits après le stade de croissance actif). C'est pendant la

phase stationnaire que les bactéries sporulées doivent induire ou démasquer l'activité de dizaines de gènes pouvant être impliqués dans le processus de sporulation.

Phase de déclin : Si l'incubation se poursuit une fois que la population a atteint la phase stationnaire, il s'ensuit une phase de mort au cours de laquelle la population de cellules viables décline. (Remarque : si le comptage est effectué par des mesures turbidimétriques ou par comptage microscopique, la phase de déclin ne peut pas être observée.). Au cours de la phase de déclin, le nombre de cellules viables diminue de manière exponentielle, essentiellement à l'inverse de la croissance au cours de la phase logarithmique.

3.4 Méthodes d'étude de l'activité antibactérienne des nanoparticules

Afin d'évaluer les activités antimicrobiennes, un certain nombre de techniques expérimentales sont rapportées dans la littérature. En fonction du type d'espèce bactérienne, c'est-à-dire Gram positif ou Gram négatif, et le type de données à extraire un ou plus de techniques sont appliquées afin d'obtenir des résultats précis et significatifs. Dans toutes les méthodes de tests bactériens, les bactéries sont incubées à 37°C dans le milieu de croissance. Cette température de 37°C est choisie car les germes responsables d'infection, de contamination d'origine animale sont capables de s'y multiplier. Selon la technique utilisée, les paramètres comme la concentration minimale d'inhibition (CMI), la zone d'inhibition, le nombre de colonies ou les densités optiques la culture bactérienne sont évaluées.

Un agent antibactérien est considéré comme bactéricide s'il tue les bactéries par une diminution de 5 log de la population bactérienne dans un temps de contact de 5min [202], ou bactériostatique s'il en inhibe la croissance. Différentes méthodes ont été adoptées pour l'évaluation et l'investigation de l'activité antibactérienne in vitro. Ces méthodes comprennent la diffusion sur disque et en puits, la bioluminescence et le décrochage sur plaques.

3.4.1 Méthode de diffusion sur disque

Également appelé test d'antibiotique Kirby-Bauer (test de KB). Dans cette méthode, le milieu gélosé Mueller-Hinton est coulé dans une boîte de Pétri. Le pH du milieu est généralement maintenu autour du pH physiologique de 7.4. Une suspension bactérienne contenant une concentration connue est appliqué sur les milieux gélosés Mueller-Hinton [203-205]. Un volume donné de sols de nanoparticules de ZnO, CuO et TiO₂ est imprégnés sur des disques de papier filtre en utilisant un solvant particulier dans des conditions aseptiques. Après séchage, les disques sont déposés sur les milieux dans les boites de Petri. Un disque imbibé uniquement de solvant est utilisé comme témoin. Ces boites sont incubées pendant 24 h à 37°C dans des conditions optimales de croissance des bactéries. À la suite de l'incubation, aucune croissance bactérienne n'est observée autour du disque jusqu'à une distance dépendant de la concentration des sols chargés de nanoparticules de ZnO, CuO et TiO₂. La concentration minimale à laquelle les nanoparticules présente des activités antimicrobiennes est appelée concentration d'inhibition minimale (CMI) et la zone autour du disque où aucune croissance bactérienne n'est observée et appelée la zone d'inhibition (voir figure 22).

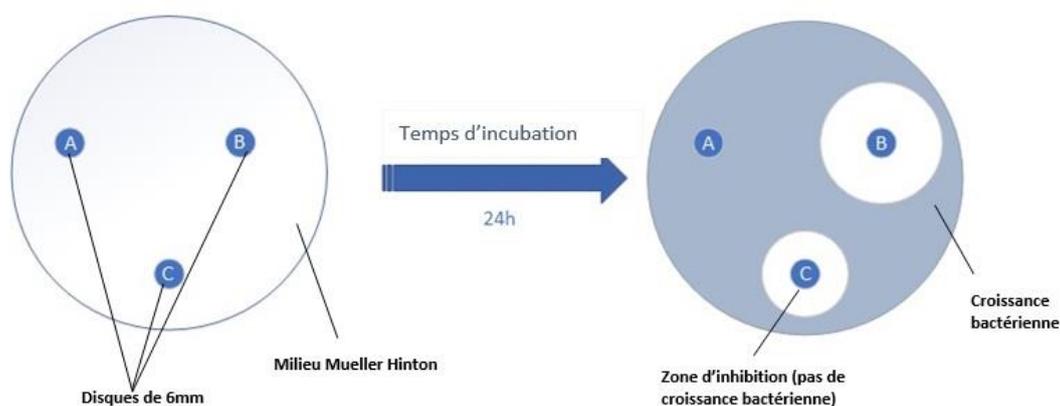


Figure 22: Illustration de la méthode de diffusion sur disques

3.4.2 La méthode de diffusion en puits

La technique pour la formation de milieux agar Mueller-Hinton et la mise en culture est la même que celle de la méthode de diffusion sur disque. Contrairement à la méthode de diffusion de disque, à la place des disques de papier, des puits sont percés dans la gélose. Les puits sont remplis de suspensions des nanoparticules de ZnO, CuO et TiO₂ de concentrations variables. Les CMI sont calculées de la même manière que la méthode de diffusion sur disque [206]. Les conditions aseptiques sont également obligatoires pour maintenir un environnement sans contamination.

3.4.3 La bioluminescence : ATP métrie

3.4.3.1 *L'ATP en tant qu'indicateur de la viabilité cellulaire.*

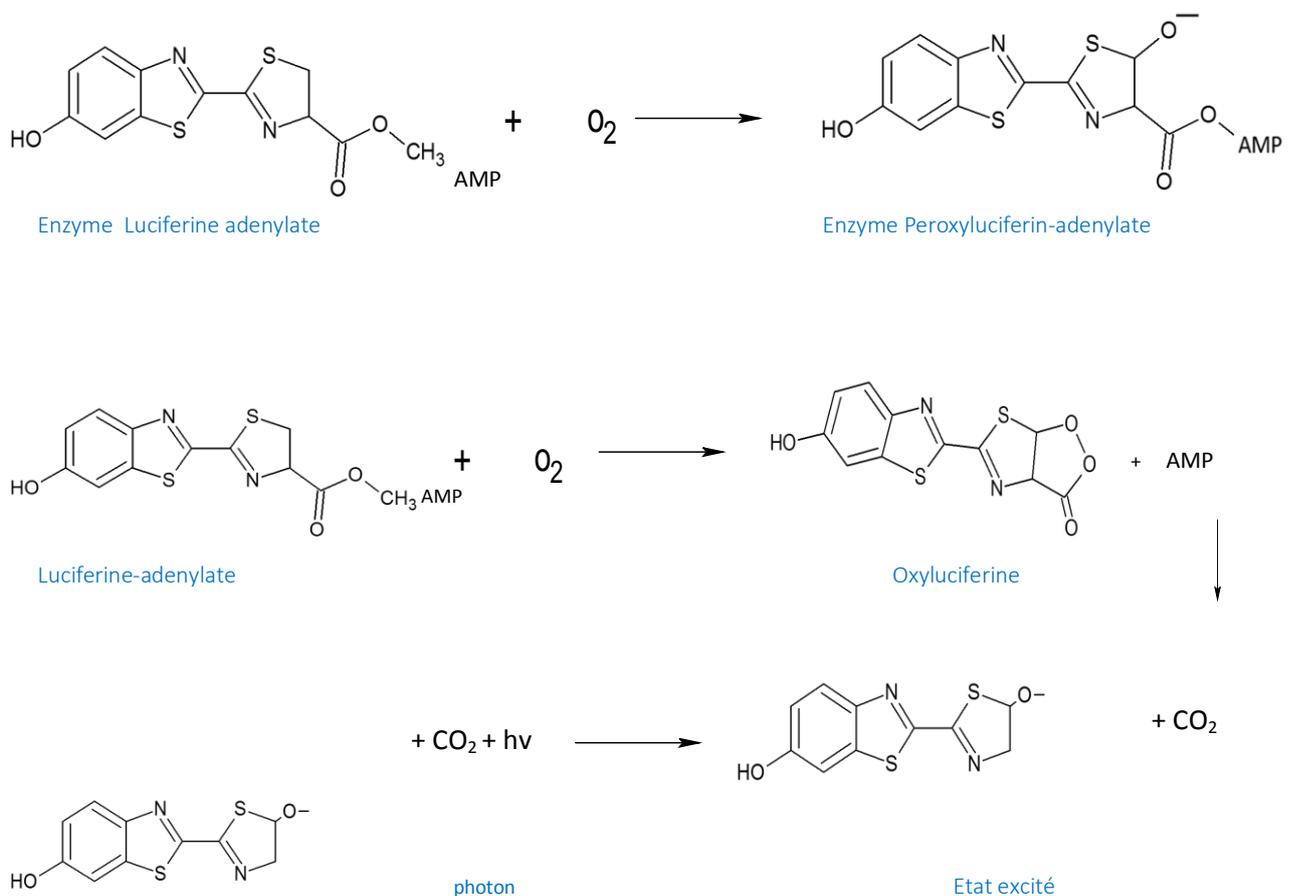
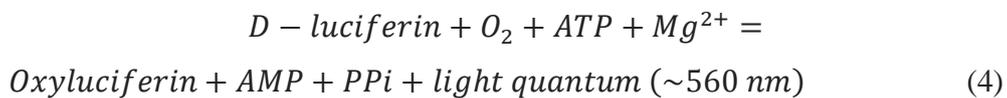
L'adénosine triphosphate est un nucléotide, un ester d'adénosine triphosphate dérivé de l'adénine et du ribose (ATP). Il est le principal vecteur d'énergie dans les cellules de tous les organismes vivants (mammifères, microorganismes, plantes, etc.). Le clivage d'un ou deux groupes phosphate qui se produit pendant l'hydrolyse de l'ATP s'accompagne d'un dégagement d'énergie. Dans les cellules, l'ATP transfère l'énergie à d'autres molécules lors de l'hydrolyse en ses analogues à basse énergie (ADP et / ou AMP), qui acquièrent de l'énergie en ajoutant des groupes phosphate et en se transformant en ATP. La teneur en ATP intracellulaire est le principal indicateur de la viabilité cellulaire [207]. Lors de la mort cellulaire, la synthèse de l'ATP est la première à être arrêtée, tandis que son hydrolyse peut continuer pendant un certain temps, de sorte que la teneur en ATP intracellulaire chute brusquement à zéro. La teneur en ATP dans les cellules viables de micro-organismes est assez élevée elle varie de 500 à 10 000 µg par g de biomasse sèche ou de 10⁻¹⁹ à 10⁻¹⁵ moles d'ATP par cellule. Il peut varier en fonction du type et de la taille des cellules et de leur état physiologique. La réponse cellulaire à tout stress implique une modification du contenu en ATP intracellulaire. La concentration en ATP intracellulaire peut également varier en fonction des conditions de culture, mais les modifications physiologiques ne conduisant pas à la mort cellulaire. Dans le cas de souches pures, il a été montré que la teneur en ATP intracellulaire d'une suspension cellulaire dans des conditions standard est proportionnelle à la concentration de cellules dans la suspension. Par conséquent, il est possible d'estimer le

nombre de cellules viables dans un échantillon en mesurant la concentration en ATP intracellulaire [208].

3.4.3.2 Détermination de la concentration en ATP par dosage de bioluminescence.

Il existe différentes méthodes pour déterminer la concentration en ATP : méthodes enzymatiques avec détection spectrophotométrique, méthodes radioactives et chromatographiques. Le test de bioluminescence ATP est le plus sensible, rapide et sélectif. Dès les années 1940, il était prouvé que l'ATP était un élément essentiel de la réaction catalysée par l'enzyme luciférase de la luciole [209].

La réaction globale qui se produit dans le système luciférine-luciférase des lucioles est décrite par le mécanisme réactionnel suivant :



Selon la réaction (4), un substrat organique (luciférine) est rapidement oxydé en présence d'ions ATP et de magnésium par l'oxygène de l'air en oxyluciférine avec formation simultanée de pyrophosphate (PPi) et d'AMP. Il y a formation de l'oxyluciférine dans un état excité électroniquement et un quantum de lumière est émis lors du transfert du produit dans l'état fondamental. Les avantages de la luciférase de luciole comprennent sa spécificité absolue vis-à-vis de l'ATP et son rendement quantique d'émission élevé (0,5, le plus élevé des systèmes de bioluminescence connus). Les luminomètres - des instruments spécialisés qui ont été introduits sur le marché dans les années 1970 sont utilisés pour les mesures de bioluminescence. Les premiers luminomètres étaient basés sur la technologie développée pour la détection des compteurs à scintillation liquide à émission radioactive. Finalement, une autre approche a été développée : un compteur de photons associé à un tube photomultiplicateur (PMT) à haute efficacité est utilisé dans les instruments modernes de détection du signal de luminescence. Il est à noter que le signal enregistré par un luminomètre est proportionnel mais pas égal au nombre de photons émis par l'échantillon. Le signal est présenté en unités de luminescence relative (RLU). Sa valeur absolue est déterminée par les paramètres de l'instrument en question et peut différer même pour les luminomètres du même modèle. L'intensité lumineuse enregistrée en RLU est proportionnelle à la concentration en ATP dans la plage linéaire de l'ATP allant de 10 fM à 1 μ M. Il existe une grande variété de luminomètres modernes qui diffèrent par de nombreux paramètres : sensibilité, type (luminomètres à tube et lecteurs de plaque), taille et complexité de conception (stationnaire et portable), disponibilité ou non des injecteurs.

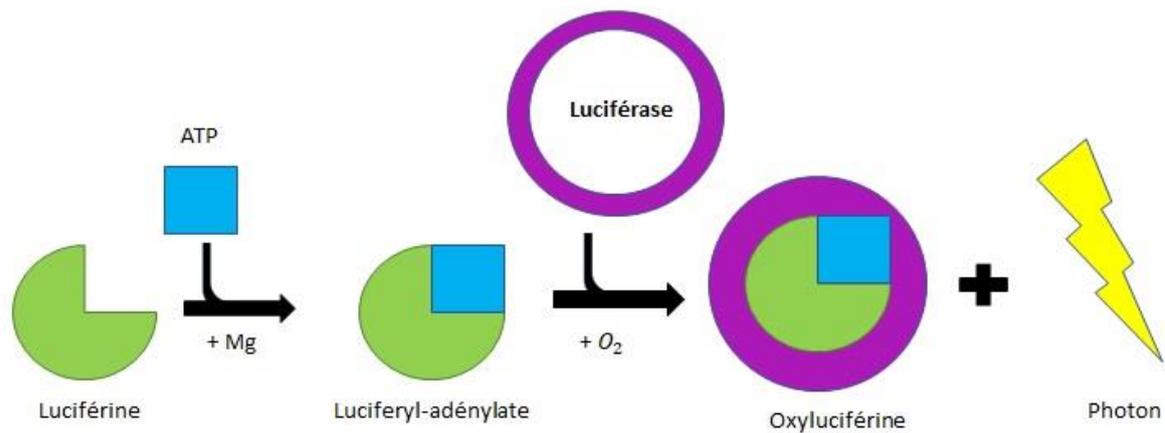


Figure 23: Principe de la méthode bioluminescence

3.4.4 Méthode de décrochage sur lames (porte-germes)

Dans le cadre de l'étude de l'activité antibactérienne des nanoparticules sous forme de couches minces sur des substrats de verre, une méthode de décrochage des bactéries sur les lames a été développée en s'inspirant de la norme Française NF EN 14561[202] (annexe 1). La plupart des bactéries ont la capacité d'adhérer à une surface via un mécanisme d'adhésion en sécrétant un réseau de fibre polysaccharidiques. Afin d'améliorer le comptage de la viabilité bactérienne, il est donc nécessaire de procéder à un « décrochage » des bactéries par clivage des liaisons et des chaînes polysaccharidiques. Pour ce faire, la méthode adoptée comporte deux techniques de décrochage : méthode physique (agitation vortex) et chimique (détergents et chélateurs).

Le principe de cette méthode repose sur le fait d'étaler une suspension bactérienne à 10^5 UFC/mL sur un porte germe en verre. Après séchage à l'étuve à 37°C pendant 60 min, le porte germe est immergé dans une solution d'agent chimique qui va permettre de décoller les bactéries de la surface du porte germe, suivi d'un traitement physique abrasif (bille de verre + agitation vortex) pour compléter l'opération de décrochage. La solution subit ensuite deux dilutions successives, le porte germe est également mis dans une boîte de pétri avec de la gélose en surfusion puis incubé à 37°C pendant 24h. Après l'incubation, les microorganismes viables et cultivables sont alors dénombrés.

3.5 Méthode de caractérisation des nanomatériaux

Afin de caractériser à la fois les nanoparticules en solution, les dépôts et les poudres générées après la précipitation du sol, des méthodes de caractérisation ont été utilisées. Nous avons utilisé des méthodes thermique (ATD/ATG), les méthodes de microscopie (AFM, MEB, MEB-EDX, MET) et de diffraction des rayons X suivie par les méthodes spectroscopiques Raman. Des analyses de l'activité antimicrobiennes sont aussi réalisés.

3.5.1 Analyse thermogravimétrique (ATG) et analyse thermique différentielle (ATD)

L'analyse thermogravimétrique (ATG), en anglais *Thermogravimetric Analysis* (TGA), est une technique d'analyse thermique qui consiste à la mesure de la variation de masse d'un échantillon en fonction de la température imposée.

L'analyse thermique différentielle (ATD), en anglais *Differential Thermal Analysis* (DTA), est une technique d'analyse thermique qui consiste à suivre l'évolution de la différence de température entre l'échantillon étudié et un corps témoin inerte, sous atmosphère contrôlées d'où l'étude des transformations endothermiques ou exothermiques d'un matériau (fusion, solidification, déshydratation, transitions, oxydation, décomposition).

L'étude des comportements thermiques des gels ZnO, CuO et TiO₂ ont été effectués sur un appareil SETARAM TG92 qui fonctionne simultanément en analyse thermogravimétriques et en analyse thermique différentielle. La température maximale d'utilisation du four est de 1000°C, la vitesse de chauffe peut varier entre 0.1 et 50 °C/min et la quantité d'échantillon étudié est de l'ordre de 20 mg.

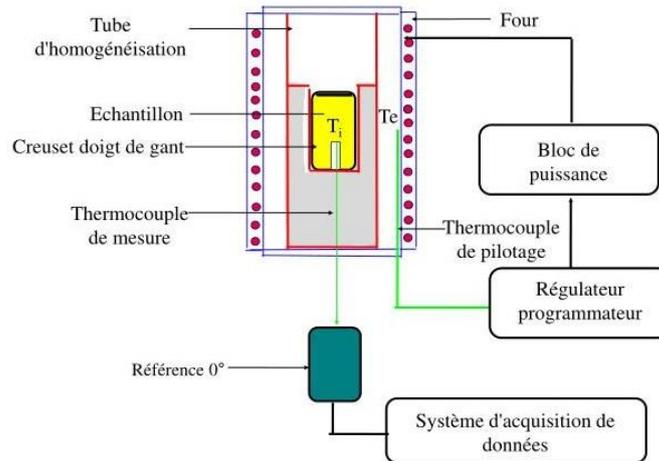


Figure 24: Montage d'un appareil d'analyse thermique différentielle [210]

3.5.2 Microscopie électronique à balayage (MEB)

La microscopie électronique à balayage (MEB ou SEM de l'anglais Scanning Electron Microscopy) est une technique capable de produire des images de la surface d'un échantillon en utilisant le principe des interactions électrons-matière (Figure 25). Un faisceau d'électrons est focalisé sur la surface du matériau observé à l'aide d'un jeu de lentilles électromagnétiques entraînant l'émission d'électrons depuis le matériau irradié. Un détecteur va capter ces électrons émis et retranscrire un signal modulé par le nombre d'électrons reçus depuis un point d'impact du faisceau. Pour former une image, le faisceau va balayer une zone de l'échantillon afin que les différents points d'impact forment chacun un point de l'image obtenue [211].

Les images de microscopie électronique à balayage, présentées dans ce travail ont été réalisées au Laboratoire des Sciences des Procédés et des Matériaux, LSPM, sur un microscope de type Zeiss Supra 40VP et Leica 440 avec une tension d'accélération variant entre 1 et 30 kV. Pour les supports en plaque de verre qui ne sont pas conductrices, des dépôts de Au/Pd de 10 nm ou de carbone de 3 nm d'épaisseur ont été effectués avant le passage à l'imagerie. Le pouvoir de résolution dans les conditions d'utilisation normales est de 2 nm pour le MEB FEG (microscopie électronique à balayage équipé d'un canon à effet de champ) et de 25 nm pour le MEB classique. La microscopie électronique à balayage nous informe sur la morphologie de surface des films.

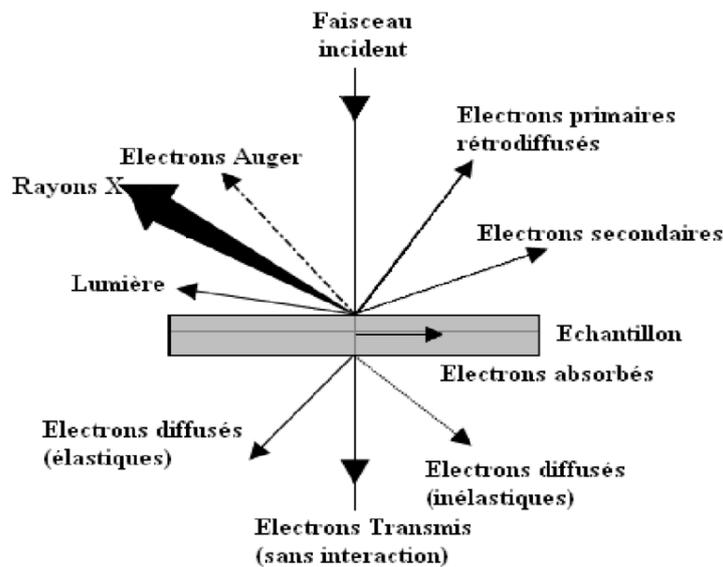


Figure 25: Représentation schématique de l'interaction entre un faisceau d'électrons et la surface d'un échantillon [212]

3.5.3 Microscopie électronique à balayage et énergie dispersive de rayon X (MEB-EDX)

A la fois technique de contrôle de routine et méthode puissante d'investigation, la Microscopie Electronique à Balayage (MEB) HITACHI TM 3000 est un outil extrêmement polyvalent pour l'étude des surfaces et des structures fines associée à la microanalyse par Energie Dispersive de rayons X (EDX) SwiftE d 3000 qui permet une analyse locale ou globale des matériaux les plus divers. De plus, cette technique EDX permet de réaliser une analyse quantitative aussi bien sur échantillons massifs de quelques centimètres carrés que sur des fragments, particules ou résidus de quelques dixièmes de millimètre. L'échantillon à étudier est placé sous vide, un faisceau d'électrons est balayé à travers la surface et une image de la surface est produite, en plus, une microanalyse chimique élémentaire de la surface de l'objet par la méthode EDX.

3.5.4 Microscopie électronique en transmission (MET)

La technique de microscopie électronique en transmission (MET ou TEM, de l'anglais Transmission Electronic Microscopy) est utilisée pour l'analyse de la microstructure des matériaux avec une résolution pouvant aller jusqu'à quelques Angstroms. Elle est basée sur le principe de diffraction des électrons. Les interactions entre ces électrons et les atomes constituant le matériau conduisent non seulement à une imagerie de la structure interne du

matériau (mode image) mais aussi à des indications sur la taille et la forme des grains. Elle peut être utilisée en mode de diffraction électronique (mode diffraction ou SAED, de l'anglais Selected Area Electron Diffraction), donnant des informations sur la structure cristallographique du matériau à l'échelle locale. Par ailleurs, en analysant la perte d'énergie des électrons diffusés, il est possible d'obtenir une image filtrée de l'échantillon. Cette technique spectroscopique des pertes d'énergie connue sous son acronyme anglais « Electron Energy Loss Spectroscopy, EELS » utilise un filtre d'énergie qui permet de réaliser des images correspondant à une fenêtre bien définie dans le spectre de perte d'énergie. Une zone claire sur l'image correspondra à une région de l'échantillon diffusant les électrons. Une caméra CCD slow-scan placée après le spectromètre et le détecteur permet alors d'enregistrer l'image filtrée correspondante.

Le microscope en transmission utilisé dans ce travail est un JEOL 2011 équipé d'un filtre GIF 200. GATAN. Les observations ont été faites avec une tension d'accélération de 200 keV. Les échantillons ont été broyés et préparés en suspension dans un solvant (isopropanol) par ultrasons avant d'être déposés à la surface d'une grille d'observation en cuivre recouverts d'un film de polymère et de carbone (quelques nanomètres).

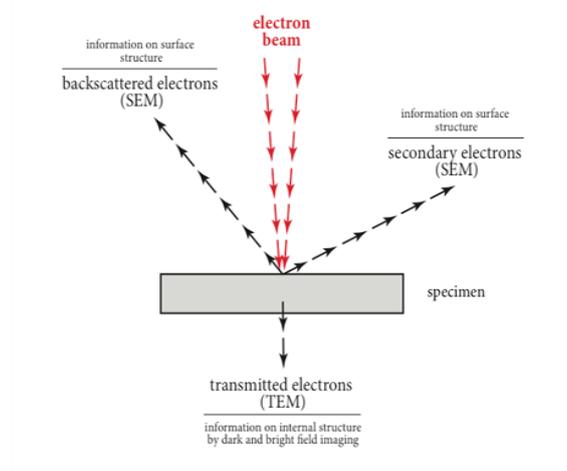


Figure 26: Principe de la microscopie à transmission [213]

Dans ce travail, les analyses par diffraction des rayons X sont réalisées sur un diffractomètre XRG 3000 INEL au laboratoire LSPM. Elles permettent d'identifier les phases cristallines. Ce

3.5.5 Spectroscopie Raman

Les propriétés structurales des matériaux étudiés ont été analysées également par spectroscopie *Raman*. C'est une méthode d'analyse non destructive, basée sur la détection des photons diffusés inélastiquement suite à l'interaction de l'échantillon avec un faisceau de lumière monochromatique. La différence de fréquence entre photon exciteur et photon diffusé renseigne sur la nature chimique de la molécule à l'origine de la diffusion. Il est à noter que la position des raies Raman est indépendante de la fréquence et de la puissance du laser choisi. Cependant un laser trop puissant peut entraîner un échauffement local de l'échantillon et être à l'origine du déplacement et de l'élargissement des pics.

Un faisceau de lumière monochromatique produit par un laser est focalisé sur l'échantillon à analyser. On enregistre :

- Une partie de la lumière est diffusée à la même fréquence que la radiation incidente, c'est la diffusion Rayleigh (diffusion élastique).
- Une partie infime des photons incidents est diffusée avec changement de fréquence. Ce processus est la diffusion Raman (diffusion inélastique) qui représente environ 1 photo, Raman pour 10⁸ photons incidents.

La diffusion inélastique s'accompagne soit de la création soit de l'annihilation d'une vibration (phonon dans un cristal). Ces deux types de diffusion sont respectivement désignés diffusion *Stokes* et anti-*Stokes*. La figure 27 présente le principe de la diffusion de Rayleigh, diffusion *Stokes* et la diffusion anti-*Stokes*.

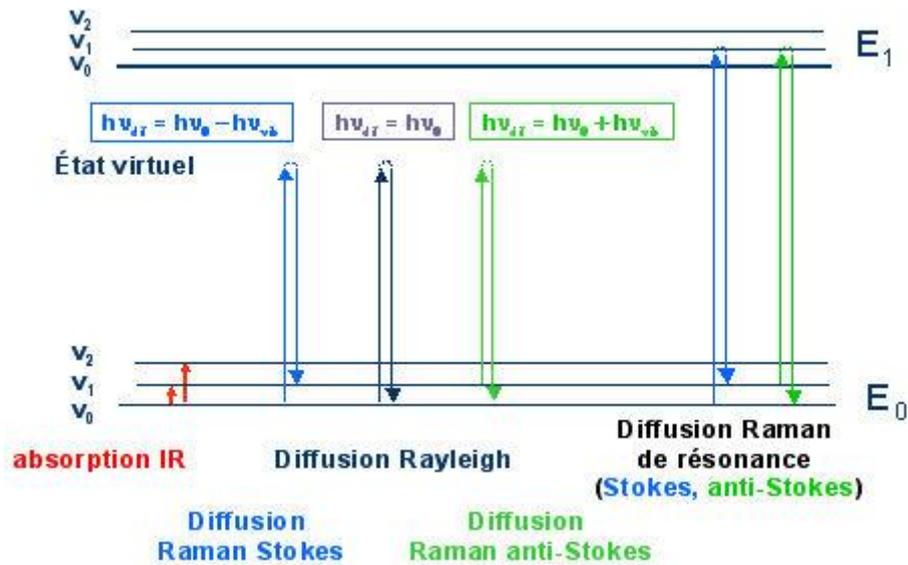


Figure 27: Mécanisme de diffusion Rayleigh et Raman [216]

Les spectres Raman des échantillons préparés ont été mesurés au laboratoire à l'aide du spectromètre HR800 (HORIBA Jobin Yvon) de résolution spectrale et spatiale égale à $0,25 \text{ cm}^{-1}$ et $\sim 5 \mu\text{m}$ respectivement. Il est équipé d'une platine motorisée X-Y, un système de fentes confocales d'ouverture réglable et une caméra CCD Peltier-cooled. La fréquence Rayleigh est coupée grâce à des filtres Notch. Les longueurs d'onde d'excitation pouvant être utilisées sont $632,8 \text{ nm}$ grâce à un Laser He/Ne incorporé à l'appareil et $514,488$ et $363,8 \text{ nm}$ grâce à des filtres couplés à un Laser à Argon ionisé.

3.5.6 Diffusion dynamique de la lumière

La diffusion dynamique de la lumière (DLS, également connue sous le nom de spectroscopie de corrélation photonique ou diffusion de lumière quasi-élastique) est l'une des techniques de diffusion de la lumière les plus populaires car elle permet le dimensionnement des particules jusqu'à 1 nm de diamètre. Les applications typiques sont les émulsions, les micelles, les polymères, les protéines, les nanoparticules ou les colloïdes. Le principe de base est simple : l'échantillon est éclairé par un faisceau laser et les fluctuations de la lumière diffusée sont détectées à un angle de diffusion connu θ par un détecteur de photons rapides.

Les instruments DLS simples qui mesurent à un angle fixe peuvent déterminer la taille moyenne des particules dans une plage de taille limitée. Des instruments multi-angles plus élaborés peuvent déterminer la distribution complète de la taille des particules.

D'un point de vue microscopique, les particules dispersent la lumière et impriment ainsi des informations sur leur mouvement. L'analyse de la fluctuation de la lumière diffusée donne ainsi des informations sur les particules. Expérimentalement, on caractérise les fluctuations d'intensité en calculant la fonction de corrélation d'intensité $g_2(t)$, dont l'analyse fournit le coefficient de diffusion des particules (également connu sous le nom de constante de diffusion).

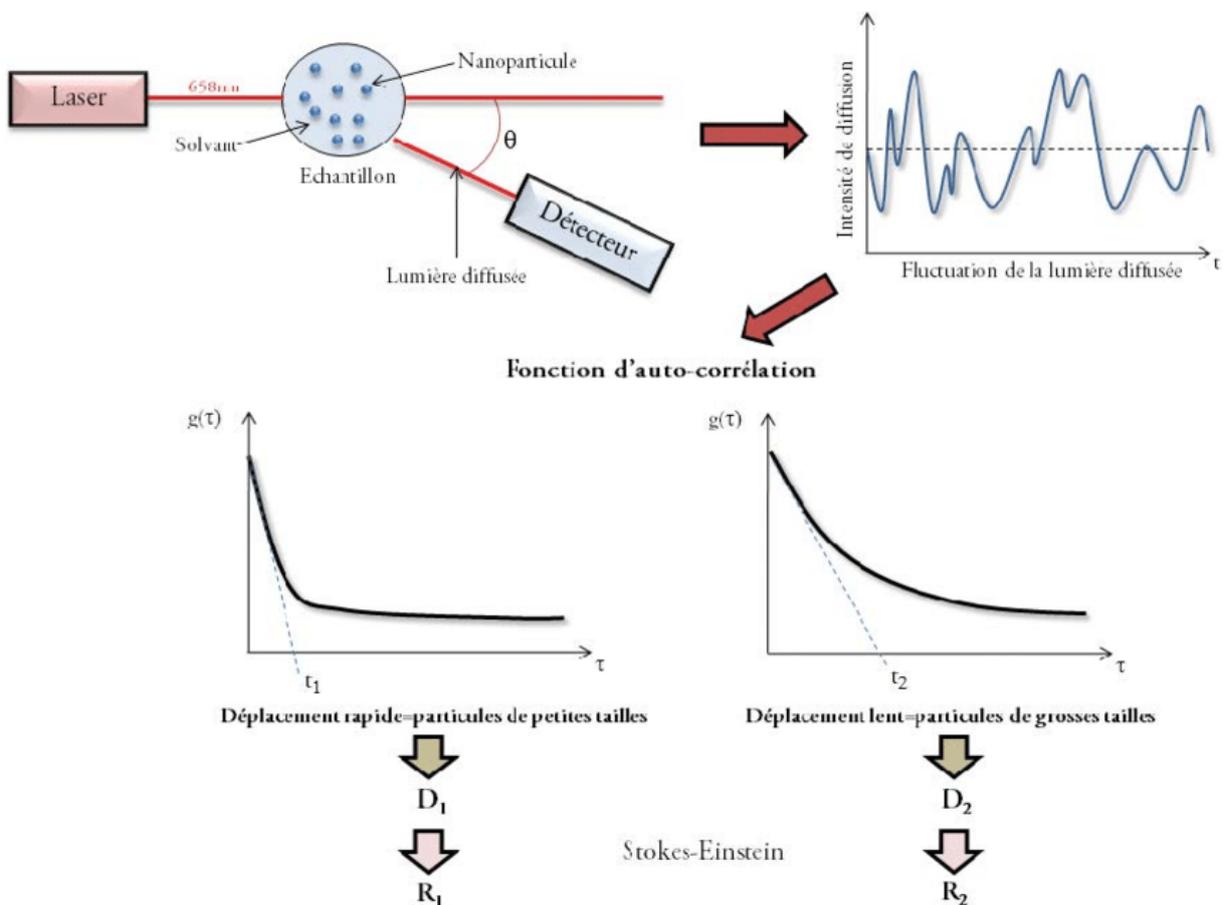


Figure 28: Schéma du principe de la diffusion dynamique de la lumière

Qualité de mesure

La qualité d'une mesure DLS dépend de plusieurs facteurs. Certains évidents, tels que la qualité des composants (le laser, le détecteur, le corrélateur ...), d'autres facteurs ne sont

pas aussi simples mais peuvent influencer la mesure de manière significative. Certains points importants à considérer sont énumérés ci-dessous.

L'angle de diffusion

Le taux de décroissance dépend du vecteur d'onde et donc de l'angle de diffusion. Les particules de différentes tailles se dispersent avec des intensités différentes en fonction de l'angle de diffusion. Ainsi, il existe un angle de détection optimal pour chaque taille de particule. Une analyse de haute qualité doit toujours être effectuée à plusieurs angles de diffusion (DLS multiangle). Ceci devient encore plus important dans le cas d'échantillons polydispersés avec une distribution granulométrique inconnue car à certains angles, l'intensité de diffusion de certaines particules submergera complètement le signal de diffusion faible des autres particules, les rendant ainsi invisibles à l'analyse des données selon cet angle.

Les instruments DLS travaillant exclusivement à un angle fixe ne peuvent donner de bons résultats que pour certaines particules. Par conséquent, une attention particulière devrait être accordée en considérant la précision d'un instrument DLS annoncé. Pour ces instruments à angle fixe, de telles indications ne sont vraies que pour certaines particules.

Diffusion multiple

La théorie de la diffusion dynamique de la lumière n'est valable que pour une seule lumière diffusée. Comme toutes les méthodes de diffusion, l'interprétation devient extrêmement difficile pour les systèmes ayant des contributions non négligeables provenant de la diffusion multiple. Des contributions déjà faibles de diffusion multiple peuvent entraîner de grandes erreurs d'analyse. En particulier pour les particules plus grosses avec un contraste de diffusion élevé, ceci limite la technique à de très faibles concentrations de particules. Une grande variété de systèmes est donc exclue des études avec diffusion de lumière dynamique conventionnelle. Cependant, il est possible de supprimer la diffusion multiple dans DLS via l'approche d'intercorrélation. L'idée générale est d'isoler la lumière diffusée séparément et de supprimer les contributions non souhaitées de la diffusion multiple dans une expérience

DLS. Différentes implémentations de diffusion de lumière à corrélation croisée ont été développées et appliquées. Actuellement, le schéma le plus efficace est la méthode de corrélation croisée 3D. La même méthode peut également être utilisée pour corriger les données de diffusion de lumière statique (SLS) pour des contributions de diffusion multiples. Alternativement, dans la limite de la diffusion multiple forte, une variante de la diffusion dynamique de la lumière appelée Spectroscopie à ondes de diffusion (DWS) peut être appliquée.

3.5.7 MasterSizer : Laser Doppler Electrophorèse

De nombreuses nanoparticules ou particules colloïdales présentent une charge de surface lorsqu'elles sont en suspension. Lorsqu'un champ électrique est appliqué, les particules se déplacent en raison de l'interaction entre la particule chargée et le champ appliqué. La direction et la vitesse du mouvement sont fonction de la charge des particules, du milieu de suspension et de l'intensité du champ électrique. La vitesse des particules est ensuite mesurée en observant le décalage Doppler dans la lumière diffusée. La vitesse de la particule est proportionnelle au potentiel électrique de la particule dans le plan de cisaillement qui est le potentiel zêta. Ainsi, cette mesure optique du mouvement des particules sous un champ appliqué peut être utilisée pour déterminer le potentiel zêta.

Le mouvement des particules sous un champ électrique appliqué est appelé électrophorèse. La méthode utilisée par SZ100 est connue sous le nom d'électrophorèse Doppler au laser. Les particules d'échantillon sont mises en suspension dans un solvant d'indice de réfraction connu n , de vitesse η et de constante diélectrique ϵ . L'échantillon est irradié avec une lumière laser de longueur d'onde λ . Un champ électrique d'intensité E est appliqué. En raison du champ électrique, les particules se déplacent. Comme les particules se déplacent, la lumière diffusée à l'angle est mesurée et la vitesse de la particule V est déterminée à partir du décalage de fréquence. La mobilité est alors facilement obtenue par la ratio de la vitesse à l'intensité du champ électrique V / E . La mobilité du potentiel zêta est ensuite déterminé à l'aide d'un modèle, dont le plus courant est le modèle de Smulochowski.

Chapitre 3 : Elaboration et caractérisation des
nanodépôts d'oxyde de zinc (ZnO), d'oxyde de cuivre
(CuO) et du dioxyde de titane (TiO₂)

4 Elaboration et caractérisation des nanodépôts d'oxyde de zinc (ZnO), d'oxyde de cuivre (CuO) et du dioxyde de titane (TiO₂).

Ce chapitre est consacré à l'élaboration des nanoparticules de ZnO, CuO et de TiO₂ par voie sol-gel ainsi que la réalisation des nanodépôts sur des substrats de verre. Il comporte également leur analyse et leur caractérisation structurale.

Produits chimiques

Les produits chimiques utilisés pour les dépôts de ZnO, CuO et de TiO₂ sont présentés dans le tableau 3.

Tableau 3 : Produits chimiques, leur propriétés physico chimiques et leur provenance

Produits Chimiques	Sources	Risques
Isopropanol CH ₃ CH(OH)-CH ₃ , pureté 99.5% Masse molaire = 60,1 g/mol	Sigma Aldrich N°CAS :67-63-0	
Acide sulfurique H ₂ SO ₄ , pureté 96 % Masse molaire = 98,08 g/mol	Panreac N°CAS :7664-93-9	
Monoethanolamine (MEA) H ₂ N-CH ₂ -CH ₂ -OH, pureté 99% Masse molaire = 61,08 g/mol	Fluka analytical N°CAS :141-43-5	
Acétate de zinc dihydraté Zn (CH ₃ -COO) ₂ , 2H ₂ O, pureté 99% Masse molaire = 219,51 g/mol	Sigma Aldrich N°CAS :5970-45-6	
Acétate de Cuivre monohydraté Cu (CH ₃ -COO) ₂ , H ₂ O, pureté 98% Masse molaire = 199,65 g/mol	Merck N° CAS : 142-71-2	

Tétralsopropoxyde de titane (TTIP) $\text{Ti} [\text{OCH}(\text{CH}_3)_2]_4$, pureté 97% Masse molaire = 284,22 g/mol	Sigma Aldrich N°CAS : 546-68-9	
---	-----------------------------------	---

L'élaboration des couches minces s'effectue selon trois étapes principales : la préparation des solutions, le dépôt des couches minces et le traitement thermique des échantillons.

4.1 Elaboration de couches minces de ZnO, CuO et TiO_2

4.1.1 Préparation des substrats

L'étape de préparation de la surface du substrat est primordiale pour la qualité des couches minces : adhérence, stabilité mécanique et homogénéité.

D'une façon générale, les supports choisis doivent :

- Faciliter l'interaction du matériau avec les irradiations lumineuses
- Être chimiquement et photo-chimiquement inertes.

Notre choix de support c'est porté sur les plaquettes de verre (76 mm x 26 mm, épaisseur = 1,1 mm RS France). Cela est dicté d'une part, par l'adaptation de leurs formes et leurs dimensions à l'appareil de dip-coater utilisé et d'autre part, par la présence des groupements $-\text{OH}$ surfaciques permettant une bonne adhésion des sols en formant des liaisons chimiques covalentes. Les couches minces déposées sur ces substrats sont à la fois utilisées pour les méthodes de caractérisation structurale et pour la réalisation des tests d'activités antibactériennes.

4.1.2 Traitements des substrats

Afin d'éviter toute contamination chimique par les résidus halogénés et pour préparer la surface des supports à accepter les nano-sols, un traitement chimique de la surface des substrats s'avère nécessaire. Au début, les plaques ont été lavés par le savon, puis décapées avec l'acide sulfurique (H_2SO_4) à 96% qui permet d'éliminer les impuretés de surface des substrats qui sont connues comme inhibiteurs de réactions chimiques. Un autre avantage de l'acide sulfurique est sa capacité d'hydrolyse des groupes $-\text{Si}-\text{O}-\text{Si}-\text{O}-\text{Si}-$ du support

permettant d'augmenter la densité surfacique des fonctions Si-OH nécessaires à la réalisation des liaisons covalentes entre matériau le substrat.

Le mode opératoire adopté est le suivant :

- i) Introduction d'environ 10 plaquettes de verre préalablement lavées au savon dans un bécher contenant de l'acide sulfurique H_2SO_4 à 96% pendant 1 heure.
- ii) Lavage des plaquettes à l'eau distillée trois fois jusqu'à un pH de 7.
- iii) Séchage à l'étuve à $80^\circ C$ pendant 24h.

Les substrats traités sont ensuite stockés dans des flacons fermés hermétiquement et sont utilisés au maximum pendant 4 semaines afin d'éviter les contaminations par d'éventuelles impuretés ambiantes.

4.1.3 Synthèse des solutions de ZnO et de CuO

Les solutions sont préparées à l'intérieur d'une boîte à gants à partir de l'acétate de zinc dihydraté et de l'acétate de cuivre monohydraté dissout dans un mélange d'isopropanol et de monoéthanolamine noté MEA utilisés comme solvant et stabilisateur respectivement (figure 29). Les solutions sont agitées à $60^\circ C$ pendant 2 heures pour le ZnO et pendant 4 heures pour le CuO, puis filtrée par un papier filtre après 24 heures de repos. Une gamme de solutions a été préparée tout en variant la concentration des acétates ($0.1 - 1.5 \text{ mol.L}^{-1}$). La nature des solution obtenues est fonction des conditions de vieillissement : temps et température.

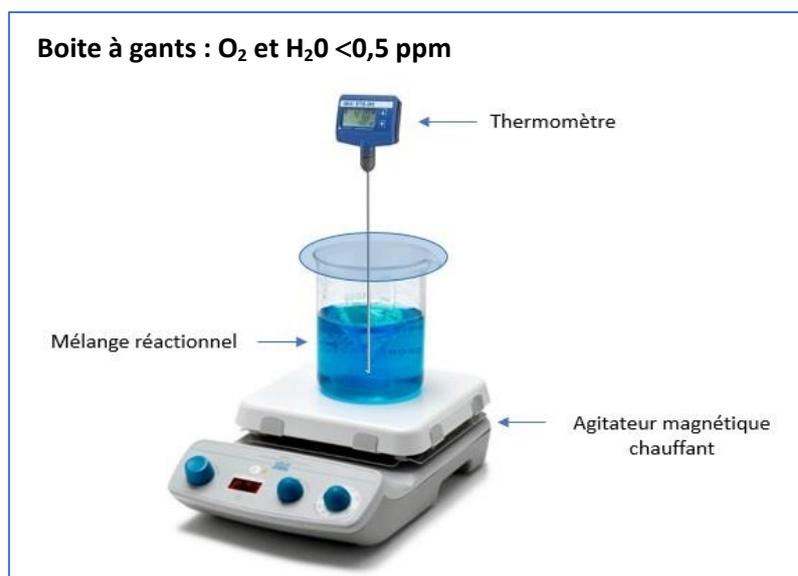
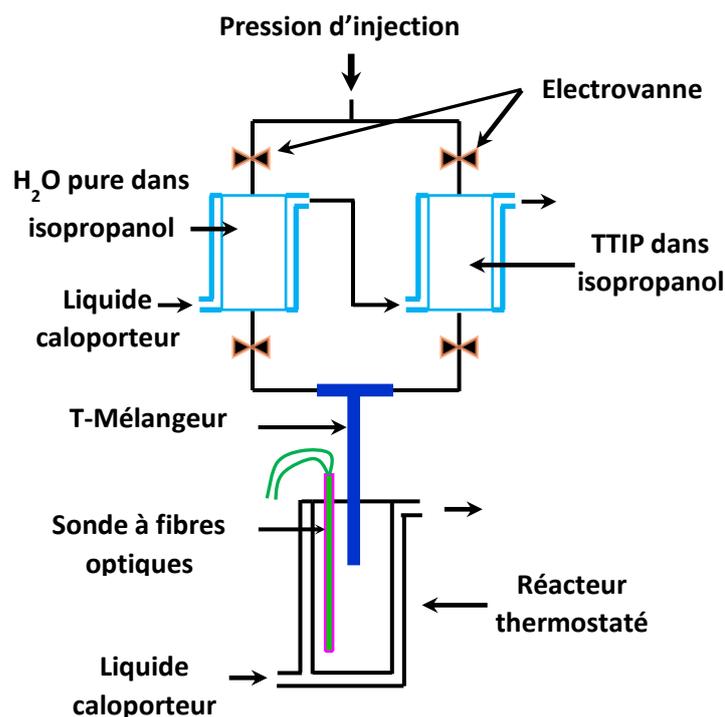


Figure 29: Schéma détaillant le montage utilisé pour la préparation des solutions de ZnO et CuO

4.1.4 Synthèse de la solution de TiO_2

La synthèse du TiO_2 se fait par un réacteur sol-gel à micromélange rapide élaboré par Rivallin et al. [218] en 2005 et ensuite développé plus tard par Azouani et al. [219] en 2010 (Figure 30). Le réacteur contient deux volumes thermostatés à double parois, leur température est régulée par cryostat. Ils ont une contenance de 0.05 dm^3 chacun : le premier reçoit du tétraisopropoxyde de titanium (TTIP) dans du 2-propanol, et le second quant à lui reçoit de l'eau distillée dans du 2-propanol. Un débit permanent d'Azote permet de mettre le système sous des conditions contrôlées (atmosphère non humide). Les solutions préparées à l'intérieur de la boîte à gants (O_2 et $\text{H}_2\text{O} < 0.5 \text{ ppm}$) sont injectées à l'aide de seringues et entraînées jusqu'au T-mixer, qui est constitué de deux entrées ($D_i = 1 \text{ mm}$ et $L = 20 \text{ mm}$) et une sortie ($D_s = 2 \text{ mm}$ et $L = 200 \text{ mm}$). Le T-mixer a été spécialement conçu afin de permettre la formation de jets d'entrées tangentiels, qui vont quant à eux permettre la formation d'un vortex favorisant le micromélange. Le micromélange est une qualification importante pour les classes de réactions chimiques rapides, quand les échelles de temps de mélange et de réaction sont du même ordre de grandeur. Le temps du micromélange est estimé entre 4 et 8 millisecondes [220]. Le réacteur thermostaté permet de récupérer la solution des nanoparticules ainsi formés. Il est constitué d'une double paroi en verre, où circule à l'intérieur un fluide caloporteur (eau) qui permet de contrôler la température.



En se basant sur les études d'optimisation de ce réacteur [218,219], et en tenant compte de l'effet de la qualité du micromélange sur la taille et la monodispersité de la population des nanoparticules, nous avons utilisé les conditions figurant dans le tableau suivant :

Tableau 4: Conditions expérimentales de la préparation dioxyde de titane

Conditions expérimentales	
Nombre de Reynolds:	4500
Température (°C):	20
Concentration du TTIP (mol/l):	0.146
Taux d'hydrolyse:	2

Le solvant doit présenter une constante diélectrique relativement élevée pour dissoudre les sels minéraux [221-222]. La plupart des alcools sont des solvants dipolaires amphiprotiques à constante diélectrique dépendante de la longueur de la chaîne [223]. Les critères de choix du solvant sont la stabilité et l'homogénéité de la solution obtenue, ce qui va définir la qualité du dépôt. Plus la solution est homogène et stable plus le dépôt est de meilleure qualité. Après leurs préparations, les solutions utilisées pour les dépôts sont mises en contact avec le support sur lequel on souhaite déposer une couche mince. Le mécanisme de l'immobilisation des particules sur le substrat en verre est illustré ci-dessous :

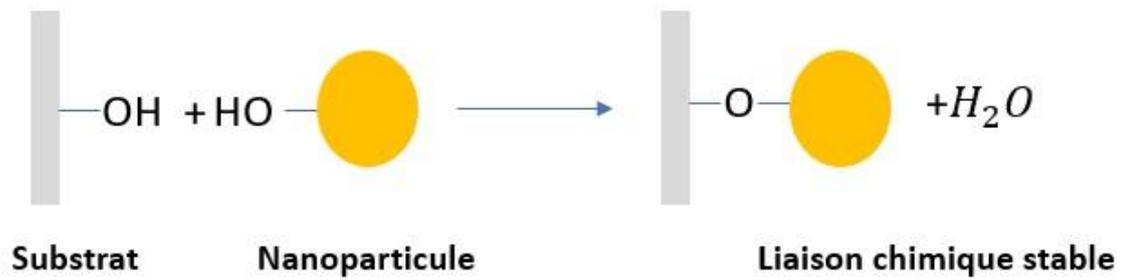


Figure 31: Mécanisme de fixation des nanoparticules sur le substrat

4.1.5 Dépôt de ZnO, CuO et TiO₂

4.1.5.1 Techniques de dépôt

Les deux techniques de dépôt les plus connus pour la réalisation de couches minces avec contrôle de l'épaisseur déposée sont le trempage-retrait (dip-coating) et l'enduction centrifuge (spin-coating). Les deux méthodes sont illustrées par les figures 32 et 33. Ces procédés sont utilisés à température ambiante et pression atmosphérique. Les épaisseurs des films sont contrôlées par la variation de la vitesse de dépôt.

4.1.5.1.1 Dip-coating

Le support propre est immergé dans la solution colloïdale puis retiré lentement, à vitesse constante, afin de former une couche mince uniforme. Cette fixation a lieu grâce à des réactions chimiques avec les sites actifs de la surface du support. Cette propriété est importante car elle permet d'avoir une haute stabilité mécanique des dépôts. L'opération peut être répétée jusqu'à l'obtention de l'épaisseur désirée. Après chaque couche les plaques sont séchées dans l'étuve à 80°C pendant 10 min.

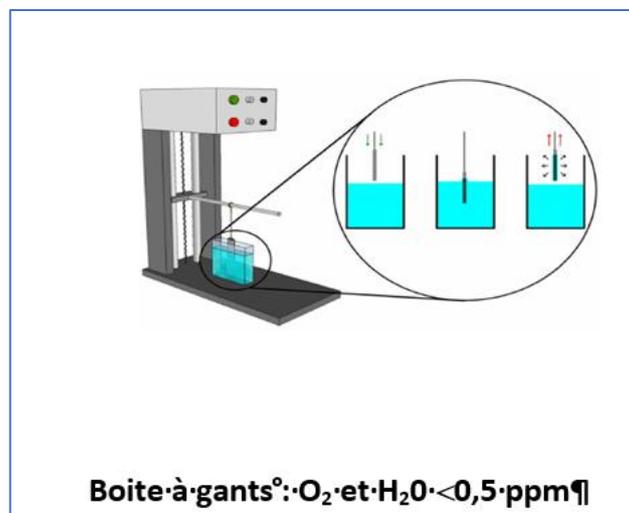


Figure 32: représentation d'un dip-coater

4.1.5.1.2 Spin-Coating

Un volume donné de la solution est placé au centre de la surface du support qui devrait être plate. Le support est alors fixé par succion sur un axe dont la vitesse de rotation permet d'étaler de façon uniforme la solution colloïdale.

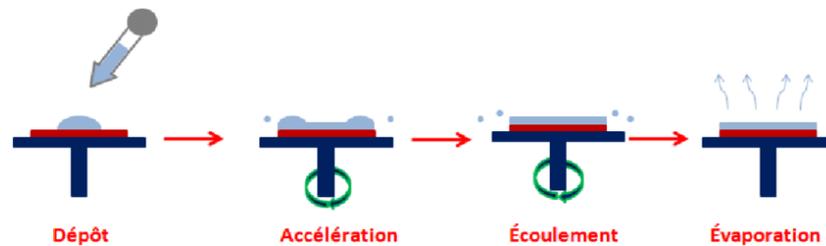


Figure 33: représentation d'un spin-coater

4.1.5.2 Choix d'une technique de dépôt en couche mince

Notre choix entre ces deux méthodes de dépôt a été dicté par plusieurs critères :

- La nature du matériau à déposer,
- La vitesse de dépôt et l'épaisseur de la couche souhaitées,
- Les contraintes imposées par le substrat (dégazage sous vide, température maximale),
- La stœchiométrie désirée,
- La qualité cristalline et la densité des couches,
- L'adhérence du dépôt sur le substrat,
- La reproductibilité et le coût de réalisation.

Nous avons retenu le dip-coating, qui permet d'obtenir un dépôt sur un substrat de verre de plusieurs centimètres carrés et de géométries différentes (contrairement au spin-coating qui dépose sur des substrats de verre de superficie réduite et qui dépend de la taille du porte-échantillon). Il permet également de contrôler la vitesse de dépôt. Le nombre de couches déposées est de 5.

4.1.6 Traitement thermique

Après avoir déposé les particules colloïdales sur le substrat de verre, chaque couche est traitée thermiquement à 80°C dans l'étuve pendant 15 min pour l'évaporation du solvant

puis à 250°C pendant 10 min pour éliminer les résidus organiques. Finalement et après la dernière couche, tout le film est porté à 500°C dans un four électrique CARBOLITE (BHRF7/45B) pendant une heure pour la cristallisation de ZnO, CuO et TiO₂. Le traitement thermique est déterminant pour la structure cristalline du dépôt. La vitesse de chauffage utilisée est de 5°C/min.

Nous avons adopté le protocole expérimental suivant qui est composé de trois phases de traitement thermique des nanodépôts préparés par voie sol-gel :

- La première phase est celle de la montée en température du four jusqu'à la consigne ; elle s'effectue en 2 heures.
- La deuxième phase est le maintien de la température constante pendant 1 heure.
- La dernière phase est celle de la descente en température pour le refroidissement des échantillons jusqu'à la température ambiante.

Le cycle thermique appliqué aux substrats est représenté sur la figure 34.

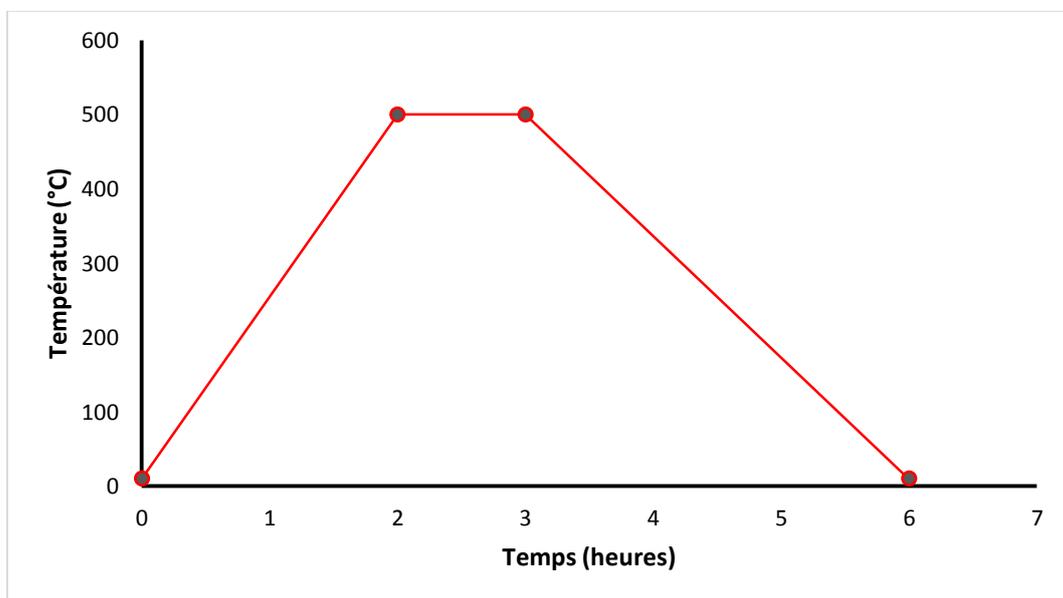


Figure 34: Cycle du traitement thermique

En résumé, les figures 35 et 36 récapitulent l'ensemble des étapes d'élaboration des couches minces de ZnO, CuO et TiO₂.

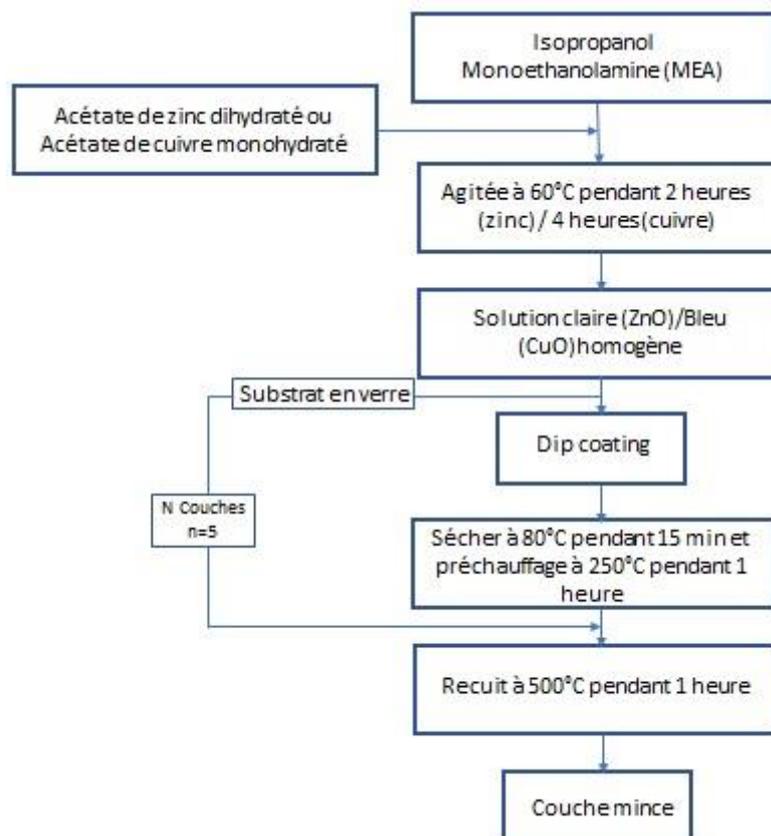


Figure 35: Processus d'élaboration des couches minces de ZnO et de CuO

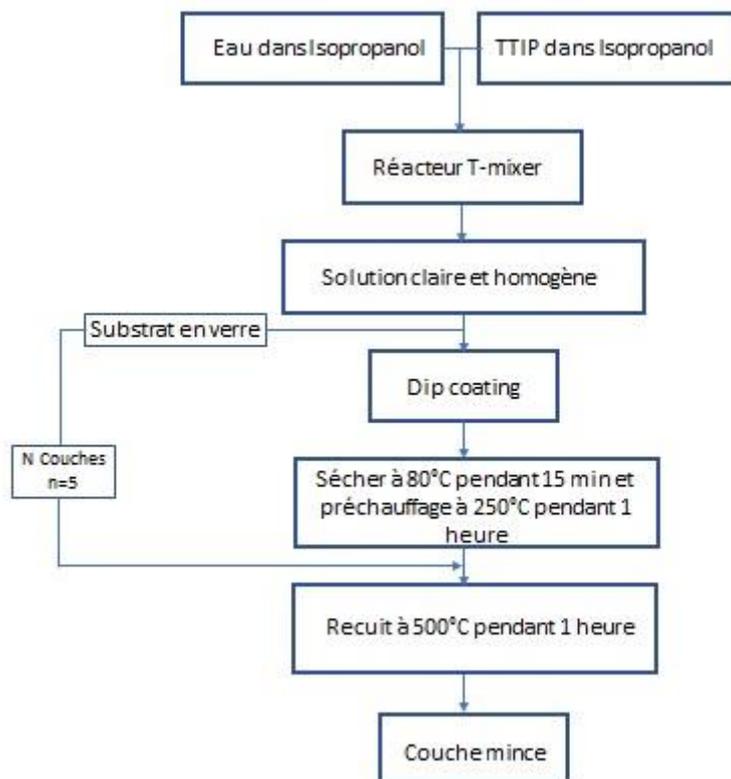


Figure 36 : Processus d'élaboration des couches minces de TiO_2

4.1.7 Préparations des échantillons sous forme de gel et de poudre

La solution du sol restant de l'opération du dip-coating est chauffée à 80°C pendant 24 heures afin d'obtenir une texture gel. Par la suite, la quantité est divisée en deux parties ; la première portion est traitée à 250°C pendant 10 min ce qui densifie davantage la texture du gel. La deuxième partie est traitée à 500°C pendant une heure en vue d'obtenir une poudre.

Les échantillons vont être caractérisés par les microscopies électroniques à balayage, le MEB-EDX, la diffraction des rayons X, l'ATG/ATD et les mesures spectroscopie Raman.

4.2 Caractérisations des nanoparticules

4.2.1 Qualité des plaques

Une étude préliminaire a permis de faire un choix sur le solvant de la solution colloïdale. Seuls l'éthanol et l'isopropanol ont été retenus, car ils permettent de former une solution de sol stable et transparente. Cependant, l'éthanol présente un effet bactéricide

potentiellement plus élevé que l'isopropanol. Il était donc préférable d'opter pour l'isopropanol à 99.5% de pureté, en effet une concentration élevée en alcool ne génèrent pas une efficacité contre les bactéries. Pour avoir un effet antimicrobien, le pourcentage d'eau dans l'alcool doit être assez important, au moins supérieur à 10%. La concentration d'eau est importante car il agit comme un catalyseur et joue un rôle majeur dans la dénaturation des protéines des membranes cellulaires. De plus, la présence d'eau ralentit l'évaporation et augmente le temps de contact de la surface avec la membrane. Au-delà de 91%, l'évaporation est instantanée, ce qui réduit considérablement l'effet de l'alcool.

La figure 37 présente l'ensemble des échantillons de couches minces obtenus par dip coating pour les différents oxydes métalliques.

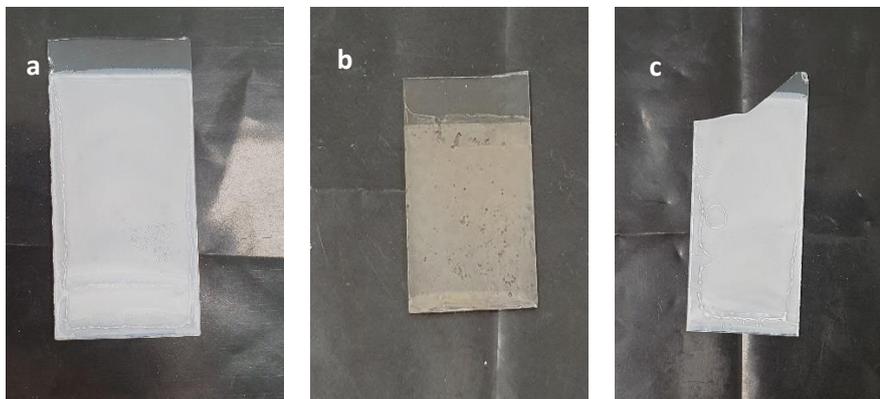


Figure 37: Photos des dépôts obtenus selon la technique Dip-coating a) ZnO, b) CuO et c) TiO₂ (T = 500°C, n couches = 5)

Après séchage et traitements thermique, les dépôts obtenus sont uniformes. Le résultat optimal pour les plaques de ZnO et de CuO a été obtenu à une concentration d'acétate de 0.75 mol.L⁻¹(parmi 4 concentrations allant de 0.5 à 1.5 mol.L⁻¹). Ceci s'explique par le fait que l'augmentation de concentration engendre une opacité des plaques à la suite du traitement thermique.

La vitesse de dépôt avec dip-coating était un autre facteur étudié pour déterminer son influence sur la qualité du dépôt. Trois vitesses ont été utilisées pour tirer les plaques : 1, 3 et 5 cm.min⁻¹. L'influence de ce facteur n'est constatée qu'avec les concentrations de 1.5 et 1 mol/L⁻¹ de précurseurs dans l'isopropanol. Avec la concentration optimale de 0.75 mol.L⁻¹, la qualité de dépôt reste invariante avec la vitesse de retrait. Nous avons retenu la vitesse de 1 cm.min⁻¹.

4.2.2 Distribution et tailles des nanoparticules en suspensions

4.2.2.1 Diffusion dynamique de la lumière (DLS)

Les mesures DLS de la distribution de taille des particules de ZnO sont illustrées dans la figure 38. Les particules ont une taille moyenne de $2R = 3$ nm avec une polydispersité relativement étroite $\Delta R = 0,6$ nm. Les mêmes mesures de colloïdes de CuO n'ont pas abouti à un résultat à cause de la coloration bleu foncé empêchant la propagation de la lumière laser. En conséquence, des mesures complémentaires ont été effectuées pour vérifier la taille des particules de CuO et valider les résultats DLS obtenus dans les colloïdes de ZnO.

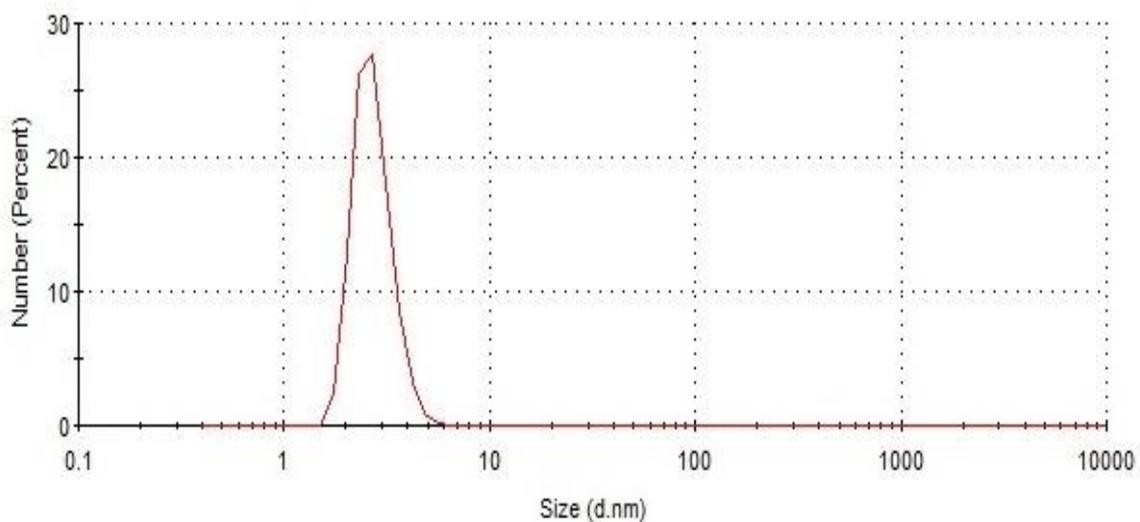


Figure 38: Mesure DLS des colloïdes de ZnO

La taille des nanoparticules de TiO_2 ($2R = 4,9 \pm 0,2$ nm) synthétisées dans le réacteur à micromélange quant à elle est contrôlée par la méthode DLS décrite dans le chapitre 2. Le coefficient de diffusion des particules en suspension (D) a été obtenu par l'ajustement de la fonction d'autocorrélation (ACF). La figure 39 montre la courbe de la fonction d'autocorrélation, contenant des informations sur le coefficient de diffusion et le rayon hydrodynamique.

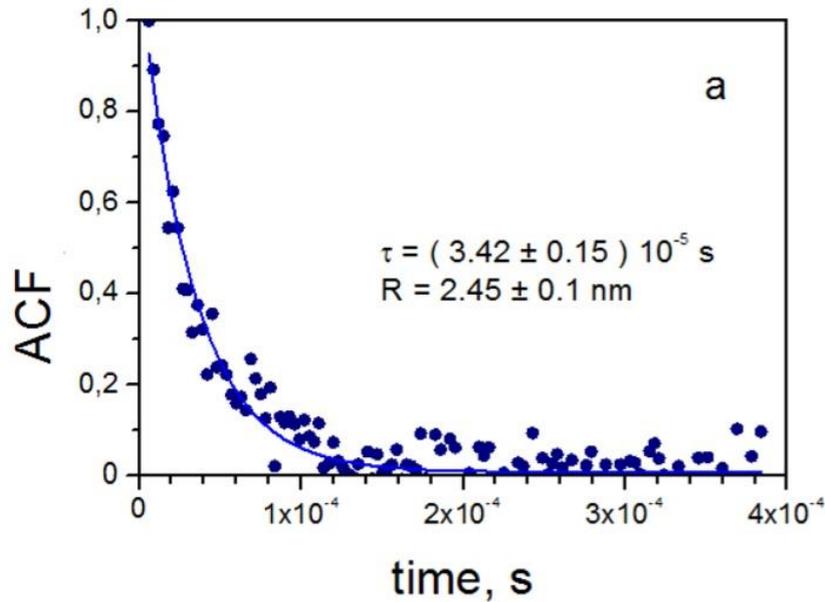


Figure 39: Caractéristiques ACF des nanoparticules de TiO₂ après leur préparation dans le réacteur T-mixer [224]

4.2.2.2 Microscopie électronique à transmission (MET)

Les colloïdes de ZnO et de CuO ont été déposés sur des grilles par thermosphère. Une analyse statique des échantillons a permis d'obtenir la distribution en taille des nanoparticules de ZnO. Les images MET mettent en évidence de petites nanoparticules de ZnO d'un diamètre moyen de 3 nm (figure 40 a), ce qui corrobore les résultats de mesures DLS. L'analyse MET des nanoparticules de CuO a montré la même taille moyenne de 3 nm avec une polydispersité comparable aux nanoparticules de ZnO (figure 40 b).

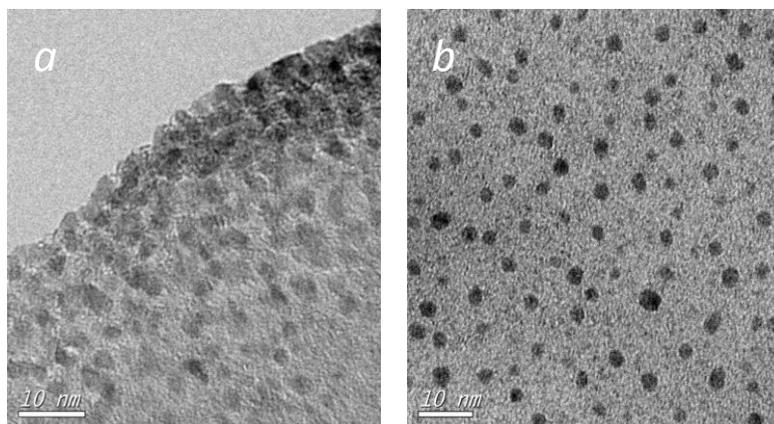


Figure 40: Images MET des colloïdes de a) ZnO et b) CuO

4.2.3 Morphologie des nanodépôts par MEB

4.2.3.1 Cas de l'oxyde de zinc et de l'oxyde de cuivre

L'analyse par Microscopie Electronique à Balayage MEB a montré que ces films sont homogènes, denses et formés de particules sphériques. La figure 41 présente des clichés MEB mettant en évidence des dépôts formés de particules de CuO et ZnO de diamètre proche de 30-40 nm.

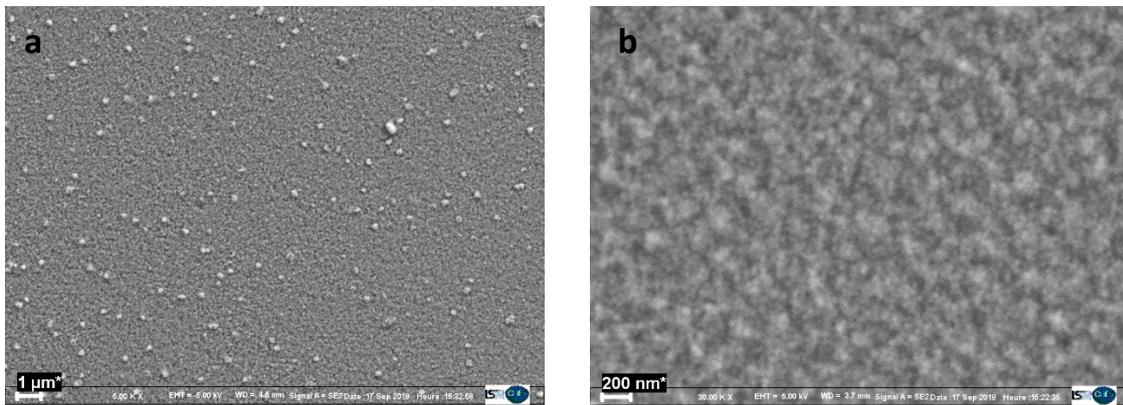


Figure 41 : Images MEB de couches minces de a) CuO, b) ZnO ; 5 couches; traitées à 500°C

La figure 41-a montre des nanoparticules de CuO, de forme sphérique assez dispersées avec une taille moyenne de 45 nm. La figure 41-b quant à elle présente des nanoparticules de ZnO faiblement dispersées et assez agglomérées, d'une taille moyenne de 37 nm. Les oxydes préparés à partir de précurseurs d'acétate, produisent des particules de formes sphériques, assez bien dispersés dont la taille est comprise dans la gamme du nanomètre. L'épaisseur du film augmente avec le nombre de couches déposées.

4.2.3.2 Cas du dioxyde de titane

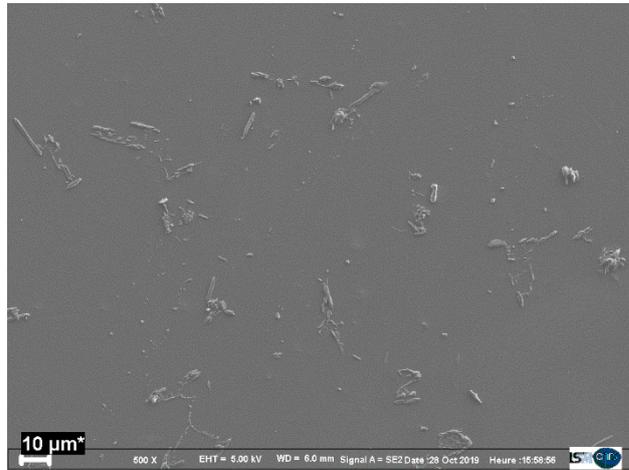


Figure 42: Image MEB de couche mince de TiO_2 , 5 couches traitées à 500°C

La figure 42 présente la morphologie de surface des films traités à 500°C . On observe un dépôt qui n'est pas parfaitement homogène contrairement aux NPs de ZnO et CuO formé des agglomérats de nanoparticules de TiO_2 et présentant une taille moyenne de 60 nm.

4.2.4 Analyse élémentaire et quantitative des dépôts par EDX

La figure 43 présente le spectre du film de ZnO de concentration 0,75M traité à 500°C . On s'intéresse aux pics les plus intenses de Zn, de Si puis aux autres éléments présents sous forme de traces. Sur le spectre, on distingue vers 1 KeV la raie caractéristique de Zn et la raie Si vers 1,8 KeV due à l'utilisation de la plaque de verre comme substrat (une analyse de la plaque vierge a été réalisée pour servir comme témoin et montre en plus de Si, la présence de calcium en petites quantités). La présence de carbone quant à elle est dû à la contamination organique. Ainsi, ces résultats confirment la présence d'un dépôt de ZnO sur les plaques de verre.

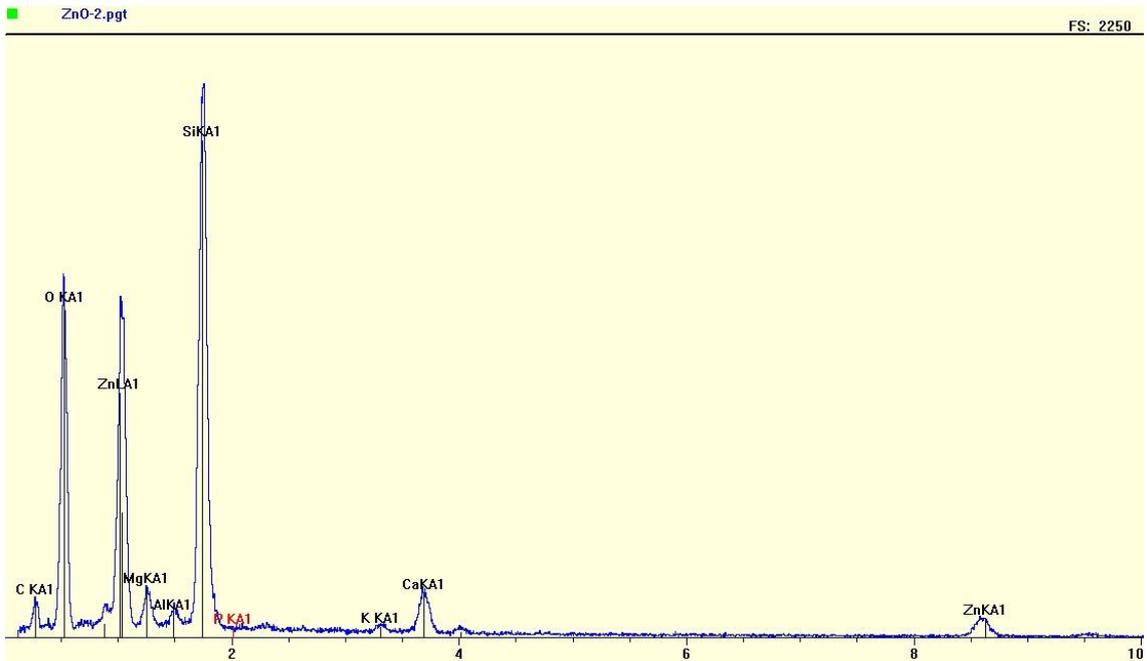


Figure 43: Spectre du film ZnO ($C_{Zn} = 0.75M$, $T = 500^{\circ}C$, dépôt de 5 couches)

La figure 44 présente le spectre du film de CuO de concentration 0,75M traité à 500°C. On s'intéresse aux pics les plus intenses de Cu, de Si puis aux autres éléments présents sous forme de traces. Sur le spectre, on distingue vers 1 KeV la raie caractéristique de Cu et la raie Si vers 1,8 KeV due à l'utilisation de la plaque de verre comme substrat.

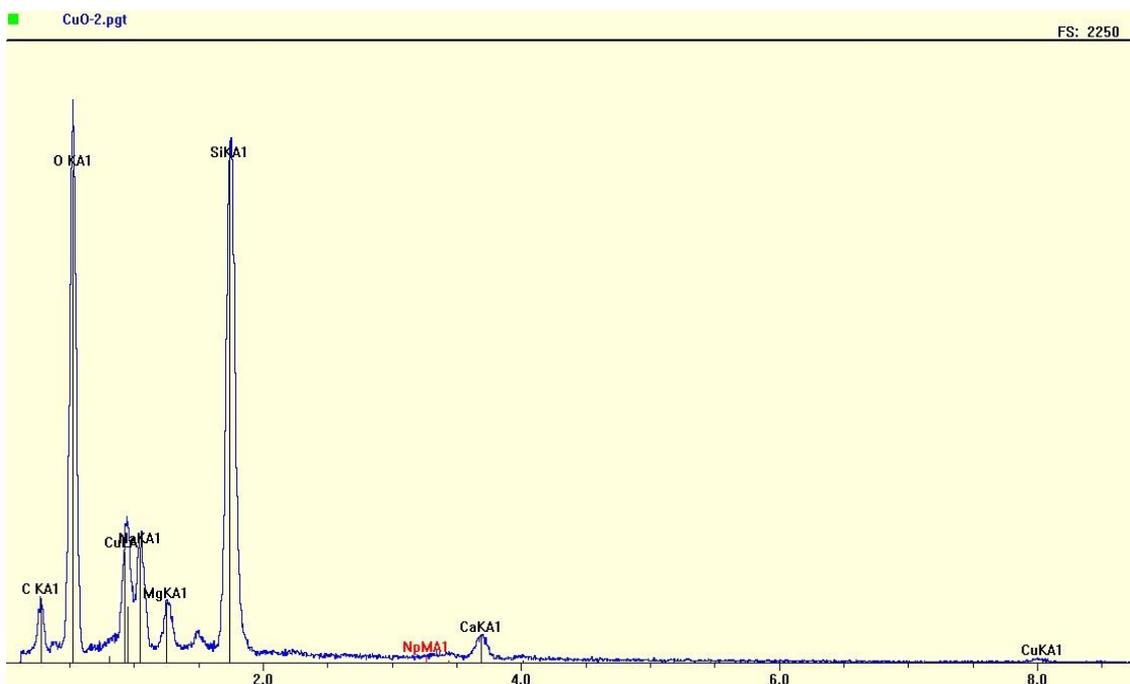


Figure 44 : Spectre du film CuO ($C_{CuO} = 0.75 M$, $T = 500^{\circ}C$, dépôt de 5 couches)

4.2.5 Analyses thermiques par ATD/ATG

Les études thermiques ont été effectuées sur des échantillons de ZnO sous forme de gel. Malheureusement, à la suite d'un impondérable technique, nous n'avons pas pu effectuer la même mesure sur les échantillons de CuO et TiO₂. Néanmoins, nous pouvons nous appuyer sur les travaux antérieurs réalisés au sein de l'équipe [225]. Les mesures ont été réalisées par l'analyse thermique différentielle (ATD) et thermogravimétrie (ATG) dans le domaine de température variant de 40°C à 700°C. La vitesse de chauffe est de 5°C/min. L'échantillon étudié est un gel de concentration $C_{Zn} = 0,75M$ traité préalablement à 80°C pendant une heure.

4.2.5.1 Oxyde de Zinc

Pour le zinc, on observe sur la figure 46 une perte importante de masse d'environ 75%, largement supérieure à celle obtenue quand on transforme Zn (CH₃COO)₂ en ZnO (= 55%). Cette observation conduit à prendre en compte la perte de masse due à la décomposition des résidus organiques. Vers 145°C, un pic intense endothermique correspond à l'évaporation de l'eau et du solvant physiquement adsorbé. Les trois pics endothermiques vers 200°C, 240°C et 312 °C correspondent à la décomposition thermique des résidus organiques.

Un pic exothermique faible apparaît vers 350°C, ce qui correspond à la transition de la phase amorphe à la phase cristalline de ZnO. Ce phénomène ne conduit à aucune perte de masse sur la courbe ATG. En outre, il est suggéré que le MEA a été potentiellement intégré dans le réseau du gel organique parce qu'il n'y a pas de pic qui apparaît à son point d'ébullition de 170°C. Cette étude nous permet de déterminer la température de préchauffage des échantillons (films et poudres) lors du traitement thermique pour les cristalliser, la température choisie est de 250°C.

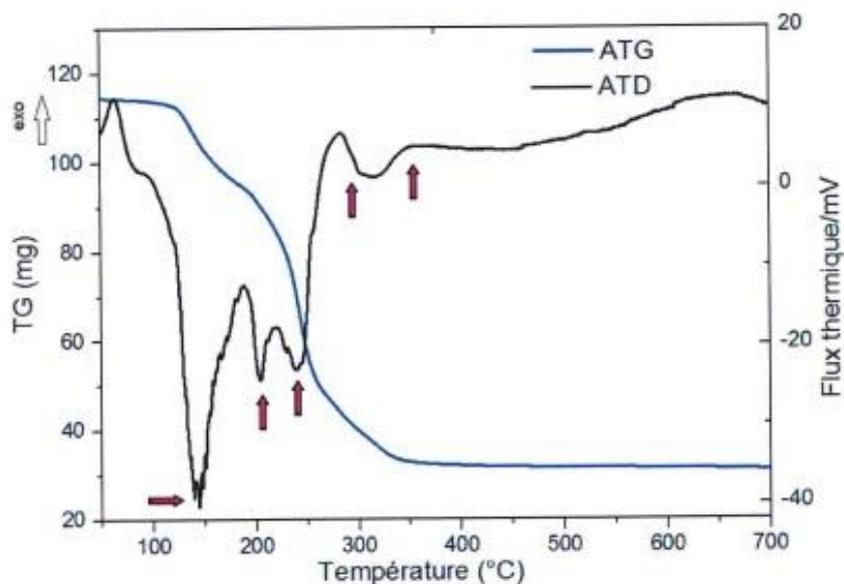


Figure 45 : ATG/ATD du gel de ZnO ($C_{zn}=0.75$, $t=80^{\circ}\text{C}$)

4.2.6 Etude vibrationnelle par spectroscopie Raman

4.2.6.1 Caractérisation du complexe Acétate monoethanolamine

Comme nous avons signalé dans la partie expérimentale, la solution « précurseur » utilisée pour élaborer des films de ZnO et CuO résulte du mélange de l'acétate de zinc dihydraté ($\text{Zn}(\text{CH}_3\text{COO})_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) ou de l'acétate de cuivre monohydraté ($\text{Cu}(\text{CH}_3\text{-COO})_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$) et le monoethanolamine (MEA) de formule $\text{OH-CH}_2\text{-CH}_2\text{-NH}_2$ dans l'alcool (propan-2-ol). Lors du mélange, la réaction entre les réactifs conduit à la formation d'un complexe de coordination dans lequel les ions Zn^{2+} ou Cu^{2+} sont entourés par les ligands bidentates (acétate et MEA), la molécule de H_2O et les ions OH^- . L'existence de ce dernier (ion OH^-) provient de la basicité du milieu causée par la présence du monoethanolamine. En accord avec la structure de l'acétate de zinc déterminée par Ishioka et al. [229], nous proposons pour le complexe une structure avec un environnement octaédrique de l'ion Zn^{2+} (figure 46).

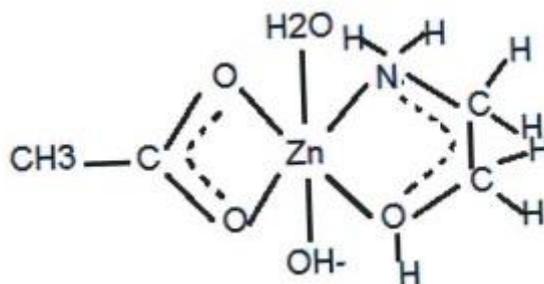


Figure 46 : Structure octaédrique de l'ion Zn^{2+}

Selon cette structure, nous devons nous attendre à une modification significative des liaisons chimiques dans l'acétate et dans le MEA.

La figure 47 présente les spectres Raman de l'acétate de zinc à l'état solide, du MEA et du gel obtenu par séchage du mélange des réactifs à $80^\circ C$. Dans cette figure nous préférons présenter le spectre de l'acétate de zinc à l'état solide, pour ne pas être gêné par les bandes du solvant (H_2O).

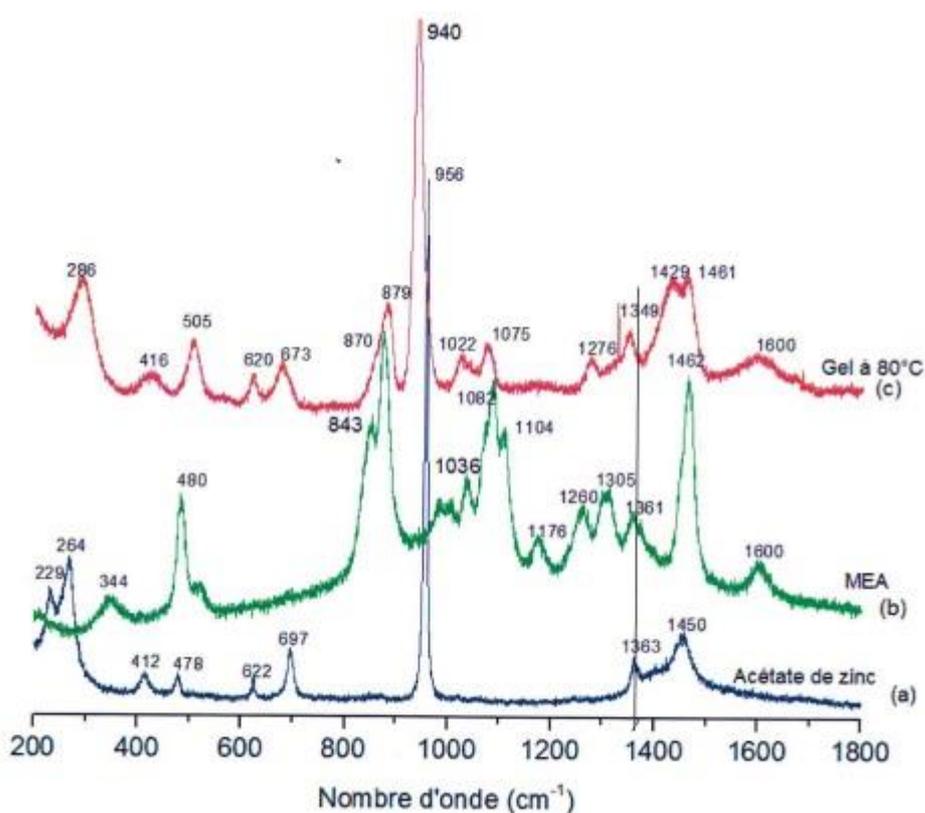


Figure 47 : Spectre Raman dans le domaine $200-1800\text{ cm}^{-1}$, (a) Acétate de zinc à l'état solide, (b) MEA, (c) Gel (mélange de a et b) traité à $80^\circ C$ pendant 1 heure

4.2.6.2 Analyse du spectre de l'oxyde de zinc

L'analyse des spectres se fera dans les domaines différents

A) Domaine 200-1000 cm^{-1}

Dans cet intervalle spectral, nous observons une modification notable du spectre de MEA, en particulier les bandes situées à 480 et 870 cm^{-1} attribuées aux modes de vibrations $\delta(\text{NCH})$ et $\gamma(\text{C-C})$ [230,232]. Ces deux bandes se déplacent vers la haute fréquence dans le spectre du complexe (gel à 80°C) et apparaissent à 505 et 879 cm^{-1} respectivement. Cet accroissement de fréquence peut être expliqué par l'augmentation du caractère π des liaisons C-N et C-C lorsque les ligands sont impliqués dans la structure du complexe.

Un changement du spectre de l'acétate de zinc est également observé. Les bandes situées à 264 cm^{-1} (274 cm^{-1} en solution) dans l'acétate pourraient être attribuées au mode vibration γ (Zn-O) se déplaçant vers 286 cm^{-1} dans le complexe. Cette augmentation de fréquence peut être interprétée par un renforcement de la liaison Zn-O du groupe Zn-O-H dans le complexe [231].

Les modes de vibration associés à la déformation du groupe COO^- situés vers 412 cm^{-1} (435 cm^{-1} en solution), 478 cm^{-1} (502 cm^{-1} en solution), 622 cm^{-1} (618 cm^{-1} en solution) et 690 cm^{-1} (670 cm^{-1} en solution) subissent peu de changement. Le même résultat est observé pour la vibration $\gamma(\text{C-C})$ situé à 956 cm^{-1} (938 cm^{-1} en solution).

B) Domaine 1000-1800 cm^{-1}

Dans cet intervalle, le spectre MEA est relativement complexe. Ceci est lié, vraisemblablement à l'existence de plusieurs conformations pour cette molécule [232]. La vibration d'élongation $\gamma(\text{C-O})$ est attribué à la bande située à 1080 cm^{-1} [229]. Celle-ci se déplace légèrement vers 1075 cm^{-1} . L'analyse de variation de fréquences pour ce mode, devrait prendre en compte l'effet de compensation résultant :

- i) De la diminution de fréquence causée par l'absence de liaison hydrogène lors de la formation de liaison de coordination Zn-O entre la molécule MEA et Zn.

- ii) De l'augmentation de fréquence due à l'accroissement du caractère π de la liaison C-O.

Cet effet de compensation ne s'observe pas pour la liaison C-N car la liaison hydrogène dans MEA implique l'hydrogène de OH et non de NH, comme le montre la figure 48 ci-dessous.

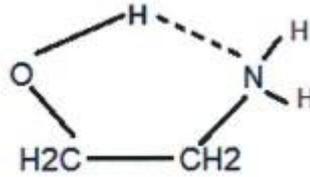


Figure 48 : Molécule du MEA

La bande de vibration $\nu(\text{C-N})$ se situe vers 1036 cm^{-1} [229]. Le changement de cette bande dans le complexe n'est pas clair. Cependant on peut penser qu'elle se déplace vers 1075 cm^{-1} , ce dernier est dû à l'augmentation du caractère π de la liaison. Concernant l'acétate de zinc, nous n'avons pas enregistré une modification notable dans ce domaine de fréquence.

4.2.6.3 Analyse du spectre de l'oxyde de cuivre

La figure 49 présente les spectres Raman de l'acétate de cuivre à l'état solide et du gel obtenu par séchage du mélange des réactifs à 80°C . Dans cette figure nous préférons présenter le spectre de l'acétate de cuivre à l'état solide, pour ne pas être gêné par les bandes du solvant (H_2O).

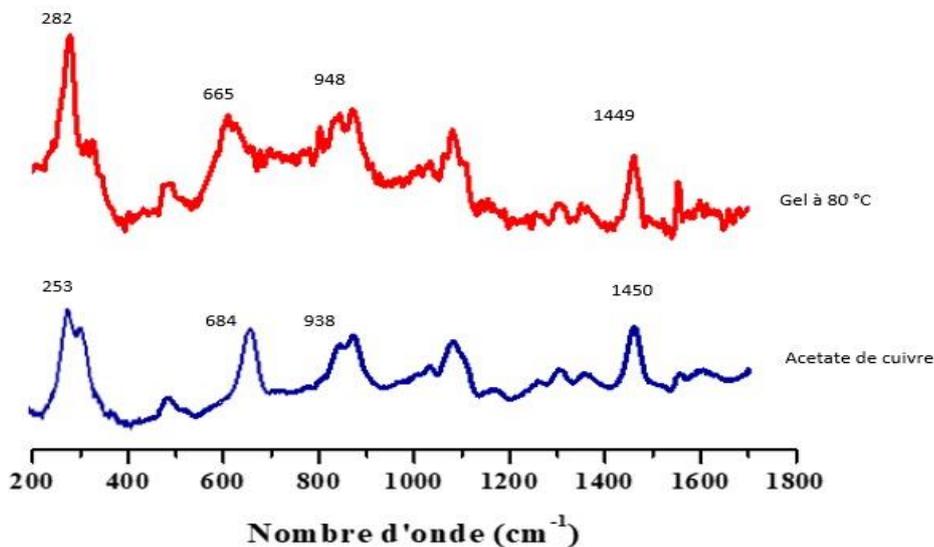


Figure 49 : Spectre Raman de a) Acétate de cuivre à l'état solide, b) Gel de CuO traité à 80°C pendant 1 heure

A) Domaine 200-1000 cm⁻¹

Le spectre Raman du gel de CuO, permet de voir trois principaux pics à 282 cm⁻¹, 330 cm⁻¹ et 665 cm⁻¹. Le pic à 282 cm⁻¹ pour les modes Ag et les pics situées à 330 cm⁻¹ et 665 cm⁻¹ sont pour les modes Bg [233].

On observe deux séries de pics à 948 et 938 cm⁻¹ qui sont attribuées à l'étirement A1 v (CC) et la déformation A1 δ (OCO) sur l'anion acétate [234]. On peut observer une division bien résolue de chacune de ces vibrations, ce qui conduit à penser que l'anion acétate est présent dans deux conformations différentes dans la structure en cristal.

Les modes actifs Raman (Au + 2Bu) sont apparus dans les spectres observés par Raman. Ce résultat montre évidemment que des nanoparticules de CuO monophasées pures sont formées dans les conditions expérimentales ci-dessus.

B) Domaine 1000-1800 cm⁻¹

Nous voyons très clairement trois pics distincts sur l'analyse des composantes de la bande dans la région de 1410-1450 cm⁻¹, que l'on peut attribuer aux vibrations d'étirement symétriques de la liaison C-O et des déformations du substituant méthyle. Le pic présent dans le gel à 1449 cm⁻¹ est dû à la déformation B2 δ (CH₃)[235]. Les vibrations d'étirements asymétriques ne pourraient pas être résolues du bruit de fond dans la région de 1540-1650 cm⁻¹ dans le Raman spectre du gel.

Lorsque des sels d'acides carboxyliques tels que l'acétique sont formés, les liaisons C = O et C-O sont remplacées par deux liaisons C-O équivalentes avec un ordre de liaison de 1,5. Ces deux liaisons C-O interagissent en phase et hors phase pour donner deux bandes: la vibration d'étirement asymétrique qui est intense dans le spectre infrarouge, mais relativement faible dans le spectre Raman, et une bande d'étirement symétrique qui est faible intensité dans le spectre infrarouge mais forte et polarisée dans le spectre Raman. Ces deux vibrations se trouvent respectivement normalement dans les régions 1540-1650 et 1360- 1450cm⁻¹ [234-236].

4.2.7 Potentiel Zêta

Le potentiel zêta est la charge d'une particule dans le plan de cisaillement. Il décrit la quantité d'énergie nécessaire pour transférer une charge électrique entre deux points. En d'autres termes, le potentiel zêta est la mesure de la charge électrique des particules solides maintenues en suspension dans la phase liquide. Cette valeur de charge de surface est utile pour comprendre et prévoir les interactions entre les particules en suspension. Plus le potentiel zêta est élevé, plus la stabilité de l'interface solide-liquide est élevée. La valeur du potentiel zêta comprise entre -30 et +30 mV montre une stabilité suffisante des particules solides dans les liquides. Une valeur inférieure à -15 mV montre l'agglomération des particules [237].

Le potentiel zêta de surface a été mesuré à l'aide du Malvern ZetaSizer Nano Series ZS (Malvern Instruments, UK) par la technique de microélectrosphère Doppler au Laser. Sur des échantillons des nanoparticules en suspension, le pH est ajusté à la valeur requise, puis le potentiel zêta des particules métalliques est mesuré. Dans chaque cas, trois mesures distinctes ont été rapportées. Les mesures du potentiel Zêta sont répertoriées dans le tableau 5. Les mêmes mesures de colloïdes de CuO n'ont pas abouti à un résultat à cause de leur coloration bleu foncé empêchant la propagation de la lumière laser comme il a été indiqué pour les mesures DLS dans le paragraphe 3.2.2.1.

Tableau 5 : Mesures du Zeta potentiel des nanoparticules de ZnO

Echantillon	Température (°C)	Potentiel Zeta (mV)	Conductimétrie(mS/cm)
ZnO 0,5M	25	8,93	0,529
ZnO 1,5M	25	2,46	0,138

On remarque d'après le tableau 5 que les nanoparticules de ZnO, ont un potentiel de surface positive compris entre 2 mV et 9mV. Puisque les valeurs retrouvées se situe entre -30 et 30 mV, on considère que la force de répulsion est suffisante pour atteindre une meilleure stabilité colloïdale.

4.3 Conclusion

Ce chapitre était dédié à la synthèse de solutions colloïdales de ZnO, CuO et TiO₂ par la méthode sol-gel. L'ensemble des nanoparticules a été synthétisé et caractérisé. Nous avons utilisé deux voies de synthèses ; la première concerne les NPs de TiO₂, avec l'utilisation du réacteur à micro-mélange rapide, avec comme alcoxydes le TTIP. La seconde est réalisée à partir de précurseurs d'acétates dans une atmosphère contrôlée.

Les solutions de NPs ont servi à la réalisation de nanodépôts sur des substrats de verres. Les couches minces ont été ensuite caractérisées par MEB, MEB-EDX, et Raman. Les résultats de ces caractérisations confirment la présence d'une couche mince d'oxyde de zinc, d'oxyde cuivre et du dioxyde de titane.

Chapitre 4 : Activité antibactérienne des nanoparticules d'oxyde de zinc, de cuivre et du dioxyde de titane

5 Activité antibactérienne des nanoparticules d'oxyde de zinc, de cuivre et du dioxyde de titane

Dans ce chapitre nous allons exposer les résultats obtenus sur l'analyse de l'activité antibactérienne des nanoparticules en solution et en couches minces dont la synthèse a été abordée lors du chapitre 3. Les tests ont été effectués sur des souches pures : *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 9027), *Staphylococcus aureus* (ATCC 6538) et *Escherichia Coli* (ATCC 8739). Le test consiste en une contamination artificielle de la préparation au moyen d'inoculum de microorganismes.

5.1 La méthode de diffusion sur disque et en puits

Nous avons utilisé cette méthode en premier lieu pour réaliser un screening de la sensibilité antibactérienne aux nanoparticules. Pour ces tests, nous utilisons les NPs en suspension, et donc sous une forme amorphe. Les disques de papier sont imbibés avec une solution colloïdale de NPs à différentes concentrations avec un volume de 20 μ L, ensuite déposés à la surface des boîtes de Pétri qui sont inoculés par différentes suspensions bactériennes à une concentration de 10⁷UFC/mL, puis incubées pendant 24h à 37°C pour garantir des conditions optimales de croissance des souches. Un disque imbibé uniquement de solvant sert quant à lui de témoin (figure 50).



Figure 50 : Méthode de diffusion sur disque avec le propan-2-ol à 99.5%

5.1.1 Evaluation de l'activité antibactérienne contre *E. coli*, *S. aureus* et *P. aeruginosa*

La sensibilité microbienne des nanoparticules d'oxydes métalliques varie selon les espèces microbiennes et les concentrations d'oxydes métalliques. Les concentrations testées de 0.5M, 0.75M, 1M et 1,5M produisent une zone d'inhibition à l'exception du dioxyde de titane qui ne produit aucun effet antibactérien sous forme amorphe. Les résultats obtenus sont représentés par les figures 51, 52 :

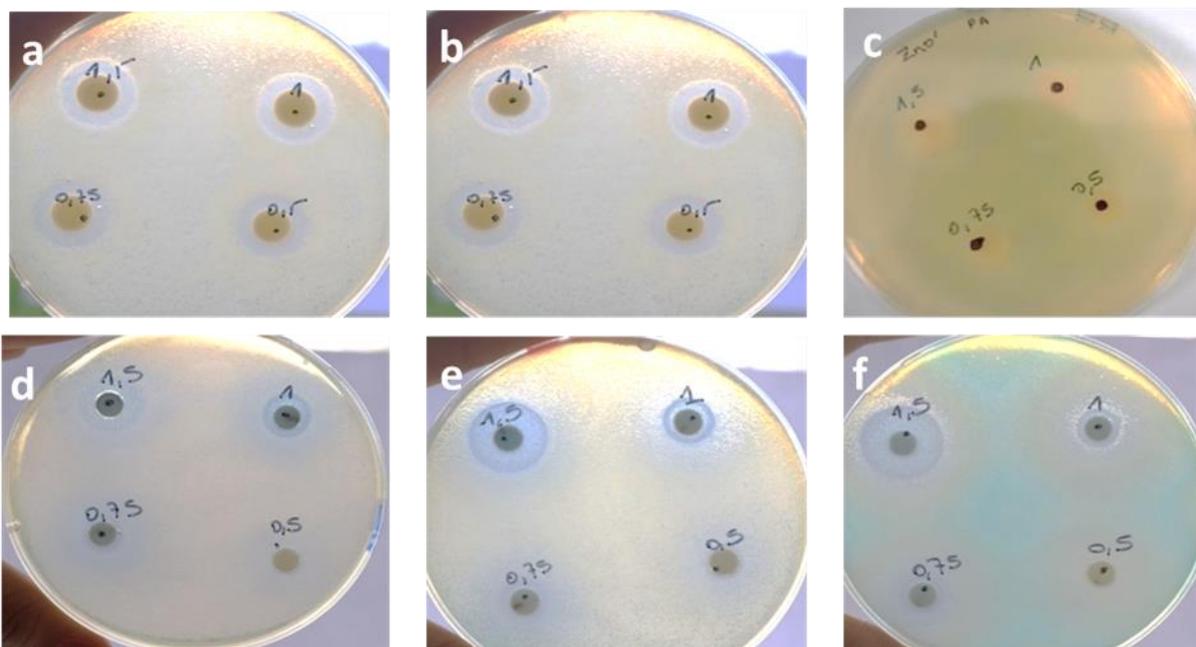


Figure 51: Méthode de diffusion sur disque ZnO/*E.coli* (a), ZnO/*S.aureus* (b), ZnO/*P.aeruginosa* (c), CuO/*E.coli* (d), CuO/*S.aureus* (e) and CuO/*P.aeruginosa* (f). Les nombres indiquent la concentration en colloïds en mol/l.

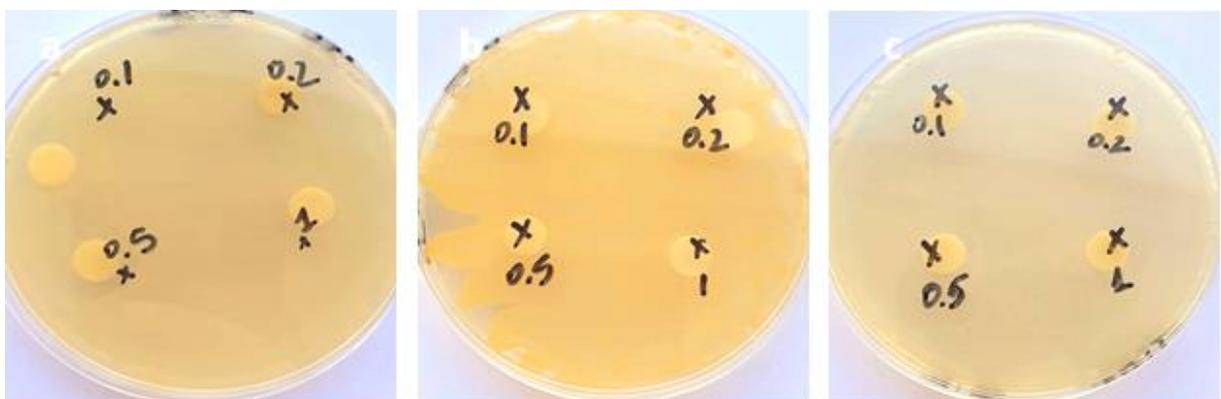


Figure 52: Méthode de diffusion en puits TiO₂/*E.coli* (a), TiO₂/*P.aeruginosa* (b), TiO₂/*S.aureus* (c), ZnO/*E.coli*

La zone d'inhibition reflète la sensibilité de l'espèce bactérienne aux agents inhibiteurs, en effet les souches sensibles aux agents antibactériens présentent un rayon d'inhibition plus important que les souches qui sont plus résistantes.

Les résultats montrent que les sols de nanoparticules de CuO et de ZnO se comportent comme des agents antibactériens avec la présence de zone d'inhibition. Les nanoparticules de ZnO inhibent les bactéries uniquement à des concentrations suffisamment élevées, environ 0,5 M, tandis que le comportement antibactérien des nanoparticules de CuO commence à concentration plus faible. Les résultats montrent également que tous les microorganismes testés présentent une sensibilité plus élevée à des concentrations plus importantes de nanoparticules. A partir de ces résultats, nous avons souhaité étudier l'effet du volume des solutions de nanoparticules sur le phénomène de diffusion et l'activité antibactérienne. Nous étudions de ce fait uniquement les nanoparticules qui ont démontré une activité antibactérienne (ZnO et CuO), en utilisant la méthode des puits.

On constate dans la figure 53 que la zone d'inhibition dans les mesures de diffusion en puits est plus importante comparée à la méthode de diffusion sur disque, ce qui peut s'expliquer par le fait que dans la diffusion en puits, nous doublons le volume de solutions de nanoparticules et donc augmentons la diffusion des nanoparticules dans le milieu.

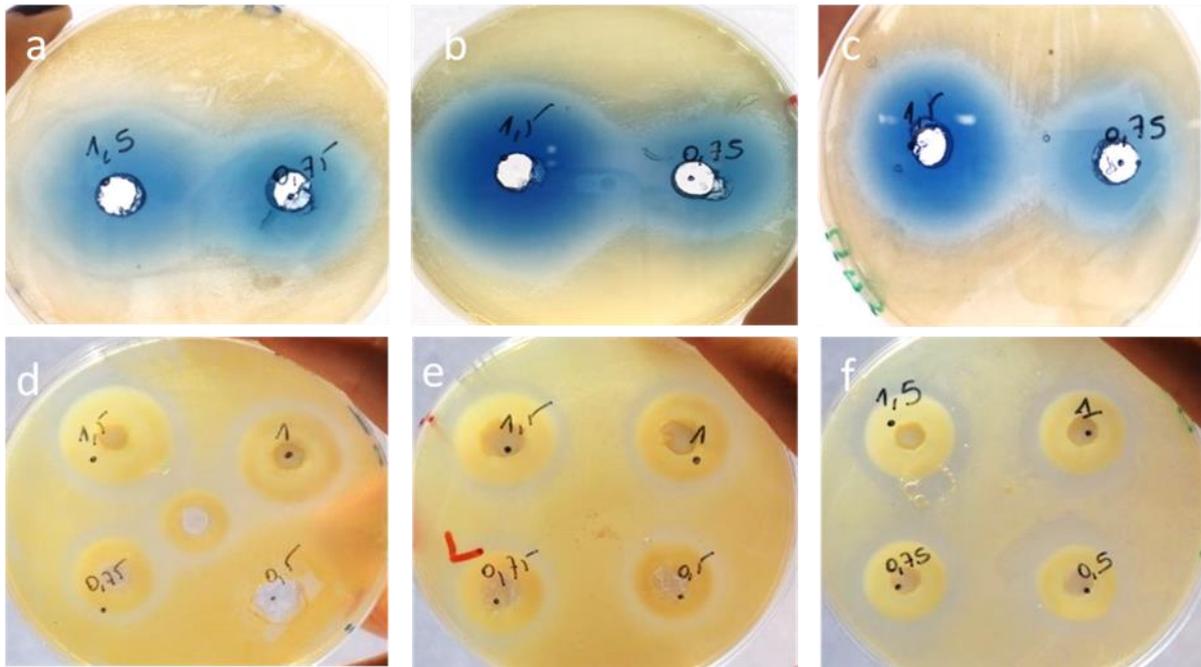


Figure 53 : Méthode de diffusion en puits CuO/*E. coli* (a), CuO/*P. aeruginosa* (b), CuO/*S. aureus* (c), ZnO/*E. coli* (d), ZnO/*S. aureus* (e) and ZnO/*P. aeruginosa* (f).

Les résultats obtenus concordent avec la littérature, une concentration et un volume plus élevés conduisent à une meilleure activité antibactérienne [12].

Les tailles des zones d'inhibition présentées aux figures 51 ont été moyennées sur trois séries indépendantes pour chaque souche et l'évolution du diamètre d'inhibition moyen de la concentration en colloïdes pour les 3 différentes souches de bactéries est présentée dans la figure 54 :

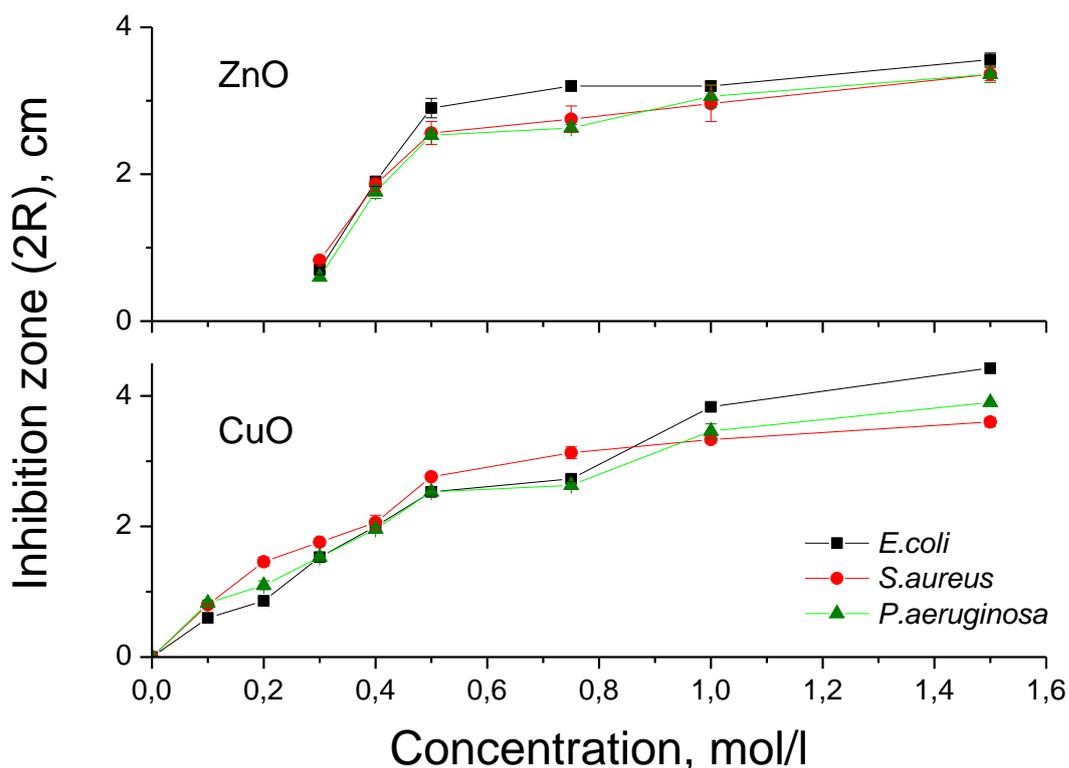


Figure 54: Dépendance de la zone d'inhibition en fonction de la concentration of ZnO and CuO nanoparticules

L'analyse détaillée des résultats obtenus a montré que l'inhibition bactérienne est observée avec l'ensemble des concentrations supérieures à 0.1 M de NPs de CuO, alors que pour le ZnO, l'inhibition de la croissance des bactéries s'effectue à des concentrations supérieures à 0,3M pour *E. coli*, *P. aeruginosa* et *S. aureus*. Le diamètre d'inhibition en contact avec des NPs de ZnO augmente avec l'augmentation de la concentration de 0,3 à 0,5M et sature à des concentrations supérieures atteignant 1,6 M pour toutes les souches étudiées. En revanche, au contact des NPs de CuO, le comportement des souches à Gram négatif et à Gram positif est différent. L'inhibition de *S. aureus* qui est un Gram positif montre des signes de saturation tandis que la zone d'inhibition de *E. coli* et de *P. aeruginosa* qui sont des Gram négatif s'étend de façon permanente, atteignent une taille supérieure à celle des NPs de ZnO. Le CuO est donc plus efficace contre les différentes souches bactériennes que le ZnO.

5.1.2 Evaluation de l'activité fongicide contre *C. albicans*

Comme pour les tests de l'évaluation de l'activité antibactérienne, nous utilisons la méthode de diffusion en puits dont le but de déterminer l'activité fongicide des NPs de ZnO et CuO. La figure 55 représente les résultats obtenus après 24 h d'incubation à 37°C :

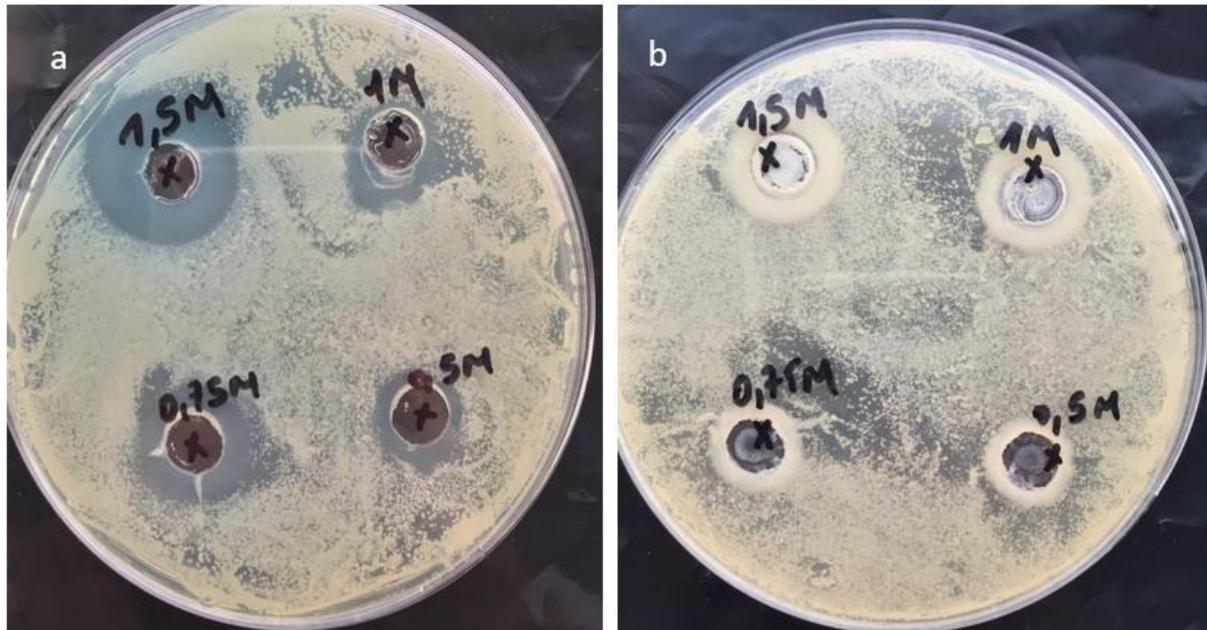


Figure 55: Méthode de diffusion en puits CuO/*C. albicans* (a) et ZnO/*C. albicans* (b)

On observe que les NPs de CuO (figure 55 a) ont un effet inhibiteur sur la croissance de *C. albicans*. En effet on remarque des zones d'inhibition autour des puits où les solutions de NPs ont été déposées, et qui sont dépendantes de la concentration en NPs. Il y a un effet dose-réponse, sauf pour les concentrations de 1M et 0.75 M.

Contrairement aux NPs de CuO, les NPs de ZnO (figure 55 b) n'ont aucun effet d'inhibition sur la croissance de *C. albicans* à différentes concentrations.

5.2 Modélisation sur la diffusion des nanoparticules Vs ions

Les nanomatériaux antibactériens les plus connus interagissent électrostatiquement avec la membrane bactérienne, provoquant ainsi une rupture de la membrane [79,80]. Souvent, les espèces réactives d'oxygène (ROS) sont produites en raison d'interactions entre les nanomatériaux et la membrane bactérienne, qui peuvent endommager les membranes secondaires, nuire à la fonction des protéines et détruire l'ADN [138]. D'autres NPs antibactériennes, telles que le ZnO sont photoactivées et deviennent un oxydant puissant qui détruit diverses souches bactériennes et composés organiques par le biais du mécanisme photocatalytique. Des études récentes ont montré que les espèces d'oxygène actif détruisent les membranes externes des bactéries et provoquent leur mort [131,142]. En ce qui concerne les nanoparticules de ZnO et de CuO, leur activité antibactérienne pourrait être due à la libération d'ions Cu^{2+} et de Zn^{2+} qui interagissent avec la cellule chargée négativement [238]. Le processus biochimique serait affecté et pourrait endommager les membranes. De plus, la petite taille des nanoparticules aiderait à adhérer à la paroi bactérienne, ce qui détruirait la cellule. Une dégradation des enzymes est réalisée par des nanoparticules pouvant pénétrer dans la membrane cellulaire [239,240]. La physiologie, le métabolisme et le degré de contact peuvent contribuer aux différences d'activité bactérienne des nanoparticules chez différentes bactéries. Dans ce qui suit, nous décrivons un modèle qui permet de clarifier l'effet toxique des nanoparticules à différentes phases de la croissance bactérienne.

Le modèle proposé est basé sur la diffusion d'espèces biocides, qui peuvent être des ions et/ou des nanoparticules. Pour chaque colloïde (ZnO ou CuO), les courbes d'expansion de la zone d'inhibition des différentes souches *E. coli*, *P. aeruginosa* et *S. aureus* de la figure 54 sont assez similaires, et pour simplifier, nous remplaçons par une courbe moyenne qui contient les principales caractéristiques du mécanisme d'inhibition. Les deux courbes obtenues de NPs de ZnO et de CuO ont été utilisées pour l'analyse du modèle. La propagation spatiale des espèces actives a été calculée selon la loi de Fick [241]. Avec les coefficients de diffusion des ions $D_{\text{Cu}^{2+}} \approx 1.2 \cdot 10^{-5} \text{ cm}^2/\text{s}$ [242] et $D_{\text{Zn}^{2+}} \approx 1.1 \cdot 10^{-5} \text{ cm}^2/\text{s}$ [243]. Les coefficients de diffusion des nanoparticules de CuO et de ZnO de taille $2R = 3 \text{ nm}$ à la température ambiante est $D_{\text{NP}} = 1.63 \cdot 10^{-6} \text{ cm}^2/\text{s}$ ont été estimés à l'aide de l'équation de

Stockes-Einstein, étayée par des mesures de courbe d'autocorrélation (ACF) de NPs de taille similaire utilisant la méthode DLS [244]. La concentration maximale d'espèces actives C_{max} atteinte au rayon d'inhibition lors de la propagation aléatoire du chemin brownien est donnée dans le tableau 6. En raison d'une variation complexe de la concentration pouvant atteindre un maximum et diminuer ensuite, nous avons également indiqué dans le tableau 6 le temps τ , auquel la concentration maximale a été atteinte après le début du processus ($t=0$). Nous remarquons que la diffusion des espèces était limitée par la durée du processus de $t_0=86400$ s (24 heures). Nos mesures comparatives des solutions contenant des NPs de CuO et de ZnO ont montré que la diffusion est significativement inférieure à celle des échantillons de référence respectifs $CuSO_4$ et $ZnCl_2$. En supposant que la contribution des nanoparticules puisse être négligée, nous avons estimé que la concentration en ions Zn^{2+} et Cu^{2+} dans les solutions était d'environ 19 % de la concentration initiale en précurseurs (C_{Zn} , C_{Cu}). Bien que des mesures plus précises de la concentration en ions soient nécessaires cette valeur a été prise en compte pour la première fois afin de modéliser la diffusion des ions, reprise dans le tableau 6.

Tableau 6: Concentration maximale des espèces actives C_{max} atteinte aux rayons d'inhibition r au temps t lors de la propagation aléatoire dans les solutions aqueuses à température ambiante

C_0 mol/l	Cu^{2+}			Zn^{2+}			CuO nanoparticules (2R=3 nm)		
	r (cm)	C_{max} (mol/l)	T (s)	r (cm)	C_{max} (mol/l)	τ (s)	r (cm)	$C_{max}^{(2)}$ (mol/l)	τ (s)
0.1	0.37	0.0247 0.0102 ⁽¹⁾	1650	-	-	-	0.37	0.0247	12380
0.2	0.56	0.0211 0.0148 ⁽¹⁾	5625	-	-	-	0.56	0.0211	41630
0.3	0.81	0.0153 0.0149 ⁽¹⁾	12750	0.36	0.0821	1430	0.81	0.0153	t_0
0.4	1.01	0.0131	20250	0.93	0.0152	18820	1.01	0.0111	t_0
0.5	1.31	0.0097	34500	1.33	0.0093	39680	1.31	0.00435	t_0
0.75	1.42	0.0124	41250	1.43	0.0122	45820	1.42	0.00393	t_0
1	1.77	0.0105	64500	1.54	0.0140	53180	1.77	0.000780	t_0
1.5	1.99	0.0126	83250	1.72	0.0169	66270	1.99	0.000296	t_0

⁽¹⁾ Concentration atteinte à $t=4.5$ heures.

⁽²⁾ Equivalent à la concentration en précurseur

Nous avons supposé que la concentration maximale des espèces diffusées (ions et /ou NPs) provoque l'inhibition de la croissance bactérienne et définit donc la taille de la zone d'inhibition. Pour cette raison, nous pouvons l'appeler concentration critique C_{crit} , les plus petites concentrations maintenues au rayon d'inhibition R avant et après τ ne contribuent pas à l'extension de la zone. La figure 56 montre l'évolution des concentrations critiques d'ions Cu^{2+} et Zn^{2+} en fonction du temps écoulé. En ce qui concerne la participation des nanoparticules, leur interaction directe avec les bactéries semblent improbable. En effet, en raison du coefficient de diffusion plus faible, la longueur de trajet caractéristique des nanoparticules pendant la durée de l'essai est égale à $\delta=(D_{NPT_0})^{1/2}\approx 0.4$ cm ce qui ne peut pas expliquer les plus grands rayons d'inhibition $r>\delta$ observé dans l'expérience. En effet, les calculs de notre modèle ont montré que la concentration locale maximale de particules de 3 nm aux rayons d'inhibition supérieurs à 0.3 cm est atteinte à la fin du test et diminue de façon exponentielle avec l'augmentation du rayon d'inhibition. Un tel comportement ne peut pas être rationalisé dans le cadre des mécanismes d'inhibition connus.

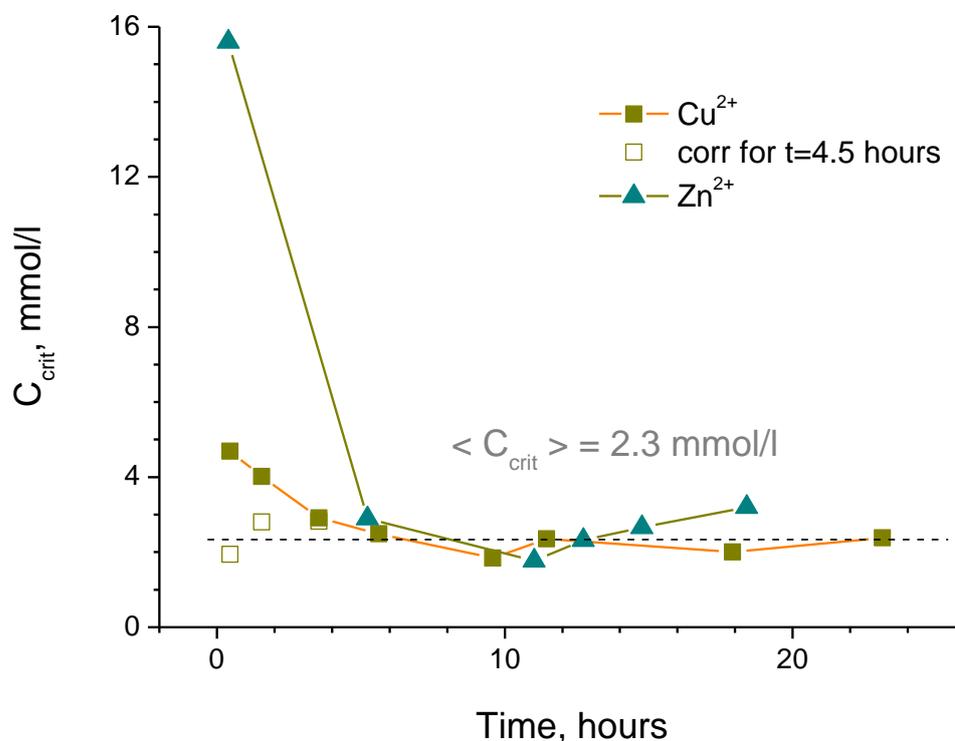


Figure 56: Concentration maximale des ions de Cu^{2+} et Zn^{2+} au rayon d'inhibition en fonction du temps

En inspectant ce comportement temporel de l'inhibition des bactéries, on distingue clairement différents domaines :

$0 \leq t < 6$ (heures) : C_{crit} est assez élevé et diminue avec le temps.

$6 \leq t < 15$ (heures) : C_{crit} est presque constant et minimal

$15 \leq t$ (heures) : C_{crit} augmente légèrement avec le temps.

Bien que les colloïdes CuO à faible C_0 [0.1;0.3], les concentrations maximales aux rayons d'inhibition sont relativement élevées, nous les avons utilisés pour recalculer les concentrations respectives atteintes à la fin de la phase de latence (4,5 heures). Une comparaison a montré que ces valeurs sont assez similaires à la valeur minimale de C_{crit} observée à la phase de croissance exponentielle (figure 58). La même procédure appliquée aux colloïdes de ZnO n'a pas abouti et les concentrations recalculées atteintes à la fin de la phase de latence étaient significativement plus élevées que C_{crit} . Cela pourrait indiquer que, contrairement au ZnO, les bactéries ne développent pas de résistance aux agents toxiques délivrés par CuO pendant la phase de latence.

Ces domaines correspondent à différentes étapes de l'évolution de la population bactérienne. En fait, comme le montre la figure 58, la phase de latence occupe environ 5 heures, suivie de la phase de croissance exponentielle et se terminant par la phase stationnaire 10 à 15 heures après le début du processus ($t=0$). Par conséquent, plusieurs conclusions peuvent être tirées concernant l'activité de l'espèce.

- 1) La diminution des bactéries est inefficace pendant la phase de latence.
- 2) La diminution de bactéries est plus efficace pendant la phase de croissance exponentielle et nécessite une concentration minimale $C_{crit} = 2,3 \pm 0,2$ mmol/L d'ions Cu^{2+} ou de Zn^{2+} .
- 3) Les ions Cu^{2+} conservent une grande efficacité d'inhibition bactérienne en phase stationnaire.
- 4) La réduction des bactéries par les ions Zn^{2+} au cours de la phase stationnaire est faible, nécessitant des concentrations en ions plus élevées.

Nous remarquons que les nanoparticules de CuO et de ZnO sont une excellente source d'ions pour la diminution des bactéries, puisqu'un test complémentaire avec cristal de ZnO de taille $1 \times 1 \times 0,1 \text{ cm}^3$ n'a révélé aucune activité antibactérienne comme le montre la figure ci-dessous :

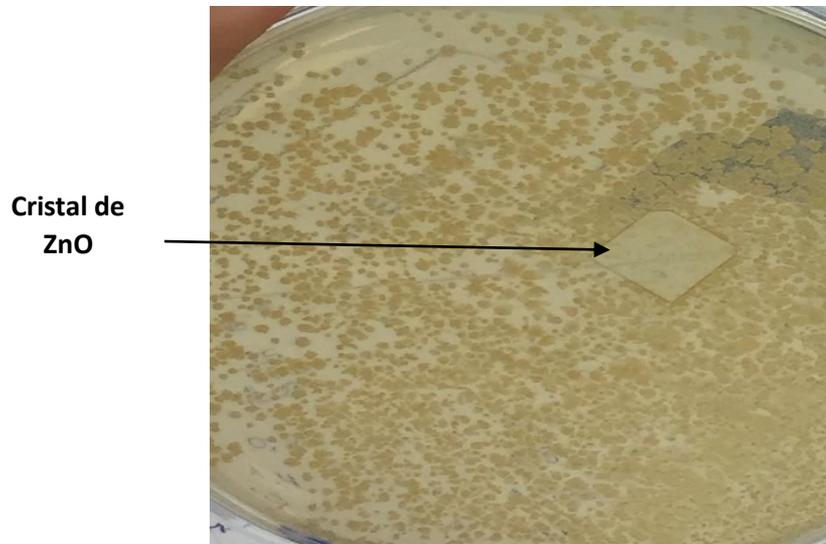


Figure 57: Test de l'efficacité antibactérienne d'un cristal de ZnO sur *S.aureus*

Afin de confirmer les conclusions du modèle, la surveillance de la croissance bactérienne dans le bouillon Mueller Hinton a été effectuée par mesure de la densité optique (DO). Etant donné que la densité optique est proportionnelle à la concentration de bactéries, il est facile de distinguer une partie de la phase de croissance exponentielle de la cinétique du processus en traçant les données expérimentales sur une échelle semi-logarithmique en fonction du temps. Les résultats sont illustrés à la figure 58. La phase de croissance exponentielle peut être facilement identifiée aux points expérimentaux. L'ajustement linéaire avec $\log(DO) = K + b.t$ a permis d'obtenir le facteur exponentiel K à un temps τ , qui sont répertoriés dans le tableau 7.

Tableau 7 : Ajustements des paramètres de la phase de croissance exponentielle

Bacteries	Pente (k)	τ , heures
<i>E.coli</i>	0.47 ± 0.02	4 ± 0.5
<i>S.aureus</i>	0.36 ± 0.02	5.5 ± 0.5
<i>P.aeruginosa</i>	0.33 ± 0.01	5 ± 0.5

Le taux de croissance bactérienne diffère pour les trois souches et ne dépend pas du type de bactérie, Gram positif ou Gram négatif. En effet, *E.coli* a le taux de multiplication bactérien le plus rapide, tandis que *S.aureus* et *P.aeruginosa* ont des taux de croissance plus bas, assez similaires. Un résultat important concerne le point de passage du délai de croissance à la phase de croissance exponentielle, soit $\tau = 5 \pm 1$ heures pour les souches considérées. Cette valeur est en accord avec l'analyse de la concentration critique de la figure 58. Ces résultats de mesures de la densité optique confirment l'hypothèse de différentes sensibilités des bactéries à l'action bactéricide des nanoparticules au cours des principales phases de croissance.

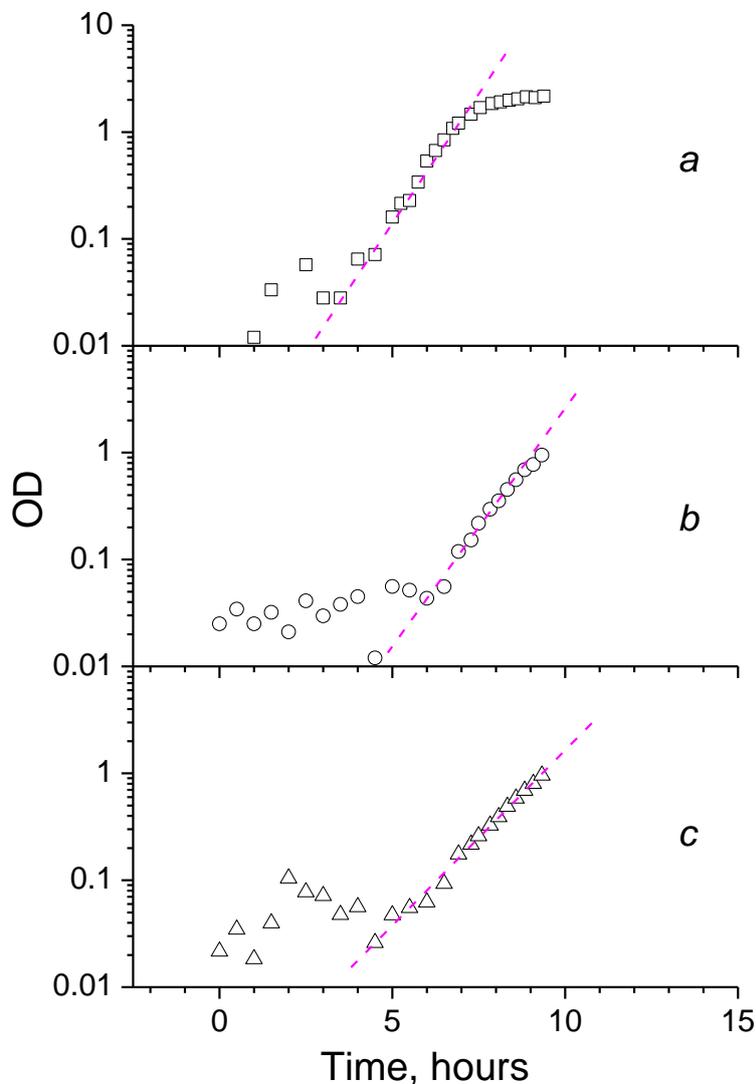


Figure 58: Cinétique de croissance de *E.coli* (a), *S.aureus* (b) et *P.aeruginosa* (c).

L'effet antibactérien le plus fort se produit à la phase de croissance exponentielle pendant la multiplication des bactéries actives, ce qui nécessite un apport accru d'un milieu nutritif contenant des espèces biocides. En revanche, les échanges bactériens avec l'environnement s'affaiblissent fortement aux phases de latence et stationnaire, ce qui peut expliquer en partie le renforcement de la résistance aux agents biocides.

5.3 Bioluminescence : ATP métrie

La quantification des concentrations en ATP intracellulaire a été réalisée par la méthode de bioluminescence. Nous utilisons dans ces tests uniquement les nanoparticules de CuO et de ZnO, le TiO₂ n'ayant démontré aucune activité antibactérienne lors des tests précédents. Des concentrations des sols de nanoparticules similaires à celles de la méthode de diffusion sur disque ont été utilisées. Les mesures ont été réalisées dans des plaques à 96 puits après avoir déposé dans chaque puits 50 µL de suspension bactérienne à 10⁹ UFC/mL et 50 µL de solution de NPs. Les mesures instantanées d'ATP dans les solutions de NPs de ZnO et de CuO convergent vers zéro pour les trois souches bactériennes. Le témoin positif (suspensions bactériennes sans NPs) a été mesuré comme référence pour chaque souche. La figure 59 montre une valeur élevée d'ATP au contrôle positif avec toutes les souches en phase stationnaire. En revanche une forte diminution du signal d'ATP a été observée avec tous les échantillons en contact avec des NPs de ZnO et de CuO, ce qui met en évidence leur effet antibactérien.

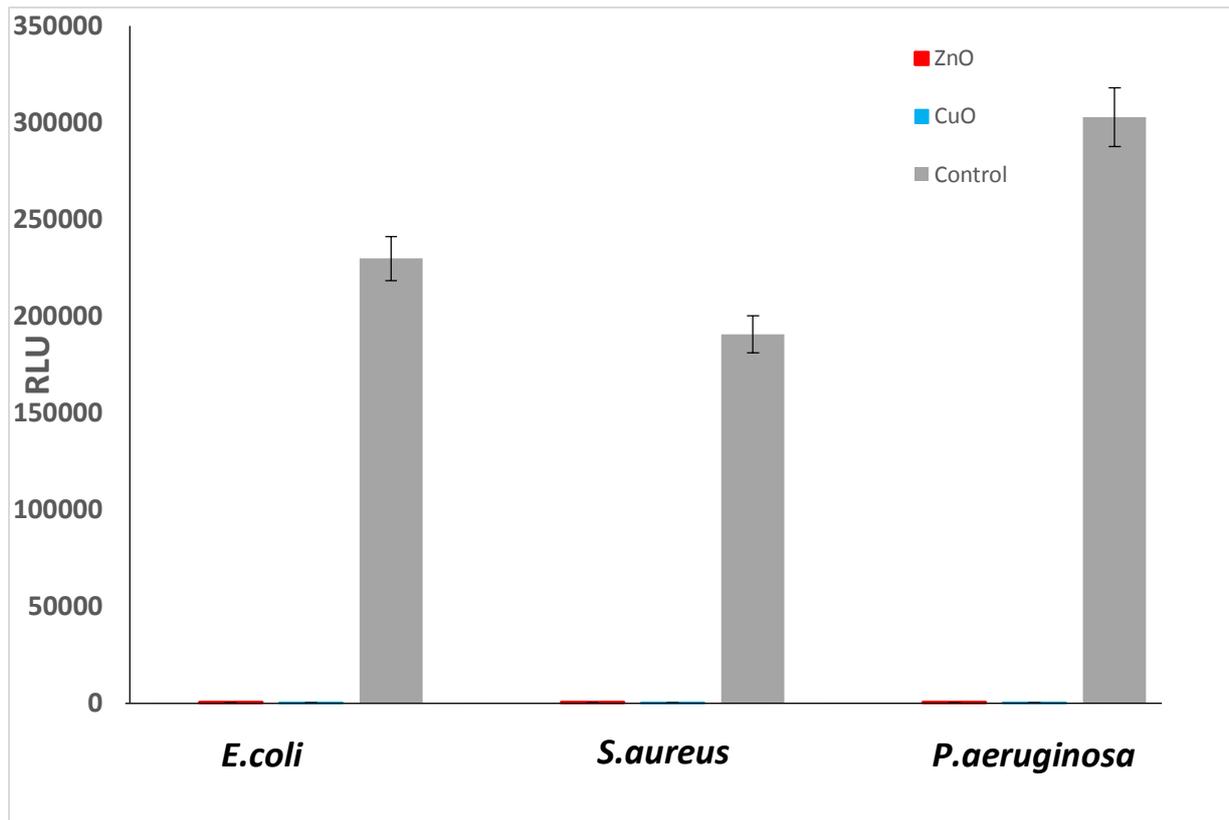


Figure 59 : Mesure d'ATP des suspensions bactériennes en contact avec les nanoparticules ZnO and CuO (1.5 mol/l).

5.3.1 Effet de la concentration sur l'activité antibactérienne

Pour évaluer l'effet de la concentration des NPs sur la viabilité bactérienne, nous avons effectué des mesures en quatre exemplaires avec différentes concentrations de NPs comprises entre 0.5 et 1.5 M, les résultats sont présentés dans la figure 60.

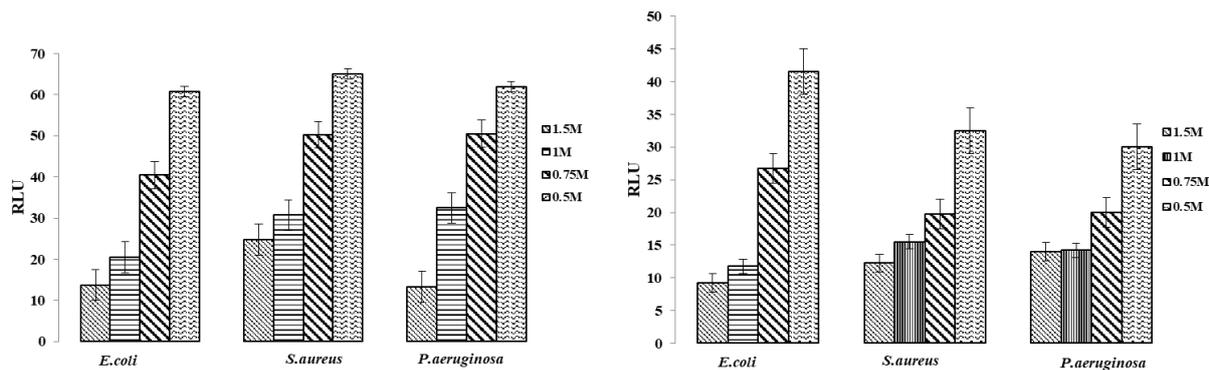


Figure 60: Mesures d'ATP des colloïdes de ZnO et CuO (1=1.5 mol/l, 2=1 mol/l, 3=0.75 mol/l, 4= 0.5 mol/l) contre *E. coli*, *S. aureus*, *P. aeruginosa*.

La figure 60 montre qu'une augmentation de la concentration en nanoparticules entraîne une diminution de la viabilité bactérienne. Dans le même temps, à n'importe quelle concentration, les NPs de CuO présentent l'activité la plus forte contre *E. Coli*, *S. aureus* et *P. aeruginosa* par rapport à celle du ZnO, ce qui confirme les conclusions des méthodes de diffusion sur disque et en puits.

Cette différence pourrait être liée à une plus faible agrégation des nanoparticules de CuO qui se traduirait par une plus grande surface de contact. Les nanoparticules de ZnO et de CuO ont manifesté une activité antibactérienne significative contre les bactéries Gram positif et Gram négatif.

5.3.2 Cinétique de l'activité antibactérienne de ZnO et CuO

La cinétique de l'activité antibactérienne a été étudiée pour les NPs de ZnO et de CuO par la méthode de bioluminescence.

La figure 61 montre le suivi cinétique au cours du temps par ATP métrie pour des NPs de ZnO et CuO à une concentration de 0.75 M. On remarque qu'à la même concentration, il y a une diminution de la population bactérienne au fil du temps. En effet, on observe le même comportement pour les deux espèces de NPs, c'est-à-dire une diminution des bactéries progressive de t_0 à $t_4 = 40$ min. Le mécanisme d'action des nanoparticules pour l'inhibition bactérienne dépend donc du temps.

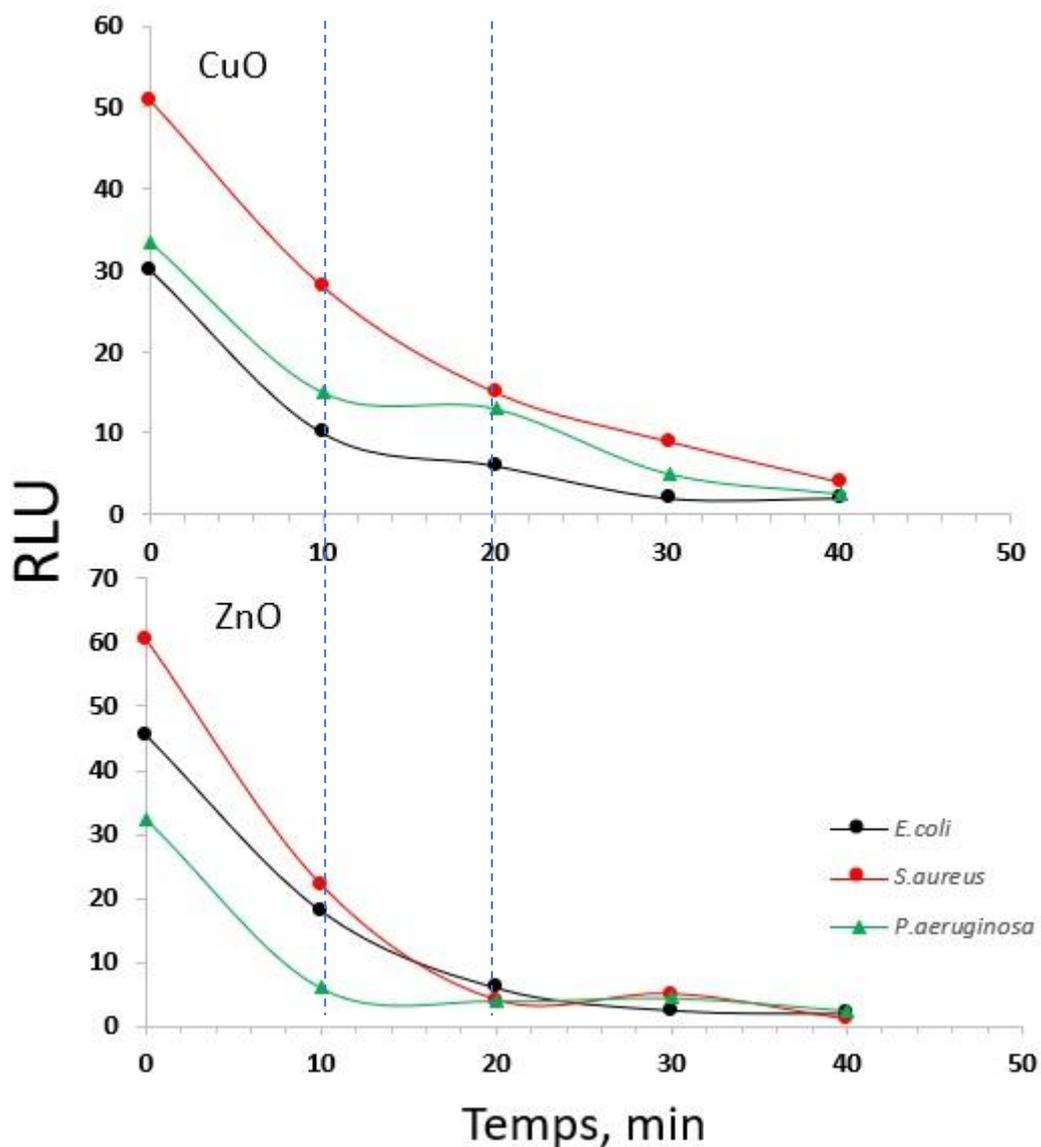


Figure 61: Cinétique de l'activité antibactérienne des nanoparticules de ZnO et CuO par bioluminescence

Nous constatons un abattement significatif de la population bactérienne selon plusieurs phases en fonction de la nature des souches bactériennes : Gram + et Gram -. Pour la souche *S. aureus* nous remarquons deux phases d'abattements ; la plus significative de 0 à 20 min et la moins prononcée de 20 à 40 min. Pour les autres souches bactériennes Gram-, nous avons la même tendance selon trois phases ; La première de 0 à 10 min, la deuxième de 10 à 20 min et la troisième à partir de 30 min.

En appliquant, en première approximation, une cinétique d'ordre 1 (voir annexe 3) on obtient les constantes de vitesse suivantes :

Tableau 8 : Constantes de vitesse d'ordre 1 (en min^{-1})

	CuO	ZnO
<i>E. coli</i>	0,08	0,09
<i>S. aureus</i>	0,04	0,1
<i>P. aeruginosa</i>	0,06	0,07

Il semble que les NPs de CuO et de ZnO présentent une cinétique similaire vis-à-vis de *E. coli* et *P. aeruginosa*. En revanche la vitesse de dégradation de *S. aureus* est deux fois plus importante avec les NPs de ZnO comparativement à ceux du CuO.

Afin d'effectuer les tests antibactériens avec ces nanoparticules sous formes de couches minces, nous avons dans un premier temps validé une méthode de décrochage des souches bactériennes sur le substrat utilisé pour l'élaboration des couches minces.

5.4 Méthode de décrochage sur lames

Il existe aujourd'hui peu de méthodes/Normes permettant l'évaluation de l'activité antibactérienne sous forme de couches minces. Dans ce travail, nous nous sommes inspirés d'une norme européenne NF EN 14561 (2007-03) [202], qui consiste en un essai qualitatif de porte-germes pour évaluer l'efficacité antimicrobienne pour des instruments utilisés en médecine humaine. Dans cet essai deux mécanismes sont importants, d'abord le mécanisme d'adhésion des bactéries aux supports, et ensuite le mécanisme de décrochage de ces bactéries afin de réaliser un comptage de la viabilité de la population bactérienne.

Le mécanisme d'adhésion fait appel à un réseau de fibres de polysaccharidiques qui sont sécrétées par la bactérie. Le glycocalyx, qui est un manteau membranaire, contribue principalement à l'adhésion des bactéries à divers supports. De plus, les oxydes métalliques peuvent augmenter l'adhésion des bactéries chargées négativement aux surfaces, principalement en raison de leur charge positive. Le caractère hydrophobe des surfaces des oxydes métalliques peut également augmenter l'adhésion des bactéries. Il est donc nécessaire de pouvoir "décrocher" les bactéries adhérentes à la surface des supports, afin d'améliorer le dénombrement de la population bactérienne. Le "décrochage" par clivage des chaînes polysaccharidiques, se fait par des techniques physiques (vortex, ultrasons) ou chimiques (détergents, chélateurs) [245,246].

5.4.1 Validation du protocole de lavage des lames selon la norme NF EN 14561

Pour déterminer les traitements physiques appropriés ainsi que leur durée, mais aussi choisir les concentrations des produits chimiques à combiner pour effectuer le décrochage des bactéries, nous avons mis en place plusieurs protocoles en se basant sur la norme NF EN 14561.

Pour l'ensemble des essais, réalisés en triplicata les cryobilles de chaque souche étudiée sont misent en culture dans un bouillon nutritif Trypto-Caséine-Soja (TCS) et incubés pendant 18h, puis réensemencé à partir d'1mL de la culture dans 9 mL de (TCS) et enfin incubés pendant 18h.

5.4.1.1 Essais sur des suspensions de *E. coli* et *S. aureus* avec Eugon LT100

Cet essai est effectué avec la souche *Escherichia coli* (BG-) et la souche *Staphylococcus aureus* (CG+) en suspension dans de l'eau peptonée et déposée sur une lame en verre à une concentration de 10^5 UFC/mL. Le volume du dépôt est de 50 μ L. Le séchage se fait dans une étuve à 35°C avec un temps de séchage inférieur à 1 heure.

Les conditions de lavage sont les suivantes :

- Billes de verre avec vortex durant 3 minutes dans une solution Eugon LT100.
- Ultrasonication durant 1-minute puis vortex durant 3 secondes, renouvelé 3 fois dans une solution Eugon LT100.

Un schéma synoptique du travail effectué est représenté dans la figure suivante :

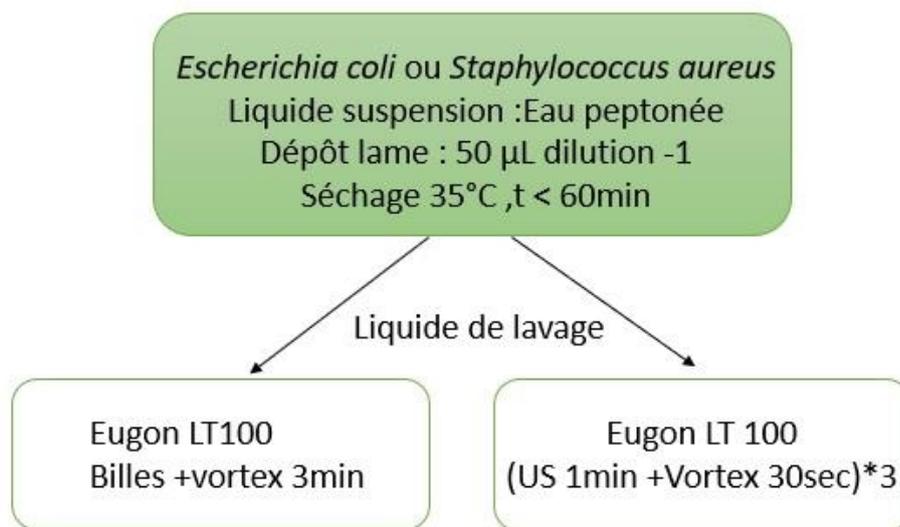


Figure 62: Schéma récapitulatif des essais 1 et 2 du protocole de lavage des lames

Les résultats obtenus montrent une viabilité des souches utilisées (tableaux 9 et 10). Les deux techniques employées permettent de récupérer une partie de la suspension bactérienne déposée sur les lames. La technique par ultrasonication est cependant moins performante que la technique par les billes de verre. La totalité des germes est récupérée pour *S. aureus* à la différence d' *E. coli* par la technique des billes. En effet pour *S. aureus* 5,04 log UFC/mL sont déposés sur lame et 5,14 sont récupérés alors que pour *E. coli*, seul 4,47 log sont récupérés pour 5,46 déposés. Cette différence peut provenir de la spécificité de la nature de la structure pariétale des deux souches.

Tableau 9 : Résultats de l'essai 1 sur la souche *E. coli*

<i>E. coli</i>	UFC/mL	Log UFC/mL
Jo (dépôt sur lame)	2,9 10 ⁵	5,46
Témoin US	6,2 10 ⁵	5,79
US+ Eugon LT 100	7,1 10 ³	3,85
Billes de verre + Eugon LT 100	3 10 ⁴	4,47

Tableau 10 : Résultats de l'essai 2 sur la souche *S.aureus*

<i>S.aureus</i>	UFC/mL	Log UFC/mL
Jo (dépôt sur lame)	1,1 10 ⁵	5,04
Témoin US	6,2 10 ⁵	5,79
US+ Eugon LT 100	3,1 10 ⁵	5,49
Billes de verre + Eugon LT 100	1,4 10 ⁵	5,14

Pour la suite des essais, nous gardons les billes de verres + vortex comme traitement physique, puis en se basant sur la littérature nous allons rechercher un agent chimique plus puissant que l'Eugon LT100 qui permet un meilleur décrochage des souches étudiées.

5.4.1.2 Essais sur des suspensions de *E.coli* et *S.aureus* avec Lauryl Sulfate de Sodium (LSS)

Cet essai est effectué avec la souche *Escherichia coli* (BG-) et la souche *Staphylococcus aureus* (CG+) en suspension dans de l'eau peptonée et déposée sur une lame de verre à une concentration de 10⁵ UFC/mL. Le volume du dépôt est de 50 µL. Le séchage se fait dans une étuve à 35°C avec un temps de séchage inférieur à 1 heure.

Les conditions de lavage sont les suivantes :

-Billes de verre avec vortex durant 3 fois 1minute dans une solution LSS à 0.001%

Les résultats obtenus montrent une viabilité des souches utilisées (tableaux 11 et 12). Cependant, le lauryl sulfate de sodium ne permet pas de récupérer la totalité des germes déposés. En effet pour *S. aureus* 5,32 log UFC/mL sont déposés sur lame et 3,7 sont récupérés et pour *E. coli* pour 5,27 sont déposés et 3,39 log sont récupérées.

Tableau 11 : Résultats de l'essai 3 sur la souche *E. coli*

<i>E. coli</i>	UFC/mL	Log UFC/mL
Jo (dépôt sur lame)	1,9 10 ⁵	5,27
Témoin	5,3 10 ⁵	5,72
Bille de verre + LSS	2,5 10 ³	3,39

Tableau 12: Résultats de l'essai 3 sur la souche *S.aureus*

<i>S. aureus</i>	UFC/mL	Log UFC/mL
Jo (dépôt sur lame)	2,1 10 ⁵	5,32
Témoin	5,3 10 ⁵	5,72
Billes de verre +LSS	5,1 10 ³	3,7

5.4.1.3 Essais sur des suspensions de *E. coli* et *S. aureus* avec l'éthylènediaminetétraacétique (EDTA)

Les suspensions bactériennes *E. coli* et *S. aureus* en suspension dans de l'eau peptonée sont déposées sur les lames de verre contenant les couches minces de nanoparticules à une concentration de 10⁵UFC/mL. Le volume de dépôt est de 50µL. Le séchage se fait dans une étuve à 35°C avec un temps de séchage inférieure à 60min.

Les conditions de lavage sont les suivantes :

- Les lames sont mises en contact avec 20 mL d'un agent chélateur EDTA 0.1%.
- Billes de verre de 3mm et une agitation vortex pendant 3 fois 1 min.

Tableau 13 : Résultats de l'essai 4 sur *S. aureus*

<i>S. aureus</i>	UFC/mL	Log UFC/mL
Jo (dépôt sur lame)	2,5 10 ⁵	5,39
Témoin	5 10 ⁵	5,69
Billes de verre + EDTA	3,7 10 ⁵	5,43

Tableau 14 : Résultats de l'essai 4 sur *E. coli*

<i>E. coli</i>	UFC/mL	Log UFC/mL
Jo (dépôt sur lame)	2,8 10 ⁵	5,44
Témoin	5 10 ⁵	5,69
Billes de verre + EDTA	3,1 10 ⁵	5,49

Les résultats obtenus montrent une viabilité des souches utilisées (tableaux 13 et 14). L'ensemble des germes déposés sont récupérés. Le sel disodique EDTA à 0.1% couplé au traitement physique vortex +billes de verre constitue le protocole le mieux adapté pour la suite de nos expériences.

5.4.2 Protocole de lavage des lames

Pour le dénombrement de la population bactérienne après lavage des lames contenant les couches minces de nanoparticules, on réalise deux dilutions successives de la solution d'EDTA dans de l'eau physiologique, puis on ensemence les 3 solutions dans des boîtes de Pétri contenant de la gélose PCA qui seront incubées pendant 24 h à 37°C. Les lames contenant les NPs et les suspensions bactériennes sont également déposées dans des boîtes de Pétri contenant 10 mL de gélose PCA, puis recouvert de 10 mL de PCA en surfusion.

Le schéma de la figure 63 reprend les différentes étapes de la méthode.

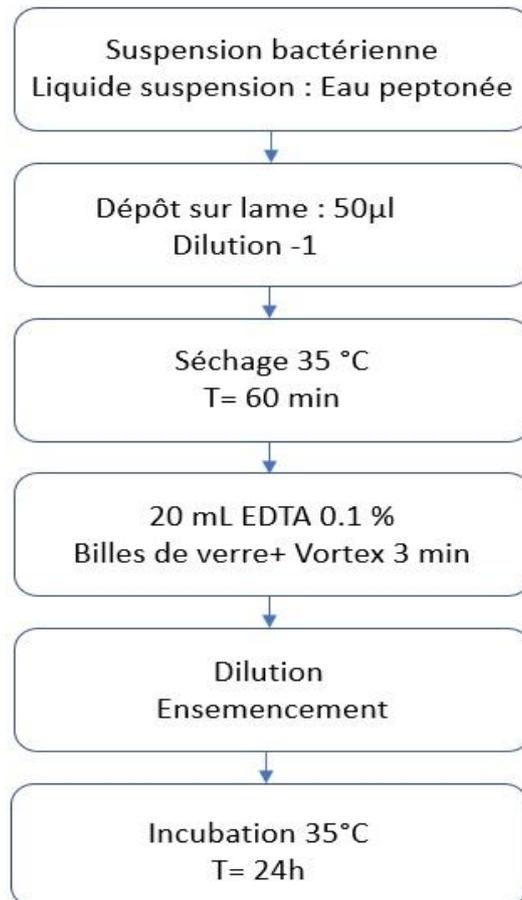


Figure 63 : Etapes du protocole de lavage des plaques

Les résultats obtenus après incubation des lames sont présentés dans la figure 64 et montrent une diminution de la viabilité des souches étudiées quand elles sont en contact avec les NPs de ZnO, CuO et TiO₂. En effet on observe aucune croissance bactérienne sur les géloses dans lesquelles les lames de couches minces de NPs ont été disposés.

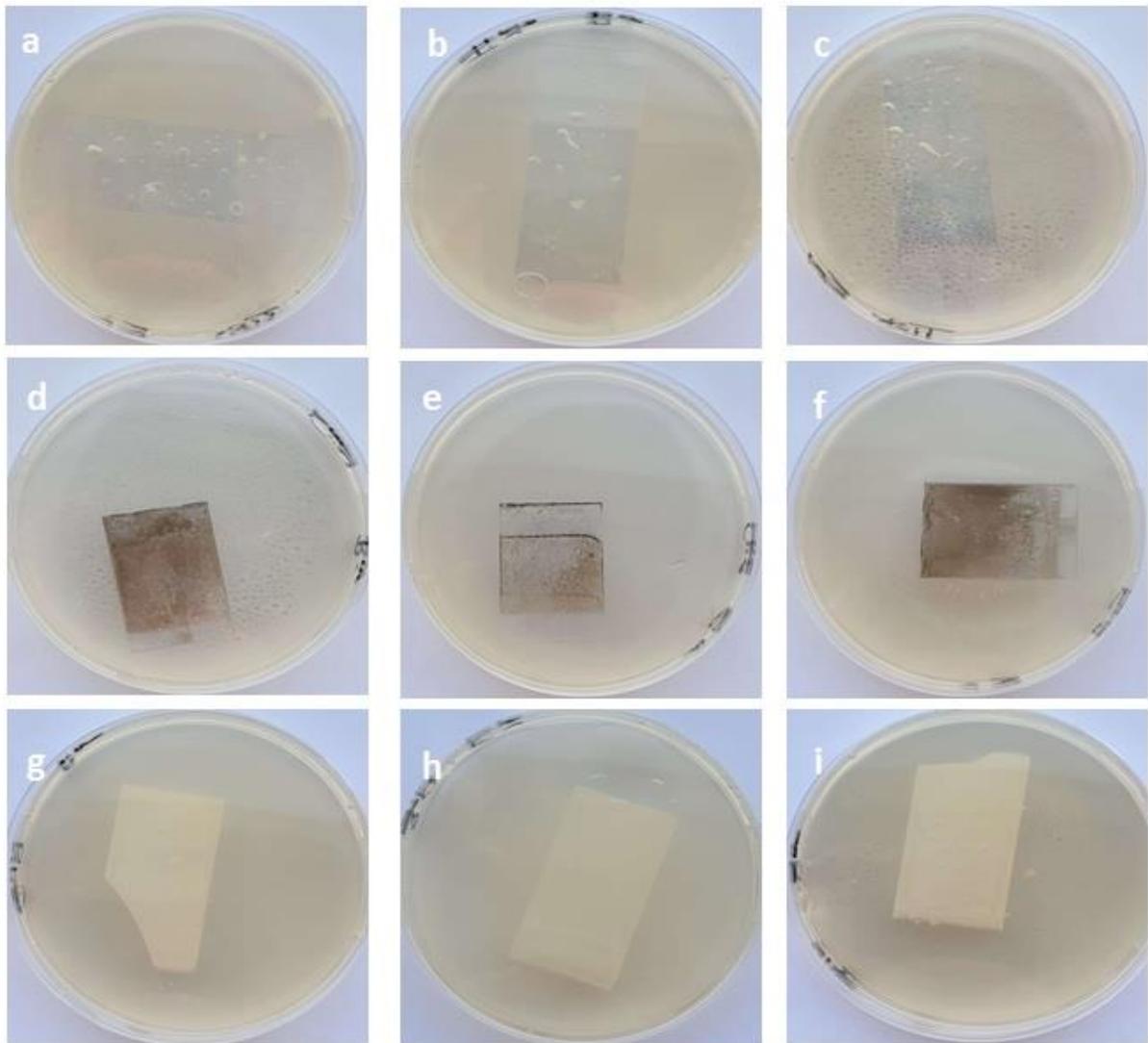


Figure 64 : Résultats après 24h d'incubation à 37°C des lames de NPs en contact avec les bactéries TiO_2 /*E. coli* (a), TiO_2 /*S. aureus* (b), TiO_2 /*P. aeruginosa* (c) CuO /*E. coli* (d), CuO /*P. aeruginosa* (e), CuO /*S. aureus* (f), ZnO /*E. coli* (g), ZnO /*S. aureus* (h) and ZnO /*P. aeruginosa* (i)

Les résultats présentés au tableau 15 sont une moyenne de trois essais par échantillon et montrent que les films minces des nanoparticules présentent une forte activité antibactérienne. On note une suppression de 5 log de la population bactérienne déposée pour les 3 souches étudiées.

Tableau 15 : Résultats du protocole de lavage des lames de nanoparticules au contact de *E. coli*, *S. aureus* et *P. aeruginosa*

	Souches bactériennes	Déposée log (UFC/mL) (UFC/mL)	Récupérée log (UFC/mL) UFC/mL
ZnO	<i>E. coli</i>	5,71 (5,2 10 ⁵)	0,3 2
	<i>S. aureus</i>	5,66 (4,6 10 ⁵)	0,54 3,5
	<i>P. aeruginosa</i>	5,63 (4,3 10 ⁵)	0,43 3
CuO	<i>E. coli</i>	5,71 (5,2 10 ⁵)	<1 0
	<i>S. aureus</i>	5,66 (4,6 10 ⁵)	0,43 3
	<i>P. aeruginosa</i>	5,63 (4,3 10 ⁵)	<1 0
TiO₂	<i>E. coli</i>	5,71 (5,2 10 ⁵)	0,39 2,5
	<i>S. aureus</i>	5,66 (4,6 10 ⁵)	0,3 2
	<i>P. aeruginosa</i>	5,63 (4,3 10 ⁵)	<1 1

5.5 Etude de cytotoxicité

Malgré les avantages potentiels des nanoparticules, la nanotoxicité a suscité des préoccupations quant à son impact sur la santé humaine. Dans les travaux actuels, la taille des particules joue un rôle important dans la détermination du comportement biologique des nanomatériaux. La grande surface des NPs fait que le nombre d'atomes ou de molécules à la surface augmente de façon exponentielle pour offrir une réactivité élevée. De nombreuses études *in vitro* montrent l'impact toxico-cinétique et métabolique des NPs. Ces effets dépendent à la fois de la taille et de la forme de ces objets. En effet il a pu être observé que ces NPs peuvent être internalisées par les cellules, adsorbées à des protéines et accumulées dans de nombreux organites [248-250]. Ces effets posent donc la question de la cytotoxicité de ces NPs et de la corrélation entre celles-ci avec la taille et la nature des NPs [251,252].

Nous avons donc évalué la cytotoxicité de nos NPs en solutions colloïdales des NPs (ZnO et CuO) sur des fibroblastes gingivaux normaux humains.

5.5.1 Lignée cellulaire

Nous avons travaillé sur une lignée cellulaire de FG : fibroblastes gingivaux.

5.5.2 Entretien des cellules

Les cellules sont cultivées à 37°C sous 5% de CO₂ dans du milieu DMEM standard (Dulbecco's Modified Eagle's Medium) contenant 10% de sérum de veau foetal (SVF), et 1% d'un mélange de pénicilline (5000 U/ml) streptomycine (5000 U/ml). Les cultures sont « repiquées » deux fois par semaine par Trypsinisation avec 20 mM de trypsine EDTA.

5.5.3 Test de viabilité

Le test de viabilité utilisé dans cette étude est le test au rouge neutre. Celui-ci fournit une estimation quantitative du nombre des seules cellules vivantes en utilisant leur capacité à incorporer le rouge neutre dans leurs lysosomes. Le colorant fixé dans les cellules est extrait par une solution d'éthanol acidifiée, et la mesure de l'absorbance de la solution obtenue permet d'évaluer le nombre de cellules vivantes. Les cellules sontensemencées dans des

plaques 96 puits en raison de 10^4 cellules/puits et incubées à 37°C pendant 24h. Les cellules sont ensuite exposées à des concentrations croissantes (0.5 M à 1.5 M) de NPs pendant 24 heures dans le milieu DMEM (10% SVF). Après 24 heures de traitement la révélation est réalisée ensuite selon les étapes suivantes : le milieu de culture est remplacé par une solution de rouge neutre (0,1% $\mu\text{g/ml}$ de DMEM) pendant 3 heures à 37°C. Les cellules sont lavées au PBS et le rouge neutre est extrait par une solution de désorption (1% d'acide acétique, 50% d'éthanol (95%), 49% d'eau) (v/v). La Densité Optique (DO) de la solution est enfin mesurée par spectrophotométrie à 540 nm dans le lecteur de plaques. Des moyennes d'absorbance sont ainsi établies pour chaque groupe de puits et comparées à celle du groupe témoin (non traité), ce qui permet d'exprimer la viabilité de chaque groupe de cellules en pourcentage relativement à la viabilité des cellules témoins ($\text{DO traité} / \text{DO témoin} \times 100$). Chaque test a été réalisé en triplicata.

Tableau 16: Densité optique des cellules à 540 nm en réponse à la coloration au rouge neutre

	Nanoparticules				Témoin négatif (Cellules+Doxorubicine)	Cellules + solvant	Témoin positif (cellules seules)
	0,5 M	0,75 M	1M	1,5 M			
CuO	0,114	0,103	0,124	0,114	0,135	0,202	0,4
ZnO	0,178	0,11	0,123	0,116	0,153	0,173	0,395

Le tableau 16 présente la moyenne des absorbances obtenues pour chaque groupe de puits. On remarque une forte diminution du nombre de cellules misent en contact avec le solvant seul, et des cellules misent en contact avec l'ensemble des nanoparticules en colloïdes par rapport au témoin. Les deux oxydes métalliques utilisés provoquent quasiment la même diminution du nombre de cellules. L'augmentation de la concentration en nanoparticules n'augmente pas forcément la cytotoxicité envers les cellules. Ces premiers résultats laissent à penser que le solvant utilisé (propan2-ol) entraîne une cytotoxicité (voir tableau 17).

Tableau 17: Viabilité cellulaire après un contact de 24h avec les nanoparticules

Concentration en mol/L	0,5	0,75	1	1,5	Solvant
CuO	28,50%	25,75%	31%	28,50%	33,75%
ZnO	45,06%	27,85%	31,14%	29,37%	29,36%

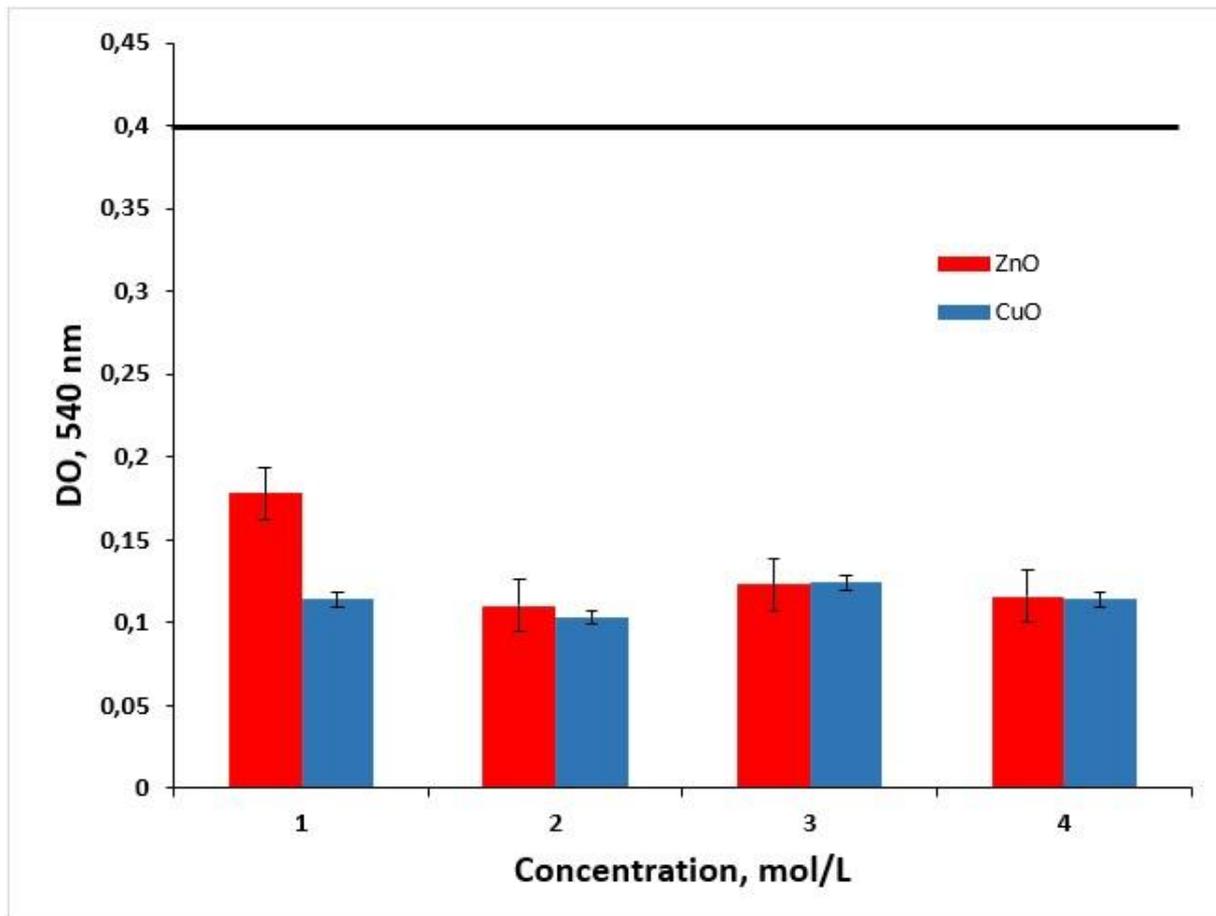


Figure 65: Mesure de DO à 540 nm après coloration au rouge neutre

La figure 65 permet de comparer le comportement cytotoxique des nanoparticules de ZnO et de CuO à différentes concentrations. On remarque qu'à la plus faible concentration (1= 0.5 M) le CuO a un effet cytotoxique plus élevés que le ZnO. Et qu'à partir de (2= 0.75 M) les deux oxydes ont le même comportement.

5.6 Discussion

Les mécanismes antibactériens des nanoparticules restent encore peu expliqués. Par exemple, de nombreuses études attribuent l'activité antibactérienne au stress oxydatif ou aux ROS, alors que pour d'autres nanoparticules tel que le MgO, le mécanisme antibactérien ne peut pas être associé à la régulation du métabolisme bactérien. Par conséquent, les

mécanismes antibactériens des nanoparticules méritent d'être abordés dans les recherches futures.

L'absence de normes unifiées est l'une des limites des études existantes sur les mécanismes antibactériens des nanoparticules. En particulier, différentes souches bactériennes, différents temps d'action et caractéristiques de nanoparticules ont été examinés dans différentes études, ce qui rend difficile la comparaison de l'activité antibactérienne. De plus, aucune méthode ne remplit toutes les conditions pour obtenir des informations sur les mécanismes antibactériens des nanoparticules. Etant donné que plusieurs types de nanoparticules présentent des effets antibactériens différents, une analyse complète est souvent proposée pour étudier les mécanismes d'actions antibactériens potentiels. Des souches bactériennes sensibles sont également souvent utilisées pour déterminer avec précision l'activité antibactérienne des nanoparticules.

Les autres limites sont la structure complexe de la membrane cellulaire bactérienne et l'absence d'approches de recherche pour les études *in vitro*. En outre, les modèles *in vitro* ne peuvent pas totalement simuler la condition *in vivo* pour reproduire avec précision les interactions cellulaires dans le corps. Par conséquent, il est impossible d'estimer l'action antibactérienne des nanoparticules uniquement par la culture cellulaire bactérienne *in vitro*.

Il reste encore beaucoup de questions sur la nanoneurotoxicité, telle que la manière dont les nanoparticules traversent la membrane cellulaire bactérienne. La paroi cellulaire bactérienne est à la fois une barrière et un canal pour le mouvement entrant et sortant des substances. Dans les membranes des cellules bactériennes à Gram négatif, les porines, qui permettent généralement le passage de molécules inférieures à 600 Da, sont les principaux canaux pour le mouvement des molécules étrangères entrant et sortant du corps cellulaires bactériens. Par conséquent, le transport de presque toutes les nanoparticules sera limité en raison de leur taille. Cependant certains spécialistes ont suggéré que les porines pouvaient faciliter le passage des nanoparticules dont le diamètre est compris entre 1 et 9 nm à travers la structure pariétale bactérienne [253]. Une endocytose bactérienne, similaire à celle observée pour les cellules eucaryotes, peut être considérée comme un autre mécanisme [254]. Cependant aucun résultat n'a été présenté sur ce sujet. Actuellement, le mécanisme le plus raisonnable est que l'exposition des cellules bactériennes à de faibles concentrations

de nanoparticules provoque la désintégration complète des cellules et l'élimination de la couche de LPS (uniquement chez les Gram négatifs).

De plus les études portant sur les mécanismes inhibiteurs intracellulaires restent limitées. Le stress oxydatif induit par les nanoparticules mérite une attention particulière, et peu d'études ont examinés l'action des nanoparticules sur l'expression des gènes, la synthèse des protéines et le métabolisme des cellules bactériennes.

5.7 Conclusion

Les nanoparticules inorganiques oxo-alcoxy ZnO, CuO et TiO₂ synthétisées présentent un effet antibactérien important vis à vis des souches de bactéries à Gram-positif (*Staphylococcus aureus*) et à Gram-négatif (*Escherichia coli* et *Pseudomonas aeruginosa*). Les méthodes de diffusion par disques et par puits, les analyses de bioluminescence et de densité optique ont été utilisées pour confirmer l'activité biocide des NPs, mise en évidence par un fort déclin des souches bactériennes après un bref contact avec les NPs. La modélisation de la diffusion brownienne des espèces a permis de conclure à une sensibilité différente des agents bactériens aux agents toxiques à différents stade de la cinétique d'évolution de leur population. Il a été conclu que la suppression bactérienne est plus efficace lors de la phase de croissance exponentielle, alors que son efficacité est moindre lors des phases de latence et stationnaire. Les agents toxiques les plus probables sont supposés être des ions Cu²⁺ et Zn²⁺, tandis que les nanoparticules de CuO et ZnO constituaient une excellente source délivrant ces espèces toxiques. Les bactéries ont montré une forte résistance aux NPs au cours de la phase de latence initiale, tandis que les NPs de CuO et de ZnO ont montré une forte activité antibactérienne à la phase de croissance exponentielle, ce qui correspond à la concentration critique équivalente $C_{crit} = 2.3 \pm 0.2$ mmol /l de Cu²⁺ ou de Zn²⁺. Les tests antibactériens sur les couches minces des NPs montrent également une activité antibactérienne par la suppression de 5 log de la population bactérienne après contact avec celles-ci.

Conclusion générale & perspectives

6 Conclusion générale

Ce travail de thèse nous a permis de mettre en évidence l'activité antibactérienne des NPs oxydes métalliques. Nous avons pu synthétiser des solutions colloïdales de ZnO, CuO et TiO₂ par la méthode sol-gel sous atmosphère contrôlée. Deux voies de synthèse ont été privilégiées :

- La synthèse de TiO₂ dans un réacteur sol-gel à micro-mélange rapide qui permet le contrôle de la taille moyenne et de la monodispersité des nanoparticules
- L'élaboration des NPs de ZnO et de CuO à partir de précurseurs d'acétate à l'intérieur d'une boîte à gants (O₂ et H₂O < 0,5 ppm).

La caractérisation par DLS et MET de ces solutions colloïdales ont montré une monodispersité des NPs et une taille moyenne de 2R= 3nm pour ZnO et CuO et de 5 nm pour le TiO₂.

Les solutions colloïdales de NPs ont ensuite servi à la réalisation de couches minces par la technique de Dip-coating sur des substrats de verre préalablement traités. Ces couches minces ont été caractérisées par MEB, MEB-EDX, Raman et DRX. Les résultats ont démontré la présence de couches minces de ZnO, CuO et TiO₂. L'analyse des gels de ZnO et CuO par Raman et ATG-ATD confirment la présence de ces oxydes et ont permis de déterminer la température optimale de préchauffage, qui est de 250°C.

L'évaluation de l'effet antibactérien de ces NPs sous forme de colloïdes à démontrer un effet antibactérien de ZnO et CuO vis à vis des souches de bactéries à Gram-positif (*Staphylococcus aureus*) et à Gram-négatif (*Escherichia coli* et *Pseudomonas aeruginosa*). Cependant le TiO₂ sous forme amorphe ne présente aucun effet inhibiteur sur la croissance bactérienne. Un modèle de la diffusion brownienne des espèces a été conçu pour démontrer la sensibilité des souches bactériennes aux NPs et ions Cu²⁺ et Zn²⁺ à différents stades de la cinétique de croissance des bactéries. Le modèle a également mis en évidence que la suppression des agents potentiellement pathogènes est plus efficace lors de la phase de croissance exponentielle des bactéries et moindre lors des autres phases.

Un protocole a été mis en place pour évaluer l'efficacité bactérienne des couches minces, en se basant sur la norme européenne NF EN 14561 (2007-03). Après un temps de contact

inférieur à 60 min, les suspensions bactériennes sont décrochées de la surface des lames, puis énumérer pour estimer leur viabilité. Les résultats montrent une efficacité antibactérienne de l'ensemble des NPs sur les différentes souches étudiées avec une réduction de 5 log de la population bactérienne après contact avec les lames recouvertes de couches minces de NPs.

Finalement, nous avons réalisé un test de cytotoxicité in vitro des solutions colloïdales des NPs de CuO et de ZnO sur des cellules de fibroblaste gingival. Les résultats de ce test montrent une diminution de la viabilité cellulaire, on suggère qu'elle est due en partie à la présence du solvant (propan-2-ol).

Perspectives de ce travail :

Ce travail pourrait se poursuivre sur plusieurs pistes :

- Effectuer les tests d'activité antibactérienne sur d'autres souches : anaérobie stricte, pour voir si l'effet de l'élimination d'oxygène intervient sur le mode d'action par les ROS. Sur des espèces de champignons autre que *C. albicans* pour mieux étudier l'effet fongicide des NPs. Et enfin faire des tests sur des biofilms qui constituent des structures qui peuvent protéger les bactéries qui les composent contre les attaques des antimicrobiens, ces tests seraient très intéressants surtout pour le domaine hospitalier.
- Intégrer les NPs utilisés lors de ce travail dans des formulations de peintures, résines, et autres matériaux d'intérêts pour voir les interférences entre ces dernières et la formulation globale, mais également afin d'analyser l'effet antibactérien dans un milieu.
- Enfin reprendre les tests de cytotoxicité in vivo en s'affranchissant de l'effet du solvant pour mieux évaluer la cytotoxicité propre de ces nanoparticules d'oxydes métalliques.

Références

Références

- [1] M.E. Davey and G. A. O'Toole, « Microbial biofilms: from ecology to molecular genetics », *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, vol. 64, no. 4, pp 847-867, 2000.
- [2] L. Hall-Stoodley, J. W. Costerton, and P. Stoodley, « Bacterial biofilms: from the natural environment to infectious diseases », *Nature Reviews Microbiology*, vol. 2, no. 2, pp. 95-108, 2004.
- [3] P. Watnick and R. Kolter, « Biofilm, city of microbes », *Journal of Bacteriology*, vol. 182, no. 10, pp. 2675-2679, 2000.
- [4] Baek Y.-W., An Y.-J. Microbial toxicity of metal oxide nanoparticles (CuO, NiO, ZnO, and Sb₂O₃) to *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis*, and *Staphylococcus aureus*. *The Science of the Total Environment*. 2011;409(8):1603–1608
- [5] A.-P. Magiorakos, A. Srinivasan, R. B. Carey et al., « Multidrug-resistant, extensively drug-resistant and pandrug-resistant bacteria: an international expert proposal for interim standard definitions for acquired resistance, » *Clinical Microbiology and Infection*, vol. 18, no. 3, pp. 268–281, 2012.
- [6] Horan TC, Gaynes RP. Surveillance of nosocomial infections. In: Mayhall CG, editor. « Hospital epidemiology and infection control », Philadelphia: Lippincott Williams and Wilkins; . pp. 1659–702, 2004.
- [7] Grohskopf LA, Sinkowitz-Cochran RL, Garrett DO, Sohn AH, Levine GL, Siegel JD, et al. « A national point-prevalence survey of pediatric intensive care unit-acquired infections in the United States », *J Pediatr*. 140:432–8, 2002.
- [8] Rosi NL, Mirkin CA. Nanostructures in biodiagnostics. *Chem Rev*. 2005; 105:1547-1562.
- [10] Raghupati KR, KOodali RT, Manna AC. Size-dependent bacterial growth inhibition and mechanism of antibacterial activity of zinc oxide nanoparticles. *Langmuir*. 2011; 27: 4020-4028.
- [11] Lewis K, KlibanovAM. Surpassing nature: rational design of sterile-surface materials. *Trends Biotechnol*. 2005; 23:343-348.

- [12] Azam A, Ahmed AS, Oves M, Khan MS, Memic A. Size-dependent antimicrobial properties of CuO nanoparticles against Gram-positive and –negative bacterial strains. *Int J Nanomedecine*. 2012; 7:3527-3535.
- [13] Tran N, Mir A, Mallik D, Sinha A, Nayar S, Webster TJ. Bactericidal effects on iron oxide nanoparticles on *Staphylococcus aureus*. *Int J Nanomedecine*. 2010; 5:277-283.
- [14] Mahapatra O, Bhagat M, Gopalakrishnan C, Arunachalam KD. Ultrafine dispersed CuO nanoparticles and their antibacterial activity. *J ExpNanosci*. 2008;3: 185-193.
- [15] Poole K. Mechanisms of bacterial biocide and antibiotic resistance. *J Appl Microbiol*. 2002;92(suppl):55–64.
- [16] Jayaraman R. Antibiotic resistance: an overview of mechanisms and a paradigm shift. *Curr Sci India*. 2009;96(11):1475–1484.
- [17] Fluit AC, Visser MR, Schmitz FJ. Molecular detection of antimicrobial resistance. *Clin Microbiol Rev*. 2001; 14:836–871.
- [18] Roberts MC. Tetracycline resistance determinants: mechanisms of action, regulation of expression, genetic mobility, and distribution. *FEMS Microbiol Rev*. 1996; 19:1–24.
- [19] Russell AD. Bacterial resistance to disinfectants: present knowledge and future problems. *J Hosp Infect*. 1999b;43(Suppl):57–68.
- [20] Smith K, Hunter IS. Efficacy of common hospital biocides with biofilms of multi-drug resistant clinical isolates. *J Med Microbiol* 2008; 57:966-73.
- [21] Tabak M, Scher K, Hartog E, Romling U, Matthews KR, Chikindas ML, et al. Effect of triclosan on *Salmonella typhimurium* at different growth stages and in biofilms *FEMS Microbiol Lett* 2007; 267:200-6.
- [22] Tattawasart U, Hann AC, Maillard J-Y, Furr JR, Russell AD. Outer membrane changes in *Pseudomonas stutzeri* strains resistant to chlorhexidine diacetate and cetylpyridinium chloride. *Int J Antimicrob Agents* 2000b; 16:233-8.
- [23] Wang JT, Sheng WH, Wang JL, Chen D, Chen ML, Chen YC, et al. Longitudinal analysis of chlorhexidine susceptibilities of nosocomial methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolates at a teaching hospital in Taiwan. *J Antimicrob Chemother* 2008; 62:514-7.

- [24] Vega NM, Gore J. Collective antibiotic resistance: mechanisms and implications. *Curr Opin Microbiol* 2014; 21:28-34.
- [25] Sheldon AT. Antiseptic “resistance”: Real or perceived threat? *Clin Infect Dis* 2005; 40:1650 1656
- [26] Russell AD. Mechanisms of bacterial resistance to biocides. *Int Biodeter Biodegrad* 1995; 36:247 265.
- [27] Denyer SP, Maillard J-Y. Cellular impermeability and uptake of biocides and antibiotics in Gram-negative bacteria. *J Appl Microbiol* 2002; 31S:S28 S34.
- [28] Lambert PA. Cellular impermeability and uptake of biocides and antibiotics in Gram-positive bacteria and mycobacteria. *J Appl Microbiol* 2001;31S; S46 S54.
- [29] Walsh SE, Maillard J-Y, Simons C, RussellAD. Studies on the mechanisms of the antibacterial action of orthophthalaldehyde. *J Appl Microbiol* 1999; 87:702 710.
- [30] Walsh SE, Maillard J-Y, Russell AD, Hann AC. Possible mechanisms for the relative efficacies of ortho-phthalaldehyde and glutaraldehyde against glutaraldehyde-resistant *Mycobacterium chelonae*. *J Appl Microbiol* 2001;91;80 92.
- [31] Fraud S, Hann AC, Maillard J-Y, Russell AD. Effects of ortho-phthalaldehyde, glutaraldehyde and chlorhexidine diacetate on *Mycobacterium chelonae* and *M. abscessus* strains with modified permeability. *J Antimicrob Chemother* 2003; 51:575 584.
- [32] Chapman JS. Biocide resistance mechanisms. *Int Biodeter Biodegrad* 2003; 51:133 138.
- [33] Sheldon AT. Antiseptic “resistance”: Real or perceived threat? *Clin Infect Dis* 2005; 40:1650 1656.
- [34] Russell AD, Furr JR, MaillardJ-Y. Microbialsusceptibility and resistance to biocides: an understanding. *ASM News* 1997; 63:481 487.
- [35] Bruinsma GM, Rustema-Abbing M, van der Mei HC, LakkisC,BusscherHJ. Resistance to apolyquaternium-1 lens care solution and isoelectric points of *Pseudomonas aeruginosa* strains. *J Antimicrob Chemother* 2006; 57:764 766.
- [36] Gomez-Escalada M, Maillard J-Y, Russell AD. Effects of triclosan-sensitive and resistant strains of Gramnegative bacteria. *SfAM Swansea* 2001; abstract P30.

- [37] Poole K. Efflux-mediated antimicrobial resistance. *J Antimicrob Chemother* 2005; 56:20-56.
- [38] McMurry LM, Oethinger M, Levy SB. Triclosan targets lipid synthesis. *Nature* 1998; 394:531-532.
- [39] Russell AD. Plasmids and bacterial resistance to biocides. *J Appl Microbiol* 1997; 82:155-165.
- [40] <https://up-magazine.info/index.php/le-vivant/sciences/7325-resistance-aux-antibiotiques-queelles-innovations/>
- [41] Sohn AH, Garrett DO, Sinkowitz-Cochran RL, Grohskopf LA, Levine GL, Stover BH. « Prevalence of nosocomial infections in neonatal intensive care unit patients: Results from the first national point-prevalence survey », *J Pediatr*, 139:821–7, 2001.
- [42] Gastmeier P, Geffers C, Brandt C, Zuschneid I, Sohr D, Schwab F. « Effectiveness of a nationwide nosocomial infection surveillance system for reducing nosocomial infections », *J Hosp Infect*, 64:16–22, 2006.
- [43] Oldmann DA, Weinstein RA, Wenzel RP, Tablan OC, Duma RJ, Gaynes RP, et al. « Strategies to prevent and control the emergence and spread of antimicrobial resistant microorganisms in hospitals. A challenge to hospital leadership ». *JAMA*, 275, pp. 234–40, 1996.
- [44] Stone P. W., Braccia D., Larson E. Systemic review of economic analyses of health care-associated infections. *Am J Infect Control*, 33(9):501–509, 2005.
- [45] Diseases and organisms in healthcare settings. Healthcare-associated infections (HAIs) CDC, Atlanta, Georgia (2016).
- [46] A. Jayanthi, Most common healthcare-associated infections: 25 bacteria, viruses causing HAIs, Becker's hospital review. (2014)
- [47] Enquête nationale de prévalence des infections nosocomiales et des traitements anti-infectieux en établissements de santé, France, mai-juin 2017. Saint-Maurice : Santé Publique France ; 2018. 12 p.

- [48] M. Goutayer, « Nano-émulsions pour la vectorisation d'agents thérapeutiques diagnostiques ; étude de la biodistribution par imagerie de fluorescence in vivo », Thèse de doctorat, Université Pierre et Marie Curie. (2008).
- [49] Mahamed, a. K: Fadill, z, a and S, IHusein F.I. Ak mas Demir. Synthesis of Zircuin nanoparticle in Dw solution. Journal of materialscience Engineering. 2003, B3(6);364-368.
- [50] N.H. Abd Ellah, S.A. Abouelmagd, Surface functionalization of polymeric nanoparticles for tumor drug delivery: approaches and challenges Expert Opin. Drug Deliv., 1–14 (2016).
- [51] Faure, synthesis. Salntariazar-Alvares, G and Anwar Alngas. Dispersio and surface functionalization of oxide nanoparticle science and Technology of Advanced materials. 2013. 4 (2)
- [52] S, Mimard, j. M. Synthesis of gold nanoparticle for biomolecular recognition proques. 2007. P35
- [53] Ared M. R and Rezaei-Zarchis S. Synthesis of zink oxide nanoparticle and their effect on the compressive strength of molecular science (IJMS) 2012. 13(4):4340-4350.
- [54] J. Gross, S. Sayle, A.R. Karow, U. Bakowsky, P. Garidel Nanoparticle tracking analysis of particle size and concentration detection in suspensions of polymer and protein samples: Influence of experimental and data evaluation parameters Eur. J. Pharm. Biopharm., 104 (2016), pp. 30-4
- [55] A. Mboniyirivuze, S. Zongo, A. Diallo, S. Bertrand, E. Minani, L. Lal Yadav, B.Mwakikunga, S. Mokhotjwa Dhlamini, M. Maaza, Titanium Dioxide Nanoparticles Biosynthesis for Dye Sensitized Solar Cells application: Review, Physics and Materials Chemistry, Vol. 3, No. 1, 2015, pp 12-17.
- [56] N. Hoshyar, S. Gray, H. Han and G. Bao, The effect of nanoparticle size on in vivo pharmacokinetics and cellular interaction, Nanomedicine (Lond). 2016 Mar; 11(6): 673–692.
- [57] Bao G, Mitragotri S, Tong S. Multifunctional nanoparticles for drug delivery and molecular imaging. Annu. Rev. Biomed. Eng. 2013; 15:253–282
- [58] Mitragotri S, Anderson DG, Chen X, et al. Accelerating the translation of nanomaterials in biomedicine. ACS Nano. 2015; 9:6644–6654.

- [59] Elias DR, Poloukhine A, Popik V, Tsourkas A. Effect of ligand density, receptor density, and nanoparticle size on cell targeting. *Nanomedicine*. 2013; 9:194–201.
- [60] de Barros AB, Tsourkas A, Saboury B, Cardoso VN, Alavi A. Emerging role of radiolabeled nanoparticles as an effective diagnostic technique. *EJNMMI Res*. 2012; 2:39–53.
- [61] Wang M, Thanou M. Targeting nanoparticles to cancer. *Pharmacolog. Res*. 2010; 62:90–99.
- [62] Narendra Kumar and Sunita Kumbhat (2016), —Essentials in Nanoscience and Nanotechnology| Published 2016 by John Wiley & Sons, Inc, pp 31-74
- [63] K. GNANAPRAKASAM DHINAKAR, Synthesis methods of nanoparticles
- [64] C. Dhand, N. Dwivedi, X. J. Loh, A. N. J. Ying, N. K. Verma, R. W. Beuerman, R. Lakshminarayanan and S. Ramakrishna, Methods and strategies for the synthesis of diverse nanoparticles and their applications: a comprehensive overview, *RSC Adv.*, 2015,5, 105003-105037.
- [65] Mudshinge S R, Deore A B, Patil S and Bhalgat C M 2011 Nanoparticles: Emerging carriers for drug delivery *Saudi Pharm. J.* 19 129-41.
- [66] Huh AJ, Kwon YJ. “Nanoantibiotics”: a new paradigm for treating infectious diseases using nanomaterials in the antibiotics resistant era. *J Control Release*. 2011;156(2):128–145
- [67] Beyth N, Hourri-Haddad Y, Domb A, Khan W, Hazan R. Alternative antimicrobial approach: nano-antimicrobial materials. *Evid Based Complement Alternat Med*. 2015 ;2015 :246012.
- [68] Dioxyde de titane, Nanomatériaux, Nanoparticules alimentation, nanoparticules cancérigène, Nanoparticules dangers, Nanoparticules santé, Nanotechnologies dans : <https://quoidansmonassiette.fr/nanotechnologies-nanomedecine-nanoparticules-danger-sante-alimentation-emergeant-espoirs-dioxyde-titane-traitements-progres/>
- [69] Huh A. J., Kwon Y. J. ‘Nanoantibiotics’: a new paradigm for treating infectious diseases using nanomaterials in the antibiotics resistant era. *Journal of Controlled Release*. 2011;156(2):128–145.
- [70] Nath D., Banerjee P. Green nanotechnology—a new hope for medical biology. *Environmental Toxicology and Pharmacology*. 2013;36(3):997–1014.

- [71] Gato M. A., Naseem S., Arfat M. Y., Dar A. M., Qasim K., Zubair S. Physicochemical properties of nanomaterials: implication in associated toxic manifestations. *BioMed Research International*. 2014; 2014:8.
- [72] Hajipour M. J., Fromm K. M., Ashkarran A. A., et al. Antibacterial properties of nanoparticles. *Trends in Biotechnology*. 2012;30(10):499–511.
- [73] Ashkarran A. A., Ghavami M., Aghaverdi H., Stroeve P., Mahmoudi M. Bacterial effects and protein corona evaluations: crucial ignored factors in the prediction of bio-efficacy of various forms of silver nanoparticles. *Chemical Research in Toxicology*. 2012;25(6):1231–1242.
- [74] Zhao L, Ashraf MA. Influence of silver-hydroxyapatite nanocomposite coating on biofilm formation of joint prosthesis and its mechanism. *West Indian Med J*. 2016 Apr 18; Epub.
- [75] Li H, Chen Q, Zhao J, Urmila K. Enhancing the antimicrobial activity of natural extraction using the synthetic ultrasmall metal nanoparticles. *Sci Rep*. 2015; 5:11033.
- [76] Gao W, Thamphiwatana S, Angsantikul P, Zhang L. Nanoparticle approaches against bacterial infections. *Wires Nanomed Nanobi*. 2014;6(6):532–547.
- [77] Leung YH, Ng AM, Xu X, et al. Mechanisms of antibacterial activity of MgO: non-ROS mediated toxicity of MgO nanoparticles towards *Escherichia coli*. *Small*. 2014;10(6):1171–1183.
- [78] Zakharova OV, Godymchuk AY, Gusev AA, Gulchenko SI, Vasyukova IA, Kuznetsov DV. Considerable variation of antibacterial activity of Cu nanoparticles suspensions depending on the storage time, dispersive medium, and particle sizes. *Biomed Res Int*. 2015 ;2015 :412530.
- [80] Huang Y.-W., Wu C.-H., Aronstam R.S. Toxicity of transition metal oxide nanoparticles: Recent insights from in vitro studies. *Materials*. 2010; 3:4842–4859.
- [81] Halliwell B. Reactive species and antioxidants. Redox biology is a fundamental theme of aerobic life. *Plant Physiol*. 2006; 141:312–322
- [82] Paravicini T.M., Touyz R.M. NADPH oxidases, reactive oxygen species, and hypertension clinical implications and therapeutic possibilities. *Diabetes Care*. 2008 ;31: S170–S180.

- [83] Wu H., Yin J.-J., Wamer W.G., Zeng M., Lo Y.M. Reactive oxygen species-related activities of nano-iron metal and nano-iron oxides. *J. Food Drug Anal.* 2014 ;22 :86–94.
- [84] Z. Huang, et al. Toxicological effect of ZnO nanoparticles based on bacteria *Langmuir*, 24 (2008), pp. 4140-4144.
- [85] Kumar A, Pandey AK, Singh SS, Shanker R, Dhawan A. Engineered ZnO and TiO₂ nanoparticles induce oxidative stress and DNA damage leading to reduced viability of *Escherichia coli*. *Free Radic Biol Med.* 2011; 51:1872–1881.
- [86] Holt KB, Bard AJ. Interaction of silver(I) ions with the respiratory chain of *Escherichia coli*: an electrochemical and scanning electrochemical microscopy study of the antimicrobial mechanism of micromolar Ag⁺ *Biochemistry.* 2005; 44:13214–13223.
- [87] Çalışkan N, Bayram C, Erdal E, Karahaliloğlu Z, Denkbaş EB. Titania nanotubes with adjustable dimensions for drug reservoir sites and enhanced cell adhesion. *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl.* 2014; 35:100–105.
- [88] Esfandiari N, Simchi A, Bagheri R. Size tuning of Ag-decorated TiO₂ nanotube arrays for improved bactericidal capacity of orthopedic implants. *J Biomed Mater Res A.* 2014;102(8):2625–2635.
- [89] Pan X, Wang Y, Chen Z, et al. Investigation of antibacterial activity and related mechanism of a series of nano-Mg (OH)₂. *ACS Appl Mater Interfaces.* 2013;5(3):1137–1142.
- [90] Gurunathan S, Han JW, Kwon DN, Kim JH. Enhanced antibacterial and anti-biofilm activities of silver nanoparticles against gram-negative and gram-positive bacteria. *Nanoscale Res Lett.* 2014;9(1):373.
- [91] Deplanche K, Caldelari I, Mikheenko IP, Sargent F, Macaskie LE. Involvement of hydrogenases in the formation of highly catalytic Pd (0) nanoparticles by bioreduction of Pd(II) using *Escherichia coli* mutant strains. *Microbiology.* 2010;156(9):2630–2640.
- [92] Cha SH, Hong J, McGuffie M, Yeom B, VanEpps JS, Kotov NA. Shape-dependent biomimetic inhibition of enzyme by nanoparticles and their antibacterial activity. *ACS Nano.* 2015 ;9(9):9097–9105.

- [93] Prasannakumar JB, Vidya YS, Anantharaju KS, et al. Bio-mediated route for the synthesis of shape tunable $\text{Y}_2\text{O}_3:\text{Tb}^{3+}$ nanoparticles: photoluminescence and antibacterial properties. *Spectrochim Acta A Mol Biomol Spectrosc.* 2015; 151:131–140.
- [94] Hong X, Wen J, Xiong X, Hu Y. Shape effect on the antibacterial activity of silver nanoparticles synthesized via a microwave-assisted method. *Environ Sci Pollut Res Int.* 2016 ;23(5):4489–4497.
- [95] Actis L, Srinivasan A, Lopez-Ribot JL, Ramasubramanian AK, Ong JL. Effect of silver nanoparticle geometry on methicillin susceptible and resistant *Staphylococcus aureus*, and osteoblast viability. *J Mater Sci Mater Med.* 2015;26(7):215.
- [96] Talebian N, Sadeghi Haddad Zavvare H. Enhanced bactericidal action of SnO_2 nanostructures having different morphologies under visible light: influence of surfactant. *J Photochem Photobiol B.* 2014; 130:132–139.
- [97] Gao M, Sun L, Wang Z, Zhao Y. Controlled synthesis of Ag nanoparticles with different morphologies and their antibacterial properties. *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl.* 2013;33(1):397–404.
- [98] Ben-Sasson M, Zodrow KR, Gengeng Q, Kang Y, Giannelis EP, Elimelech M. Surface functionalization of thin-film composite membranes with copper nanoparticles for antimicrobial surface properties. *Environ Sci Technol.* 2014 ;48(1):384–393.
- [99] Rajakumar G, Rahuman AA, Roopan SM, et al. Fungus-mediated biosynthesis and characterization of TiO_2 nanoparticles and their activity against pathogenic bacteria. *Spectrochim Acta A Mol Biomol Spectrosc.* 2012; 91:23–29.
- [100] Sukhorukova IV, Sheveyko AN, Kiryukhantsev-Korneev PV, et al. Toward bioactive yet antibacterial surfaces. *Colloid Surface B.* 2015; 135:158–165.
- [101] Maeda H. Tumor-selective delivery of macromolecular drugs via the EPR effect: background and future prospects. *Bioconjug Chem.* 2010;21(5):797–802.
- [102] Fang B, Jiang Y, Nüsslein K, Rotello VM, Santore MM. Antimicrobial surfaces containing cationic nanoparticles: how immobilized, clustered, and protruding cationic charge presentation affects killing activity and kinetics. *Colloid Surface B.* 2015 ;125:255–263.

- [103] Arakha M, Pal S, Samantarrai D, et al. Antimicrobial activity of iron oxide nanoparticle upon modulation of nanoparticle-bacteria interface. *Sci Rep.* 2015; 5:14813.
- [104] Saliani M, Jalal R, Kafshdare Goharshadi E. Effects of pH and temperature on antibacterial activity of zinc oxide nanofluid against *Escherichia coli* O157:H7 and *Staphylococcus aureus*. *Jundishapur J Microbiol.* 2015;8(2): e17115.
- [105] Radovic-Moreno AF, Lu TK, Puscasu VA, Yoon CJ, Langer R, Farokhzad OC. Surface charge-switching polymeric nanoparticles for bacterial cell wall-targeted delivery of antibiotics. *ACS Nano.* 2012;6(5):4279–4287.
- [106] J. A. Lemire, J. J. Harrison, R. J. Turner, Antimicrobial activity of metals: mechanisms, molecular targets and applications, *Nat. Rev. Microbiol.* 2013, 11,371.
- [107] J. W. Alexander, History of the medical use of silver. *Surg. Infect.* 2009, 10, 289.
- [108] G. Borkow, J. Gabbay, Copper, An Ancient Remedy Returning to Fight Microbial, Fungal and Viral Infections, *Curr. Chem. Biol.* 2009, 3, 272
- [109] Galib, M.Barve, M. Mashru, C. Jagtap, B. J. Patgiri, P. K. Prajapati, J. Ayurveda, Therapeutic potentials of metals in ancient India: A review through Charaka Samhita. *Integr. Med.* 2011, 2, 55.
- [110] J. Middaugh, R. Hamel, G. Jean-Baptiste, R. Beriault, D. Chenier, Aluminum triggers decreased aconitase activity via Fe-S cluster disruption and the overexpression of isocitrate dehydrogenase and isocitrate lyase: a metabolic network mediating cellular survival, *J Biol Chem.* 2005 Feb 4;280(5):3159-65
- [111] J. J. Harrison, H. Ceri, C. A. Stremick, R. J. Turner, Biofilm susceptibility to metal toxicity, *Environ. Microbiol.* 2004, 6, 1220
- [112] Y. Kaneko, M. Thoendel, O. Olakanmi, B. E. Britigan, P. K. Singh, the transition metal gallium disrupts *Pseudomonas aeruginosa* iron metabolism and has antimicrobial and antibiofilm activity. *J. Clin. Invest.* 2007, 117, 877.
- [113] A. Mikolay, S. Huggett, L. Tikana, G. Grass, J. Braun, D. H. Nies, Survival of bacteria on metallic copper surfaces in a hospital trial. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 2010, 87,1875

- [114] J. B. Wright, K. Lam, R. E. Burrell, Am. Wound management in an era of increasing bacterial antibiotic resistance: a role for topical silver treatment. *J. Infect. Control* 1998, 26, 572
- [115] Guozhong C, Nanostructures and Nanomaterials: Synthesis, Properties and Applications, ,2004
- [116] R. Singh And R. K. Singh, Review on Nano Materials of Carbon, *IOSR Journal of Applied Physics (IOSR-JAP)* e-ISSN: 2278-4861. Volume 9, Issue 6 Ver.III (Nov. - Dec. 2017), PP 42-57.
- [117] K. Tapan, Application of zinc oxide varistors, *Journal of the American ceramics society*, 2005.
- [118] K. Westermark, H. Rensmo, A.C. Lees, J.G. Vos, H. Stiegbahn, *J. Phys. Chem. B*,2002, 106, 10108.
- [119] J. Chang and E. R. Waclawik, Colloidal semiconductor nanocrystals: controlled synthesis and surface chemistry in organic media, *RSC Adv.*, 2014, 4, 23505-23527
- [120] Desgreniers, S. High-density phases of ZnO: structural and compressive parameters. *Physical Review B: Condensed Matter*, 58, 14102 (1998).
- [121] Fan Z, Lu JG. Zinc oxide nanostructures: synthesis and properties. *J. Nanosci. Nanotechnol.* 2005;5(10):1561–1573.
- [122] Y.G. Gertrude Neumark, I. Kuskovsky, in *Springer Handbook of Electronic and Photonic Materials: Doping Aspects of Zn-Based Wide-Band-Gap Semiconductors*, ed. by P.C. Safa Kasap (Springer, 2007), pp. 843–854.
- [123] Colon G, Ward BC, Webster TJ. Increased osteoblast and decreased Staphylococcus epidermidis functions on nanophase ZnO and TiO₂. *J. Biomed. Mater. Res.* 2006;78(3):595–604.
- [124] L. Palanikumar, S. N. Ramasamy, C. Balachandran, Size dependent antimicrobial response of zinc oxide nanoparticles. *IET Nanobiotechnology.* 2014; 8 (2) :111-117
- [125] Ansari M. A., Khan H. M., Khan A. A., Sultan A., Azam A. Characterization of clinical strains of MSSA, MRSA and MRSE isolated from skin and soft tissue infections and the

antibacterial activity of ZnO nanoparticles. *World Journal of Microbiology & Biotechnology*. 2012;28(4):1605–1613

[126] Malka E., Perelshtein I., Lipovsky A., et al. Eradication of multi-drug resistant bacteria by a novel Zn-doped CuO nanocomposite. *Small*. 2013;9(23):4069–4076.

[127] Huh A. J., Kwon Y. J. ‘Nanoantibiotics’: a new paradigm for treating infectious diseases using nanomaterials in the antibiotics resistant era. *Journal of Controlled Release*. 2011;156(2):128–145.

[128] Huang Z., Zheng X., Yan D., et al. Toxicological effect of ZnO nanoparticles based on bacteria. *Langmuir*. 2008;24(8):4140–4144. [129] ZnO

[130] hakraborti S., Mandal A. K., Sarwar S., Singh P., Chakraborty R., Chakrabarti P. Bactericidal effect of polyethyleneimine capped ZnO nanoparticles on multiple antibiotic resistant bacteria harboring genes of high-pathogenicity island. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*. 2014;121C:44–53. [131] ZnO

[132] Reddy L. S., Nisha M. M., Joice M., Shilpa P. N. Antimicrobial activity of zinc oxide (ZnO) nanoparticle against *Klebsiella pneumoniae*. *Pharmaceutical Biology*. 2014;52(11):1388–1397.

[133] Jin T., Sun D., Su J. Y., Zhang H., Sue H.-J. Antimicrobial efficacy of zinc oxide quantum dots against *Listeria monocytogenes*, *Salmonella Enteritidis*, and *Escherichia coli* O157:H7. *Journal of Food Science*. 2009;74(1):M46–M52.

[134] Kasraei S., Sami L., Hendi S., AliKhani M.-Y., Rezaei-Soufi L., Khamverdi Z. Antibacterial properties of composite resins incorporating silver and zinc oxide nanoparticles on *Streptococcus mutans* and *Lactobacillus*. *Restorative Dentistry & Endodontics*. 2014;39(2):109–114.

[135] Liu Y., He L., Mustapha A., Li H., Hu Z. Q., Lin M. Antibacterial activities of zinc oxide nanoparticles against *Escherichia coli* O157:H7. *Journal of Applied Microbiology*. 2009;107(4):1193–1201.

[136] Reddy K. M., Feris K., Bell J., Wingett D. G., Hanley C., Punnoose A. Selective toxicity of zinc oxide nanoparticles to prokaryotic and eukaryotic systems. *Applied Physics Letters*. 2007;90(21).

- [137] Dastjerdi R., Montazer M. A review on the application of inorganic nano-structured materials in the modification of textiles: focus on anti-microbial properties. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*. 2010;79(1):5–18.
- [138] Applerot G., Lellouche J., Perkas N., Nitzan Y., Gedanken A., Banin E. ZnO nanoparticle-coated surfaces inhibit bacterial biofilm formation and increase antibiotic susceptibility. *RSC Advances*. 2012;2(6):2314–2321.
- [139] Blecher K., Nasir A., Friedman A. The growing role of nanotechnology in combating infectious disease. *Virulence*. 2011 ;2(5):395–401.
- [140] Pati R., Mehta R. K., Mohanty S., et al. Topical application of zinc oxide nanoparticles reduces bacterial skin infection in mice and exhibits antibacterial activity by inducing oxidative stress response and cell membrane disintegration in macrophages. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine*. 2014 ;10(6):1195–1208.
- [141] Pan X., Redding J. E., Wiley P. A., Wen L., McConnell J. S., Zhang B. Mutagenicity evaluation of metal oxide nanoparticles by the bacterial reverse mutation assay. *Chemosphere*. 2010 ;79(1):113–116.
- [142] E.E. Hafez, H.S. Hassan, M. Elkady, E. Salama, Assessment Of antibacterial activity for synthesized zinc oxide nanorods against plant pathogenic strains. *Int. J. Sci. Tech. Res. (IJSTR)*, 3(9), 318–324 (2014)
- [143] C. Oruc, A. Altindal, Structural and dielectric properties of CuO nanoparticles, *Ceramics international*, 43, issue 1; 10708-10714. 2017.
- [144] G. Döring, C. Sternemann, A. Kaprolat, A. Mattila, K. Hämäläinen, and W. Schülke Shake-up valence excitations in CuO by resonant inelastic x-ray scattering, *Physical review B* 70, 085115 (2004).
- [145] Zhang Q., Zhang K., Xu D., et al. CuO nanostructures: synthesis, characterization, growth mechanisms, fundamental properties, and applications. *Progress in Materials Science*. 2014;60(1):208–237
- [146] Li Y., Liang J., Tao Z., Chen J. CuO particles and plates: synthesis and gas-sensor application. *Materials Research Bulletin*. 2008;43(8-9):2380–2385

- [147] Wang X., Xu X. Thermal conductivity of nanoparticle-fluid mixture. *Journal of Thermophysics and Heat Transfer*. 1999;13(4):474–480
- [148] Ren G., Hu D., Cheng E. W. C., Vargas-Reus M. A., Reip P., Allaker R. P. Characterisation of copper oxide nanoparticles for antimicrobial applications. *International Journal of Antimicrobial Agents*. 2009;33(6):587–590.
- [149] Esteban-Tejeda L., Malpartida F., Esteban-Cubillo A., Pecharromn C., Moya J. S. Antibacterial and antifungal activity of a soda-lime glass containing copper nanoparticles. *Nanotechnology*. 2009;20(50)
- [150] Hans M., Erbe A., Mathews S., Chen Y., Solioz M., Mücklich F. Role of copper oxides in contact killing of bacteria. *Langmuir*. 2013;29(52):16160–16166.
- [151] CuO Pelgrift R. Y., Friedman A. J. Nanotechnology as a therapeutic tool to combat microbial resistance. *Advanced Drug Delivery Reviews*. 2013;65(13-14):1803–1815.
- [152] Pey P., Packiyaraj M. S., Nigam H., Agarwal G. S., Singh B., Patra M. K. Antimicrobial properties of CuO nanorods and multi-armed nanoparticles against *B. anthracis* vegetative cells and endospores. *Beilstein Journal of Nanotechnology*. 2014; 5:789–800
- [153] Ruparelia J. P., Chatterjee A. K., Duttagupta S. P., Mukherji S. Strain specificity in antimicrobial activity of silver and copper nanoparticles. *Acta Biomaterialia*. 2008;4(3):707–716.
- [154] Baek Y.-W., An Y.-J. Microbial toxicity of metal oxide nanoparticles (CuO, NiO, ZnO, and Sb₂O₃) to *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis*, and *Streptococcus aureus*. *The Science of the Total Environment*. 2011;409(8):1603–1608.
- [155] Mahapatra O, Bhagat M, Gopalakrishnan C, Arunachalam KD. Ultrafine dispersed CuO nanoparticles and their antibacterial activity. *J ExpNanosci*. 2008;3: 185-193
- [156] Agarwala M., Choudhury B., Yadav R. N. S. Comparative study of antibiofilm activity of copper oxide and iron oxide nanoparticles against multidrug resistant biofilm forming uropathogens. *Indian Journal of Microbiology*. 2014;54(3):365–368.
- [157] Huh A. J., Kwon Y. J. ‘Nanoantibiotics’: a new paradigm for treating infectious diseases using nanomaterials in the antibiotics resistant era. *Journal of Controlled Release*. 2011;156(2):128–145.

- [158] Titanium IV oxide titania titanium dioxide structure: <http://www.fangyuan-tio2.com/titanium-iv-oxide-titania-titanium-dioxide-structure.html>
- [159] E. M. Kaidashev, M. Lorenz, H. Von Wenckstern, A. Rahm, H. C. Semmelhack, "High Electron Mobility of Epitaxial TiO₂ Thin Films on c- Plane Sapphire Grown by Multistep Pulsed – Laser Deposition", *Appl. Phys. Lett.* 82 (2003): P. 3901.
- [160] Linsebigler, A. L., Lu, G., & Yates, J. T." Photocatalysis on TiO₂ Surfaces : Principles, Mechanisms, and Selected Results" *Chemical Reviews*, 95(3) (1995): 735–758.
- [161] Haider AJ, AL–Anbari RH, Kadhim GR, Salame CT. Exploring potential Environmental applications of TiO₂ Nanoparticles. *Energy Procedia.* (2017) Jul 1; 119:332-45.
- [162] T. Seiyama, A. Kato, K. Fujisishi and M. Nagatoni, "A new detector for gaseous components using semiconductive thin films", *Analytical Chemistry*, 34, (1992): p. 1052.
- [163] Mills, A., & Le Hunte, S."An overview of semiconductor photocatalysis" *J. of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry*(1997).
- [164] Sprong C, Bakker M, Niekerk M, Vennemann M. Exposure Assessment of the Food Additive Titanium Dioxide (E 171) based on Use Levels Provided by the Industry [Internet]. (2015)
- [165] Allahverdiyev A. M., Abamor E. S., Bagirova M., Rafailovich M. Antimicrobial effects of TiO₂ and Ag₂O nanoparticles against drug-resistant bacteria and leishmania parasites. *Future Microbiology.* 2011;6(8):933–940.
- [166] Zan L., Fa W., Peng T., Gong Z.-K. Photocatalysis effect of nanometer TiO₂ and TiO₂-coated ceramic plate on Hepatitis B virus. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology.* 2007;86(2):165–169.
- [167] Hamal D. B., Haggstrom J. A., Marchin G. L., Ikenberry M. A., Hohn K., Klabunde K. J. A multifunctional biocide/sporicide and photocatalyst based on titanium dioxide (TiO₂) codoped with silver, carbon, and sulfur. *Langmuir.* 2010;26(4):2805–2810.
- [168] Ungureanu C., Popescu S., Purcel G., et al. Improved antibacterial behavior of titanium surface with torularhodin-polypyrrole film. *Materials Science & Engineering C: Materials for Biological Applications.* 2014;42:726–733.

- [169] D. Sun, M. Wong, L. Sun, Y. Li, N. Miyatake, H.J. Sue, Purification and stabilization of colloidal ZnO nanoparticles in methanol, *J. Sol-Gel Sci. Technol.*, 43 (2007), pp. 237-243.
- [170] A.C. Pierre Introduction to Sol-Gel Processing, Kluwer Academic Publishers, Boston/Dordrecht/London (1998) 91-167.
- [171] M. Aegerter, M. Menning, Sol-Gel Technologies for Glass Producers and Users. New York: Springer Science, 2004
- [172] J. Livage, Sol-gel processes. Current opinion in Solid State and Materials Science. 1997; 2: 132-138
- [173] M. Guglielmi, G. Carturan. Precursors for sol-gel preparations, *Journal of Non-Crystalline Solids*, 1998; 100: 16-30
- [174] AC. Pierre. Introduction to Sol-Gel Processing. New York: Springer; 2002
- [175] D. Levy, M. Zayat. The Sol-Gel Handbook: Synthesis, Characterization and Applications. Germany: Wiley- VCH Verlag GmbH & Co; 2015.
- [176] M.Guglielmi, G. Kieckelbick, A. Martucci, Sol-Gel Nanocomposites: Advances in Sol-Gel Derived Materials and Technologies. New York: Springer- Verlag; 2014.
- [177] Z. Hu, G. Oskam, P.C. Searson, Influence of solvent on the growth of ZnO nanoparticles. *J.Colloid Interface Sci.*, 263 (2003), pp. 454-460
- [178] M.Z. Hu, E.A. Payzant, C.H. Byers, Sol-Gel and Ultrafine Particle Formation via Dielectric Tuning of Inorganic Salt-Alcohol-Water Solutions, *J.Colloid Interface Sci.*, 222 (2000), pp. 20-36
- [179] Tokumoto MS, Briois V, Santilli CV, Pulcinelli SH, Preparation of ZnO Nanoparticles: Structural Study of the Molecular Precursor (2003) *J SolGel Sci Technol* 26:547
- [180] S. Thiagarajan, A. Sanmugam and D. Vikraman. Facile Methodology of Sol-Gel Synthesis for Metal Oxide Nanostructures, Recent Applications in Sol-Gel Synthesis, Usha Chandra, IntechOpen (2017)
- [181] Lopez TM, Avnir D, Aegerter MA. Emerging Fields in Sol-Gel Science and Technology. New York: Springer US; (2003).
- [182] Attia Y. Sol-Gel Processing and Applications. New York: Springer US; (1994)

- [183] Levy D, Zayat M. The Sol-Gel Handbook: Synthesis, Characterization and Applications. Germany: Wiley-VCH Verlag GmbH & Co; 2015.
- [184] Reisfeld R, Jorgensen CK. Chemistry, Spectroscopy and Applications of Sol-Gel Glasses. Berlin: Springer-Verlag; (1992)
- [185] Qu Y, Huang X, Li Y, Lin G, Guo B, Song D, Cheng Q. Chemical bath deposition produced ZnO nanorod arrays as an antireflective layer in the polycrystalline Si solar cells. Journal of Alloys and Compounds. 2017 ;698 :719–724
- [186] C. Mcdermott-Murphy, Know your enemy—lab builds an arsenal to fight antibiotic-resistant bacteria, Harvard University (2018)
- [187] Centers for Disease Control and Prevention. *E. coli (Escherichia coli)*
- [188] Nataro JP, Kaper JB. Diarrheagenic Escherichia coli. Clin Microbiol Rev. 1998; 11(1): 142–201. Erratum in: Clin Microbiol Rev. 1998; 11(2): 403.
- [189] Toma C, Lu Y, Higa N, Nakasone N, Chinen I, Baschkier A, et al. Multiplex PCR assay for identification of human diarrheagenic Escherichia coli. J Clin Microbiol. 2003; 41(6): 2669–2671.
- [190] S. Karve, *E. coli*: Why so famous? Livemint.com (2017)
- [191] Demetrio LV, Phyllis Anne P, Esperanza C, Windell LR (2016) Molecular and phenotypic characterization of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolates from a tertiary hospital in the Philippines. Tropical Medicine and Health 44:3
- [192] Van Cleef BA, Monnet DL, Voss A (2011) Livestock-associated methicilline resistant *Staphylococcus aureus* in humans, Europe. Emerg Infect Dis 17: 502
- [193] Site internet Wikipedia : https://en.wikipedia.org/wiki/Staphylococcus_aureus
- [194] Ramos JL. (ed.): *Pseudomonas*. Heidelberg: Springer;2004; 1–7
- [195] Gonçalves-de-Albuquerque CF, Silva AR, Burth P, et al.: Possible mechanisms of *Pseudomonas aeruginosa*-associated lung disease. Int J Med Microbiol. 2016;306(1):20–8
- [196] Talwalkar JS, Murray TS: The Approach to *Pseudomonas aeruginosa* in Cystic Fibrosis. Clin Chest Med. 2016;37(1):69–81.

- [197] Sonnleitner E, Haas D: Small RNAs as regulators of primary and secondary metabolism in *Pseudomonas* species. *Appl Microbiol Biotechnol.* 2011;91(1):63–79
- [198] J. ARCHER, Centers for disease control, University of Manitoba
- [199] S.Vylkova, A.J.Carman, H.A. Danhof, J. R. Collette, H. Zhou and M. C. Lorenz, The fungal pathogen *Candida albicans* Autoinduces Hyphal Morphogenesis by Raising extracellular pH, *The American society for microbiology*, volume 2 (2011)
- [200] Davis D, Edwards JE Jr., Mitchell AP, Ibrahim AS. 2000. *Candida albicans* RIM101 pH response pathway is required for host-pathogen interactions. *Infect. Immun.* 68 :5953–5959.
- [201] Site Internet :<http://www.microbeworld.org/component/jlibrary/?view=article&id=7611>
- [202] Norme NF 14651, Agence Française de Normalisation, Décembre 2007
- [203] NCCLS. 2003. Performance standards for antimicrobial disk susceptibility tests. Approved standard M2-A8. NCCLS, Wayne, Pa.
- [204] Bauer, A. W., D. M. Perry, and W. M. M. Kirby. Single disc antibiotic sensitivity testing of Staphylococci. *A.M.A. Arch. Intern. Med.* 104 :208–216 (1959).
- [205] Bauer, A. W., W. M. M. Kirby, J. C. Sherris, and M. Turck. Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disk method. *Am. J. Clin. Pathol.* 36 :493-496 (1996).
- [206] Clinical Laboratory Standards Institute. Performance standard for antimicrobial disk susceptibility tests; Approved standard— 9th ed. CLSI document M2-A9. 26 :1(2006). Clinical Laboratory Standards Institute, Wayne, PA
- [207] Ugarova, N. N., Maloshenok, L. G., Moroz, N. A., and Lomakina, G. Yu. Reagent for determination of adenosine 5'-triphosphate, RF Patent 2268943, (2004).
- [208] Ugarova, N. N., Brovko, L. Yu., Trdatian, I. Yu., and Rainina, E. I. Bioluminescent methods of analysis in microbiology, *Appl. Biochem. Microbiol. (Moscow)*, 23, (1987) 11–20.
- [209] Narsaiah, K., Jha, S. N., Jaiswal, P., Singh, A. K., Gupta, M., and Bhardwaj, R. Estimation of total bacteria on mango surface by using ATP bioluminescence, *Sci. Hortic. (Amsterdam)*, 146, 159–163 (2012).

- [210] <https://fr.slideserve.com/feleti/methodes-thermiques>
- [211] K. Akhtar, S.A. Khan, S. Bahadar Khan, and A. M. Asiri, Scanning Electron Microscopy: Principle and Applications in Nanomaterials Characterization, S. K. Sharma (ed.), Handbook of Materials Characterization (2018)
- [212] K. Ouzaout, Bi-fonctionnal materials for catalytic and piezoelectric based on cerium, lanthanum oxide and Langasite, Université Ibn Zohr d'Agadir, 2007
- [213] <https://www.podcastscience.fm/dossiers/2014/01/23/lhistoiredesmicroscopes/attachment/image14/>
- [214] Site internet : <https://nte.mines-albi.fr/SciMat/co/SM2uc7-2.html>
- [215] James, R.W, The optical principles of the diffraction of X-rays, London : G.Bell and Sons, 1954. - 642 p
- [216] I. Choupra, Généralités sur la spectroscopie Raman
- [217] C. Bon, J. Piard, S. Zimmer, C. Yannis, E. Cazayus- Claveric, Synthèse et détermination de la taille de nanoprismes d'argent, Union des professeurs de physique et de chimie, vol 110, (2016).
- [218] Rivallin, M., Evolution de sols nanométriques d'oxydes de titane durant l'induction d'une précipitation de type sol-gel en réacteur à mélangeur rapide : Mesures Granulométriques in-situ et modélisation. 2003, Ecole des mines de Paris.
- [219] R. Azouani, A. Michau, K. Hassouni, K. Chhor, J.-L. Vignes, A. Kanaev, Elaboration of pure and doped TiO₂ nanoparticles in sol-gel reactor with turbulent micromixing : Application to nanocoatings and photocatalysis, Chemical Engineering Research and Design, 88 (2010), pp 1123-1130.
- [220] R. Azouani, A. Soloviev, M. Benmami, K. Chhor, J.-F. Bocquet, A. Kanaev , Stability and growth of titanium-oxo-alcoxy TixOy(OiPr)z clusters, J Phys Chem C, 111 (2007), pp. 16243-16248.
- [221] Yuyu Bu, Zhuoyuan Chen, Weibing Li, and Jianqiang Yu . High-Efficiency Photoelectrochemical Properties by a Highly Crystalline CdS-Sensitized ZnO Nanorod Array. ACS Applied Materials & Interfaces 2013, 5 (11) , 5097-5104.

- [222] E. Hosono, S. Fujihara, T. Kimura, H. Imai, Non-Basic Solution Routes to Prepare ZnO Nanoparticles, *J. Sol–Gel Sci. Technol.*, 29 (2004), pp. 71-79
- [223] N. Newville, B. Ravel, D. Haskel, J.J. Rehr, E.A. Stern, and Y. Yacoby, Analysis of multiple-scattering XAFS data using theoretical standards, *Physica B* 208/209, 154 (1995).
- [224] Gorbovyi.P, Elaboration des matériaux photosensibles organiques-inorganiques pour des applications en photoniques, (2012), Université Paris 13.
- [225] Azouani. R, Elaboration de nouveaux nanomatériaux photocatalytiques actifs sous rayonnement visible, Université de Paris 13, 2009.
- [226] E.V. Johnson, P. Prodhomme, C. Boniface, K. Huet, T. Emeraud, P. Roca i Cabarrocas, Excimer laser annealing and chemical texturing of ZnO : Al sputtered at room temperature for photovoltaic applications. *Solar Energy Materials and Solar CELLS* 95 (211) 2823-2830.
- [227] G.M. Sheldrick, SHELX 86, Program for the Solution of Crystal Structures, University of Göttingen, Germany, 1986.
- [228] M.P.S. Almeida, L.M. Nunes, R.R. Gonçalves, S.J.L. Ribeiro, L.J.Q. Maia. Structural properties and visible emission of Eu³⁺-activated SiO₂–ZnO–TiO₂ powders prepared by a soft chemical process. *Optical Materials* 2016, 62, 438-446
- [229] T. Ishioka, Y. Shibata, M. Takahashi, I. Kanekane, Y. Kitagawa, K.T. Nakamura, Vibrational spectra and structures of zinc carboxylates I. zinc acetate dihydrate. *Spectrochimica Acta Part A*, 54 (1998) 1827-1836.
- [230] M.V. Korolevich, V.V. Sivchik, N.A. Matveeva, R.G. Zhibankov, V.A. Lastochkina. M.L. Frenkel, A.I. Ladut'ko, A.V. Pavlov and E.P. Petryaev, A study of the vibrational spectrum of monoethanolamine. *Journal of Raman Spectroscopy*, 46 (1987) 400.
- [231] L.Znaidi, G.J.A.A. Soler Illia, S. Benyahia, C. Sanchez, A.V. kanaev. Oriented ZnO thin films synthesis by sol–gel process for laser application, *Thin films*, 428 (2003) 256-257.
- [232] S. Kurtaran, I. Kavlak, G.S. Kurkcuoğlu, Vibrational Frequencies and Structural Determination of Triethanolamine and Diethanolamine by Density Functional Theory Calculations.
- [233] J.F. Xu, W. Ji, Z. X. Shen et al, Raman spectra of CuO nanocrystals, “Raman spectroscopy, (1999); 30: 413-415.

- [234] B. Minceva-Sukarova, M. Najdoski, I. Grozdanov, C.J. Chunnillall, Raman spectra of thin solid films of some metal sulfides, *J. Mol. Struct.*, 267 (1997), p. 410.
- [235] G. Gouadec and P. Colombari, "Raman Spectroscopy of nano-materials: how spectra relate to disorder, particle size and mechanical properties," *Progress in Crystal Growth and Characterization of Materials*, vol.53, no.1, pp.1–56, (2007).
- [236] A.F. Wells, *Structural Inorganic Chemistry*, Clarendon press, Oxford, 3rd edn., (1962).
- [237] E.F. de la Cruz, Y.D. Zheng, E. Torres, W. Li, W.H. Song, K. Burugapalli, *Int J Electrochem Sc* 7, 3577-3590 (2012).
- [238] Y.Cai, M.Stromme, A.Melhus, H.Engqvist, K.Welch, Photocatalytic inactivation of biofilms on bioactive dental adhesives, *J.Biomed Mater Res B Appl Biomater.* 2013; 102 (1):62-7.
- [239] J.Kim, H.Cho, S.Ryu, M.Choi, Effects of metal ions on the activity of protein tyrosine phosphatase VHR: highly potent and reversible oxidative inactivation by Cu^{2+} ion. *Arch. Biochem. Biophys.* 2000; 382 :72-80.
- [240] S.J. Stohs, D. Bagchi, Oxidative mechanisms in the toxicity of metal ions. *Free Radic. Biol. Med.* 1995; 18: 321-336.
- [241] J. Crank, *The mathematics of diffusion*, 2nd Ed., Clarendon press, Oxford, 1975
- [242] T. I. Quickenden, X. Jiang, The diffusion coefficient of copper sulphate in aqueous solution, *Electrochimica Acta* 29 (1984) 693-700.
- [243] S. F. Patil, A. V. Borhade, M. Nath, Diffusivity of some zinc and cobalt salts in water, *J. Chem. Eng. Data* 38 (1993)574-576.
- [244] R. Azouani, A. Soloviev, M. Benmami, K. Chhor, J.-F. Bocquet, A. Kanaev, Stability and Growth of Titanium-oxo-alkoxy $\text{Ti}_x\text{O}_y(\text{O}i\text{Pr})_z$ Clusters *J. Phys. Chem. C* 111 (2007) 16243 -16248
- [245] Corpe WA.,. Detachment of marine periphytic bacteria from surfaces of glass slides. *Dev. Inol. Microbio.*, 15: 251-287 (1973).
- [246] Bryant R.D., Costerton J.W., Aishley E.J. The role of *Thiobacillus albertis* glycocalyx in the adhesion of cells to elemental sulfur *Can. J. Microbio.*, 30: 81-90 (1984).

- [247] Ellery W.N., Schleyer M.H., Comparison of homogenization and ultrasonication as techniques in extracting attached sedimentary bacteria. *Mar. Ecology. Prog. Ser.*, 15: 247-250 (1984).
- [248] B. Díaz, C. Sánchez-Espinel, M. Arruebo et al., “Assessing methods for blood cell cytotoxic responses to inorganic nanoparticles and nanoparticle aggregates,” *Small*, vol. 4, no. 11, pp. 2025–2034, 2008
- [249] S. Lanone, F. Rogerieux, J. Geys et al., “Comparative toxicity of 24 manufactured nanoparticles in human alveolar epithelial and macrophage cell lines,” *Particle and Fibre Toxicology*, vol. 6, article 14, 2009
- [250] C. M. Sayes, K. L. Reed, and D. B. Warheit, “Assessing toxicity of fine and nanoparticles: comparing in vitro measurements to in vivo pulmonary toxicity profiles,” *Toxicological Sciences*, vol. 97, no. 1, pp. 163–180, 2007.
- [251] H. Yang, C. Liu, D. Yang, H. Zhang, and Z. Xi, “Comparative study of cytotoxicity, oxidative stress and genotoxicity induced by four typical nanomaterials: the role of particle size, shape and composition,” *Journal of Applied Toxicology*, vol. 29, no. 1, pp. 69–78, 2009
- [252] Y. Li, L. Sun, M. Jin et al., “Size-dependent cytotoxicity of amorphous silica nanoparticles in human hepatoma HepG2 cells,” *Toxicology in Vitro*, vol. 25, no. 7, pp. 1343–1352, 2011
- [253] Neal AL. What can be inferred from bacterium-nanoparticle interactions about the potential consequences of environmental exposure to nanoparticles. *Ecotoxicology*. 2008;17(5):362–371
- [254] Lai HZ, Chen WY, Wu CY, Chen YC. Potent antibacterial nanoparticles for pathogenic bacteria. *ACS Appl Mater Interfaces*. 2015;7(3):2046–2054.

Annexes

Copyright Afnor 2016. Tous droits réservés.
Imprimé le 2016 janvier 27 11:18:52 par Mielcarek Christine
Raison Sociale : EBI - ECOLE DE BIOLOGIE INDUSTRIELLE

Mielcarek Christine

NF EN 14561 (2007-03)

5 - Méthode d'essai

5.1 - Principe

5.1.1 Une suspension d'essai de bactéries dans une solution de substances interférentes est étalée sur un porte-germe en verre. Après séchage, le porte-germe est immergé dans un échantillon de produit en l'état et/ou dilué dans de l'eau dure (pour les produits prêts à l'emploi : dans l'eau). Le porte-germe est maintenu à $(20 \pm 1) ^\circ\text{C}$ pendant $60 \text{ min} \pm 10 \text{ s}$ (conditions d'essai obligatoires). À l'issue de ce temps de contact, le porte-germe est transféré dans un neutralisant contenant des billes de verre. Les bactéries doivent être séparées de la surface du porte germe par agitation. Le nombre de bactéries survivantes dans chaque échantillon est déterminé et la réduction est calculée.

5.1.2 L'essai est effectué en utilisant comme souche d'essai *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus* et *Enterococcus hirae* (conditions d'essai obligatoires).

5.1.3 Les valeurs additionnelles facultatives, de temps de contact et de températures sont spécifiées. Il est possible d'utiliser des substances interférentes additionnelles.

5.2 - Matériaux et réactifs

5.2.1 - Souches d'essai

L'activité bactéricide doit être évaluée en utilisant comme organismes d'essai les souches suivantes ¹ :

• <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	ATCC 15442 ;
• <i>Staphylococcus aureus</i>	ATCC 6538 ;
• <i>Enterococcus hirae</i>	ATCC 10541.

NOTE : Voir l'Annexe A pour les numéros de souche correspondant dans d'autres collections de culture.

La température d'incubation requise pour ces souches d'essai est de $36 ^\circ\text{C} \pm 1 ^\circ\text{C}$ ou de $37 ^\circ\text{C} \pm 1 ^\circ\text{C}$ (voir 5.3.2.3). La même température (soit $36 ^\circ\text{C}$, soit $37 ^\circ\text{C}$) doit être utilisée pour toutes les incubations réalisées au cours de l'essai ainsi que pour le contrôle et la validation.

Si des souches d'essai additionnelles sont utilisées, elles doivent être incubées dans des conditions de croissance optimales (température, temps, atmosphère, milieu) consignées dans le rapport d'essai. Si les souches d'essai additionnelles sélectionnées ne correspondent pas aux souches spécifiées, leur aptitude à fournir les inoculums requis doit être vérifiée. Si les souches d'essai additionnelles ne sont pas répertoriées par un centre de référence, leurs caractéristiques d'identification doivent être indiquées. En outre, elles doivent être conservées par le laboratoire d'essai ou la souche nationale sous référence pendant cinq ans.

5.2.2 - Milieux de culture et réactifs

5.2.2.1 - Généralités

Tous les poids des substances chimiques donnés dans la présente Norme européenne font référence aux sels anhydres. Les formes hydratées peuvent être utilisées en variante, mais les poids requis doivent être ajustés pour tenir compte des différences conséquentes en matière de poids moléculaires.

Les réactifs doivent être de qualité analytique et/ou adaptés aux applications microbiologiques. Ils doivent être exempts de substances toxiques ou inhibitrices pour les souches d'essai.

NOTE 1 Pour améliorer la reproductibilité, il est recommandé d'utiliser, pour la préparation des milieux de culture, des produits déshydratés disponibles dans le commerce. Il convient de suivre rigoureusement les instructions du fabricant relatives à la préparation de ces produits.

NOTE 2 Il convient de fixer une date limite d'utilisation pour chaque milieu de culture et chaque réactif.

5.2.2.2 - Eau

Utiliser de l'eau fraîchement distillée sur verre et non de l'eau déminéralisée.

Stériliser à l'autoclave (voir 5.3.1).

NOTE 1 La stérilisation n'est pas nécessaire si l'eau utilisée – par exemple, pour la préparation des milieux de culture – est ensuite stérilisée.

NOTE 2 En l'absence d'eau distillée de qualité appropriée, il est possible d'utiliser de l'eau pour préparations injectables (voir référence bibliographique [1]).

NOTE 3 Voir 5.2.2.7 pour le mode opératoire permettant de préparer de l'eau dure.

5.2.2.3 - Gélose de dénombrement (Tryptone Soja Agar TSA)

• Tryptone, digestion pancréatique de caséine	15,0 g
• Peptone de soja, digestion papaïque de farine de soja	5,0 g
• Chlorure de sodium (NaCl)	5,0 g
• Gélose	15,0 g
• Eau (5.2.2.2)	à 1 000,0 ml

Stériliser à l'autoclave (voir 5.3.1). Après stérilisation, le pH du milieu doit être équivalent à $7,2 \pm 0,2$ lorsqu'il est mesuré à $(20 \pm 1) ^\circ\text{C}$ (voir 5.3.2.4).

NOTE : Dans certaines circonstances (problèmes de neutralisation – voir 5.5.1.2 et 5.5.1.3), il peut s'avérer nécessaire d'ajouter un neutralisant à la gélose TSA (voir Annexe B.3).

5.2.2.4 - Diluant

Solution de tryptone-chlorure de sodium :

• Tryptone, digestion pancréatique de caséine	1,0 g
• Peptone de soja, digestion papaïque de farine de soja	5,0 g
• Chlorure de sodium (NaCl)	8,5 g
• Eau (5.2.2.2)	à 1 000,0 ml

Stériliser à l'autoclave (voir 5.3.1). Après stérilisation, le pH du diluant doit être équivalent à $7,0 \pm 0,2$ lorsqu'il est mesuré à $(20 \pm 1) ^\circ\text{C}$.

5.2.2.5 - Neutralisant

Le neutralisant doit être validé pour le produit soumis à l'essai, conformément aux paragraphes 5.5.1 et 5.5.2. Le neutralisant doit être stérile.

NOTE : Le paragraphe B.2 donne des informations relatives aux neutralisants jugés appropriés pour certaines catégories de produits.

5.2.2.6 - Sang de mouton stérile défibriné

Le sang de mouton stérile défibriné peut être acheté dans le commerce ou préparé conformément à l'EN 14820.

5.2.2.7 - Eau dure pour la dilution des produits

Préparer :

- solution A : dissoudre 19,84 g de chlorure de magnésium anhydre (MgCl_2) ou une quantité équivalente de chlorure de magnésium hydraté et 46,24 g de chlorure de calcium anhydre (CaCl_2) ou une quantité équivalente de chlorure de calcium hydraté dans de l'eau (5.2.2.2) et diluer à 1 000 ml. Stériliser à l'autoclave (voir 5.3.1). Conserver la solution au réfrigérateur (5.3.2.8) pendant une durée maximale d'un mois ;
- solution B : dissoudre 35,02 g de bicarbonate de sodium (NaHCO_3) dans de l'eau (5.2.2.2) et diluer à 1 000 ml. Stériliser par filtration sur membrane (voir 5.3.2.7). Conserver la solution au réfrigérateur (5.3.2.8) pendant une durée maximale d'une semaine ;
- eau dure : pour préparer 1 l d'eau dure, verser 600 ml à 700 ml d'eau (5.2.2.2) dans une fiole jaugée de 1 000 ml (5.3.2.12) et ajouter 6,0 ml de solution A, puis 8,0 ml de solution B. Mélanger et diluer à 1 000 ml avec de l'eau (5.2.2.2). Le pH de l'eau dure doit être de $7,0 \pm 0,2$, lorsqu'il est mesuré à $(20 \pm 1) ^\circ\text{C}$. Si nécessaire, ajuster le pH en utilisant une solution d'environ 40 g/l (environ 1 mol/l) d'hydroxyde de sodium (NaOH) ou d'environ 36,5 g/l (environ 1 mol/l) d'acide chlorhydrique (HCl). L'eau dure doit être préparée extemporanément, dans des conditions aseptiques, et être utilisée dans les 12 h.

NOTE : Lors de la préparation des solutions d'essai du produit (voir 5.4.2), l'adjonction du produit dans cette eau dure modifie la dureté finale de l'eau dans chaque tube à essai. En tout état de cause, la dureté finale est inférieure à 300 mg/l de carbonate de calcium (CaCO₃) dans le tube à essai.

5.2.2.8 - Substances interférentes

5.2.2.8.1 - Généralités

La substance interférente doit être choisie en fonction des conditions d'utilisation stipulées pour le produit.

Elle doit être stérile et préparée à une concentration 10 fois supérieure à sa concentration finale lors de l'essai.

La composition ionique, (pH, dureté calcique et/ou dureté magnésique, par exemple) doit être définie ainsi que la composition chimique (substances minérales, protéines, glucides, lipides, détergents, par exemple).

NOTE : Le terme «substance interférente» est utilisé dans la suite du texte même lorsqu'il s'agit de plusieurs substances.

5.2.2.8.2 - Conditions de propreté (solution d'albumine bovine – faible concentration)

- Dissoudre 0,30 g d'albumine bovine (fraction de Cohn V pour applications microbiologiques) dans 100 ml de diluant (voir 5.2.2.4).
- Stériliser par filtration sur membrane (voir 5.3.2.7), conserver au réfrigérateur (5.3.2.8) et utiliser dans un délai de 1 mois maximum.
- La concentration finale d'albumine bovine lors de l'essai est de 0,3 g/l (voir 5.5).

5.2.2.8.3 - Conditions de saleté (mélange de solutions d'albumine bovine – concentration élevée avec érythrocytes de mouton (voir 5.2.2.6))

Dissoudre 3,00 g d'albumine bovine (fraction de Cohn V pour applications microbiologiques) dans 97 ml de diluant (5.2.2.4).

Stériliser par filtration sur membrane (voir 5.3.2.7).

Préparer au moins 8,0 ml de sang de mouton frais défibriné stérile (5.2.2.6). Centrifuger le sang de mouton à 800 gN pendant 10 min. Après élimination du surnageant, remettre les érythrocytes en suspension dans le diluant (5.2.2.4). Répéter ce mode opératoire au moins 3 fois jusqu'à obtention d'un surnageant incolore. Remettre en suspension 3 ml des érythrocytes de mouton dans les 97 ml de solution d'albumine bovine stérilisée (voir plus haut). Afin d'éviter toute contamination, il convient de diviser ce mélange en portions susceptibles d'être quotidiennement nécessaires et de les conserver au maximum 7 jours dans des récipients distincts placés au réfrigérateur à une température comprise entre 2 °C et 8 °C.

Lors de l'essai (voir 5.5), la concentration finale d'albumine bovine et d'érythrocytes de mouton doit être respectivement de 3 g/l et de 3 ml/l.

5.3 - Appareillage et verrerie

5.3.1 - Généralités

Pour stériliser toute la verrerie ainsi que les parties des appareils en contact avec les milieux de culture et les réactifs ou avec l'échantillon (sauf celles qui sont fournies stériles) appliquer l'une des méthodes suivantes :

- par chaleur humide, dans l'autoclave [voir 5.3.2.1 a)] ;
- par chaleur sèche, dans le four [voir 5.3.2.1 b)].

5.3.2 - Équipement habituel pour laboratoire de microbiologie ¹

et notamment :

5.3.2.1 Appareil de stérilisation

- Pour stérilisation par chaleur humide, un autoclave pouvant être maintenu à $(121 \pm 3)^\circ\text{C}$ pendant au moins 15 min ;
- pour stérilisation par chaleur sèche, un four pouvant être maintenu à une température de $(180 \pm 5)^\circ\text{C}$ pendant au moins 30 min, à $(170 \pm 5)^\circ\text{C}$ pendant au moins 1 h ou à $(160 \pm 5)^\circ\text{C}$ pendant au moins 2 h.

5.3.2.2 Bains d'eau, pouvant être maintenus à des températures de $(20 \pm 1)^\circ\text{C}$ et $(45 \pm 1)^\circ\text{C}$ (si la technique de dénombrement en profondeur est utilisée – voir 5.5.1.7) ou à d'autres températures d'essai $\pm 1^\circ\text{C}$ (voir 5.5.1).

5.3.2.3 Incubateur, pouvant être maintenu à des températures de $(36 \pm 1)^\circ\text{C}$ ou de $(37 \pm 1)^\circ\text{C}$.

La même température doit être utilisée pour toutes les incubations réalisées au cours de l'essai ainsi que pour le contrôle et la validation.

5.3.2.4 pH-mètre, ayant une précision à l'étalonnage d'au moins $\pm 0,1$ unité à $(20 \pm 1)^\circ\text{C}$

NOTE : Il convient d'utiliser une électrode de pénétration ou une électrode à embout plat pour mesurer le pH de la gélose (voir 5.2.2.3).

5.3.2.5 Chronomètre

5.3.2.6 Agitateurs

- Agitateur électromécanique, par exemple un agitateur Vortex® 1 ;
- agitateur mécanique.

5.3.2.7 Appareil de filtration sur membrane réalisé dans un matériau compatible avec les substances à filtrer, équipé d'un porte-filtre dont le volume utile doit être au minimum de 50 ml et adapté à une utilisation avec des filtres d'un diamètre de 47 mm à 50 mm et d'une porosité de 0,45 µm pour la stérilisation de l'eau dure (5.2.2.7) et de l'albumine bovine (5.2.2.8).

La source de vide utilisée doit assurer un débit de filtration régulier. Afin d'obtenir une répartition uniforme des micro-organismes sur la membrane et d'éviter une filtration trop longue, le dispositif doit être réglé de façon à filtrer 100 ml de liquide de rinçage en 20 s à 40 s.

5.3.2.8 Réfrigérateur pouvant être maintenu à une température comprise entre 2 °C et 8 °C.

5.3.2.9 Pipettes graduées d'une capacité nominale de 10 ml, 1 ml et 0,1 ml. Des pipettes automatiques étalonnées peuvent être utilisées.

5.3.2.10 Boîtes de Pétri de diamètre compris entre 90 mm et 100 mm.

5.3.2.11 Billes de verre (diamètre : 3 mm à 4 mm).

5.3.2.12 Fioles jaugées.

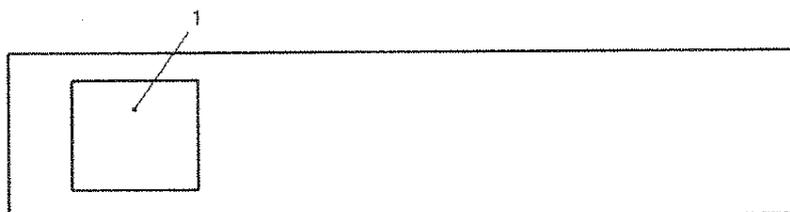
5.3.2.13 Billes de verre (diamètre : 0,25 mm à 0,5 mm).

5.3.2.14 Centrifugeuse (800 g_N).

5.3.2.15 Tubes cylindriques en plastique à capuchon vissé, capacité de 15 ml environ, diamètre d'environ 18 mm (pour le porte-germe).

5.3.2.16 Anse (en métal ou en plastique).

5.3.2.17 Porte-germe en verre dépoli sur une face de 15 mm ∞ 60 mm ∞ 1 mm. Pour la préparation, le porte-germe en verre est bouilli 10 min dans un détergent adapté, nettoyé au moins trois fois avec de l'eau (5.2.2.2) et, pour finir une fois avec de l'éthanol (fraction volumique de 70 %). Former un carré (10 mm de côté) à une extrémité du porte-germe séché sur sa face dépolie, à environ 2 mm des trois bords. Stériliser dans le four [5.3.1b)]. Après le processus de stérilisation, les marquages du «carré d'ensemencement» doivent être clairement visibles.



Légende

1 Carré d'ensemencement

Figure 1 Porte-germe en verre glacé avec les marquages

5.4 - Préparation des suspensions bactériennes d'essai et des solutions d'essai du produit

5.4.1 - Suspensions bactériennes d'essai (suspensions d'essai et de validation)

5.4.1.1 - Généralités

Pour chaque souche d'essai, il faut préparer deux suspensions différentes : la «suspension d'essai», destinée à réaliser l'essai, et la «suspension de validation» pour effectuer les contrôles et la validation de la méthode.

5.4.1.2 - Conservation et cultures mères des souches d'essai

Les souches d'essai et leurs cultures mères doivent être préparées et conservées conformément aux exigences de l'EN 12353.

5.4.1.3 - Culture de travail des souches d'essai

Afin de préparer la culture de travail des souches d'essai (5.2.1), repiquer à partir des cultures mères (5.4.1.2) en traçant des stries sur une gélose TSA (5.2.2.3) et incubé (5.3.2.3). Après 18 h à 24 h, faire un deuxième repiquage de la même manière à partir du premier et incubé pendant 18 h à 24 h. Un troisième repiquage peut être réalisé de la même façon à partir du deuxième. Le deuxième et/ou le troisième repiquage constitue(nt) la (les) culture(s) de travail.

S'il est impossible de préparer un deuxième repiquage un jour particulier, il est admis d'en utiliser un de 48 h pour repiquage ultérieur, à condition que le repiquage ait été maintenu dans l'incubateur (5.3.2.3) pendant la période de 48 h.

Ne jamais effectuer de quatrième repiquage.

5.4.1.4 - Suspension d'essai

- Prélever 10 ml de diluant (5.2.2.4) et les introduire dans une fiole de 100 ml avec 5 g de billes de verre (5.3.2.11). Prélever à l'anse la culture de travail (5.4.1.2) et transférer le prélèvement (5.3.2.16) dans le diluant (5.2.2.4). Il convient de mettre les cellules en suspension dans le diluant en immergeant et en frottant l'anse contre la paroi de la fiole pour en détacher les cellules. Agiter la fiole pendant 3 min à l'aide d'un agitateur mécanique [voir 5.3.2.6b)]. Séparer la suspension des billes de verre par aspiration et la transférer dans un autre tube.

- Ajuster le nombre de cellules de la suspension à une valeur comprise entre $1,5 \times 10^9$ UFC/ml¹ et $5,0 \times 10^9$ UFC/ml à l'aide du diluant, en estimant le nombre d'unités par n'importe quel moyen adapté. Conserver cette suspension dans le bain d'eau à 20 °C et l'utiliser dans les 2 h qui suivent. Ajuster la température conformément à 5.5.1.1a) et 5.5.1.4, immédiatement avant le début de l'essai.

NOTE : Il est vivement recommandé d'utiliser un spectrophotomètre (longueur d'onde d'environ 620 nm, cuve de 10 mm de trajet optique) pour ajuster le nombre de cellules. Il convient donc que chaque laboratoire établisse une courbe d'étalonnage pour chaque souche d'essai, sachant que des valeurs de densité optique comprises entre 0,150 et 0,460 sont généralement appropriées. Pour obtenir des résultats reproductibles de cette mesure, il peut s'avérer nécessaire de diluer la suspension d'essai, par exemple 1+9. Un colorimètre représente une autre solution appropriée.

- Pour le dénombrement, préparer des dilutions à 10^{-7} et 10^{-8} de la suspension d'essai en utilisant du diluant (5.2.2.4). Mélanger [5.3.2.6a)].
- Prélever un échantillon de 1,0 ml de chaque dilution en double et ensemercer les boîtes en utilisant la technique de dénombrement en profondeur ou la technique de dénombrement en surface.
 - Lorsque la technique de dénombrement en profondeur est utilisée, transférer environ la moitié de chaque échantillon de 1,0 ml dans des boîtes de Pétri séparée (c'est-à-dire en double = 4 boîtes) et ajouter 15 ml à 20 ml de gélose TSA fondue (5.2.2.3), refroidie à (45 ± 1) °C.
 - Lorsque la technique de dénombrement en surface est utilisée, étaler 1,0 ml de chaque échantillon – divisé en portions de taille approximativement égale – sur un nombre approprié de boîtes contenant de la gélose TSA (5.2.2.3) séchée en surface.

Pour l'incubation et le dénombrement, voir 5.4.1.6.

5.4.1.5 - Suspension de validation

- Pour préparer la suspension de validation, diluer la suspension d'essai (5.4.1.3) avec le diluant (5.2.2.4) pour obtenir entre $3,0 \times 10^2$ UFC/ml et $1,6 \times 10^3$ UFC/ml (environ un quart (1+3) de la dilution à 10^{-6}).
- Pour le dénombrement, préparer une dilution à 10^{-1} avec le diluant (5.2.2.4). Mélanger [5.3.2.6a)]. Prélever un échantillon de 1,0 ml en double et ensemercer les boîtes en utilisant la technique de dénombrement en profondeur ou la technique de dénombrement en surface [voir 5.4.1.3 d1) ou d2)].

Pour l'incubation et le dénombrement, voir 5.4.1.6.

5.4.1.6 - Incubation et dénombrement de la suspension d'essai et de la suspension de validation

- Incuber les boîtes (5.3.2.3) pendant 20 h à 24 h. Écarter toutes les boîtes sur lesquelles il est impossible de compter les colonies (pour quelque raison que ce soit). Compter les boîtes et déterminer le nombre d'unités formant colonies sur chaque boîte. Incuber les boîtes 20 h à 24 h supplémentaires. Ne pas recompter les colonies sur les boîtes qui ne présentent plus des colonies bien séparées. Recompter les colonies sur les autres boîtes. Si le nombre a augmenté, utiliser uniquement le nombre le plus élevé pour toute évaluation ultérieure.
- Pour chaque boîte, noter le nombre exact de colonies mais enregistrer > 330 pour tous les dénombrements supérieurs à 330 et déterminer les valeurs V_c conformément à 5.6.2.2.
- Calculer le nombre d'UFC/ml dans la suspension d'essai N et dans la suspension de validation N_v selon la méthode indiquée en 5.6.2.3 ou 5.6.2.5. Vérifier conformément à 5.7.

5.4.2 - Solution d'essai du produit

Les solutions d'essai du produit doivent être préparées dans de l'eau dure (5.2.2.7) au minimum à trois concentrations différentes, parmi lesquelles une sera active et une autre, non active. Le produit tel qu'il est reçu peut lui-même constituer l'une des solutions d'essai du produit.

Les dilutions de produits prêts à l'emploi, c'est-à-dire les produits non dilués lors de leur utilisation, doivent être préparées dans de l'eau (voir 5.2.2.2) et non dans de l'eau dure.

Pour les produits solides, dissoudre le produit en l'état en pesant au moins $1 \text{ g} \pm 10 \text{ mg}$ du produit dans une fiole jaugée et en complétant avec de l'eau dure (5.2.2.7). Les dilutions consécutives (c'est-à-dire avec des concentrations inférieures) doivent être préparées dans des fioles jaugées (5.3.2.12) sur une base volume/volume en utilisant de l'eau dure (5.2.2.7).

Pour les produits liquides, les dilutions du produit doivent être préparées dans l'eau dure sur une base volume/volume à l'aide de fioles jaugées (5.3.2.12).

Les solutions d'essai du produit doivent être préparées extemporanément et utilisées dans les 2 h. Elles doivent former une préparation homogène, physiquement stable pendant toute la durée du mode opératoire. Si au cours de la conduite du mode opératoire, une absence d'homogénéité apparaît en raison de la formation d'un précipité ou d'un floculant (par exemple à cause de l'adjonction de substances interférentes), cela doit être consigné dans le rapport d'essai.

NOTE : Le dénombrement de micro-organismes intégrés dans un précipité ou un floculant est délicat et peu fiable.

Enregistrer la concentration d'essai en termes de masse par volume ou de volume par volume ainsi que les détails concernant l'échantillon de produit en l'état.

5.5 - Mode opératoire pour déterminer l'activité bactéricide du produit

5.5.1 - Généralités

5.5.1.1 - Conditions expérimentales (obligatoires et additionnelles)

Outre les conditions obligatoires de température, temps de contact, substances interférentes et souches d'essai, des conditions expérimentales additionnelles peuvent être sélectionnées en fonction de l'utilisation pratique prévue du produit (Article 4) :

- température q (en °C) :
 - la température obligatoire à tester est $q = 20$ °C ;
 - des températures additionnelles (Article 4) peuvent être choisies conformément aux recommandations du fabricant, mais sans dépasser 60 °C ;
 - l'écart admis pour chaque température choisie est de ± 1 °C ;
- temps de contact t (en min) :
 - le temps de contact obligatoire à tester est $t = 60$ min ;
 - des temps de contact additionnels (Article 4) peuvent être choisis parmi les suivants : 5 min, 15 min et 30 min ;
 - l'écart admis pour chaque temps de contact choisi est de ± 10 s ;
- substance interférente :
 - la substance interférente obligatoire à tester se compose de 0,30 g/l d'albumine bovine (5.2.2.8.2) dans les conditions de propreté ou d'un mélange de 3 ml/l d'érythrocytes de mouton et de 3 g/l d'albumine bovine (5.2.2.8.3) dans les conditions de saleté — en fonction de l'application pratique ;
 - des substances interférentes additionnelles peuvent être soumises à essai en fonction de domaines d'application spécifiques ;
- souches d'essai :
 - les souches d'essais obligatoires sont ; *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus* et *Enterococcus hirae* (5.2.1).

5.5.1.2 - Choix du neutralisant

Pour déterminer le neutralisant approprié, procéder à la validation de la méthode par dilution-neutralisation (voir 5.5.2.3, 5.5.2.4 et 5.5.2.5 en relation avec 5.5.2.6) à l'aide d'un neutralisant choisi en fonction de l'expérience acquise en laboratoire et des données publiées.

Si ce neutralisant ne convient pas, renouveler l'essai de validation avec un autre neutralisant contenant une combinaison de polysorbate 80 (30 g/l), saponine (30 g/l), L-histidine (1 g/l), lécithine (3 g/l) et thiosulfate de sodium (5 g/l) dans le diluant (5.2.2.4) ou dans une solution tampon phosphate à 0,0025 mol/l (voir B.2).

NOTE : Dans des circonstances particulières, il peut s'avérer nécessaire d'ajouter un neutralisant à la gélose TSA (5.2.2.3). Si un neutralisant est ajouté à la gélose TSA, il convient d'ajouter la même quantité de neutralisant à la gélose TSA utilisée dans le mode opératoire d'essai.

5.5.1.3 - Modes opératoires de validation et de contrôle — Instructions générales.

La neutralisation et/ou l'élimination de l'activité bactéricide et/ou bactériostatique du produit doit être contrôlée(s) et validée(s) — seulement pour la concentration d'essai du produit la plus élevée — pour chacune des souches d'essai utilisées et pour chaque condition expérimentale (substance interférente, température, temps de contact). Ces modes opératoires (témoins de conditions expérimentales, témoin de neutralisant et validation de la méthode) doivent être conduits en même temps que l'essai et avec le même neutralisant que celui utilisé pour l'essai.

Dans le cas de produits prêts à l'emploi, remplacer l'eau dure par de l'eau (5.2.2.2).

Si, en raison de problèmes de neutralisation, un neutralisant a été ajouté à la gélose TSA (5.5.1.2) utilisée pour les modes opératoires de validation et de contrôle, la gélose TSA utilisée pour l'essai doit également contenir la même quantité de ce neutralisant.

5.5.1.4 - Équilibrage de la température

Avant l'essai, équilibrer tous les réactifs (solutions d'essai du produit (5.4.2), suspension d'essai (5.4.1.4), suspension de validation (5.4.1.5), diluant (5.2.2.4), eau dure (5.2.2.7) et substance interférente (5.2.2.8)) à la température d'essai q à l'aide du bain d'eau (5.3.2.2) maintenu à q . Observer les dispositions indiquées en 5.4.1.4 b). Vérifier que la température des réactifs est stabilisée à q .

Le neutralisant (5.2.2.5) et l'eau (5.2.2.2) doivent être équilibrés à une température de (20 ± 1) °C.

Dans le cas de produits prêts à l'emploi, l'eau (5.2.2.2) doit être en outre équilibrée à la température d'essai q .

5.5.1.5 - Précautions à prendre pour la manipulation des souches

Ne pas toucher la partie supérieure du tube à essai lorsque l'on ajoute les suspensions d'essai ou de validation.

5.5.1.6 - Inoculation des porte-germes

À l'aide d'une pipette, introduire 1,0 ml de substances interférentes (5.2.2.8) dans un tube. Ajouter 9,0 ml de la suspension d'essai (5.4.1.5), diluant [5.3.2.6a)] et, placer 0,05 ml de ce mélange à l'aide d'une pipette sur le « carré d'ensemencement » d'un porte-germe (5.3.2.17) et répartir de façon égale à l'intérieur du carré, par exemple, avec la pointe de la pipette. Laisser l'inoculum sécher dans l'incubateur (5.3.2.3) jusqu'à siccité visible et pendant une durée maximale de 60 min. Utiliser le porte-germe immédiatement après la fin du temps de séchage.

Noter le temps de séchage dans le rapport d'essai.

5.5.2 - Méthode ¹

5.5.2.1 - Généralités

Les modes opératoires d'essai, de contrôle et de validation (voir de 5.5.2.2 à 5.5.2.6) doivent être effectués en même temps.

5.5.2.2 - Essai «N_a» (Détermination des concentrations bactéricides), témoin eau «N_w»

- A l'aide d'une pipette, introduire 10 ml de l'une des solutions d'essai du produit (5.4.2) dans un tube cylindrique à bouchon vissé (5.3.2.15) placé dans un bain d'eau maintenu à la température d'essai choisie de q [5.5.1.1a)].

- immerger un porte-germe inoculé (5.5.1.6) immédiatement après la fin du processus de séchage. S'assurer que le carré d'ensemencement est complètement recouvert par la solution d'essai du produit (5.4.2). Déclencher le chronomètre et le laisser fonctionner pendant le temps de contact t choisi [5.5.1.1b)].
- À l'issue du temps t , transférer le porte-germe dans un second tube cylindrique à bouchon vissé (5.3.2.15), placé dans un bain d'eau maintenu à 20 °C et rempli avec 10 ml de neutralisant (5.2.2.5) et avec approximativement 1 ml de billes de verre (5.3.2.13). Redéclencher le chronomètre et mélanger pendant 15 s [5.3.2.6a)]. À l'issue d'un temps de neutralisation de 5 min \pm 10 s, mélanger et prélever immédiatement un échantillon de 1,0 ml du mélange d'essai neutralisé N_a (contenant le neutralisant, la solution d'essai du produit, la substance interférente et la suspension d'essai) en double et ensemercer les boîtes en utilisant la technique de dénombrement en profondeur ou la technique de dénombrement en surface. Transférer en outre 0,5 ml du mélange d'essai N_a dans un tube contenant 4,5 ml de neutralisant (dilution 10^{-1} de N_a), mélanger [5.3.2.6a)] et diluer en conséquence pour obtenir des dilutions à 10^{-2} et 10^{-3} de N_a avec le neutralisant. Prélever des échantillons de 1,0 ml de chaque tube de dilution en double et inoculer chaque échantillon de 1,0 ml dans des boîtes de Pétri distinctes en utilisant la technique du dénombrement en profondeur ou la technique de dénombrement en surface. Le nombre d'échantillons de 1,0 ml de N_a doit être de 8 en tout. Lorsque la technique de dénombrement en profondeur est utilisée, prélever à la pipette 1,0 ml de chaque échantillon et transférer dans des boîtes de Pétri distinctes puis ajouter 15 ml à 20 ml de gélose TSA fondue (5.2.2.3), refroidie à (45 \pm 1) °C. Lorsque la technique de dénombrement en surface est utilisée, étaler 1,0 ml de chaque échantillon – divisé en portions de taille approximativement égales – sur un nombre approprié (au moins deux) de boîtes contenant de la gélose TSA (5.2.2.3) séchée en surface. Pour l'incubation et le dénombrement, voir 5.5.2.6.
 - Effectuer dans le même temps les opérations de a) à b) en utilisant les autres solutions d'essai du produit.
 - Témoin eau N_w : effectuer les opérations de a) à b), mais au lieu de la solution d'essai du produit, prélever à la pipette 10 ml d'eau dure (5.2.2.7) ou – dans le cas des produits prêts à l'emploi – d'eau (5.2.2.2). Par déviation de b), produire des dilutions de 10^{-5} à partir du mélange d'essai neutralisé N_w pour l'incubation et le dénombrement.
 - Effectuer les opérations de a) à d) en appliquant les autres conditions expérimentales obligatoires et – le cas échéant – des conditions expérimentales additionnelles (5.5.1.1).

5.5.2.3 - Témoin de condition expérimentale «A» (Validation des conditions expérimentales sélectionnées ou vérification de l'absence de tout effet létal dans les conditions d'essai)

- À l'aide d'une pipette, introduire 1,0 ml de la substance interférente utilisée pour l'essai (voir 5.5.2.2) dans un tube. Ajouter 1,0 ml de suspension de validation (5.4.1.5). Déclencher immédiatement le chronomètre, mélanger [5.3.2.6a)] et placer le tube dans un bain d'eau maintenu à la température q pendant 2 min \pm 10 s. À l'issue de ce laps de temps, ajouter 8,0 ml d'eau dure (5.2.2.7). (Dans le cas de produits prêts à l'emploi : remplacer l'eau dure par de l'eau (5.2.2.2)). Déclencher le chronomètre, et, simultanément mélanger [5.3.2.6a)] et placer le tube dans un bain d'eau maintenu à la température q pendant le temps t . Juste avant expiration du temps t , mélanger [5.3.2.6a)] à nouveau.
- À l'issue du temps t , prélever un échantillon de 1,0 ml de ce mélange A en double et l'ensemencer en utilisant la technique du dénombrement en profondeur ou la technique de dénombrement en surface [5.5.2.2b)].

Pour l'incubation et le dénombrement, voir 5.5.2.6.

5.5.2.4 - Témoin de neutralisant «B» (Vérification de l'absence de toxicité du neutralisant)

- À l'aide d'une pipette, introduire 8,0 ml du neutralisant – utilisé pour l'essai (voir 5.5.2.2) – et 1,0 ml d'eau (5.2.2.2) dans un tube. Ajouter 1,0 ml de la suspension de validation (5.4.1.5). Déclencher le chronomètre, et simultanément, mélanger [5.3.2.6a)] et placer le tube dans un bain d'eau maintenu à (20 \pm 1) °C pendant 5 min \pm 10 s. Juste avant expiration de ce laps de temps, mélanger [5.3.2.6a)] à nouveau.
- À l'issue de ce laps de temps, prélever un échantillon de 1,0 ml de ce mélange B en double et l'ensemencer en utilisant la technique du dénombrement en profondeur ou la technique de dénombrement en surface [5.5.2.2b)].

Pour l'incubation et le dénombrement, voir 5.5.2.6.

5.5.2.5 - Validation de la méthode «C» (validation de la dilution-neutralisation)

- À l'aide d'une pipette, introduire 1,0 ml de la substance interférente utilisée pour l'essai (5.5.2.2) dans un tube. Ajouter 1,0 ml du diluant (5.2.2.4) puis, tout en déclenchant le chronomètre, 8,0 ml de la solution d'essai du produit, uniquement à la concentration maximale utilisée pour l'essai (voir 5.5.2.2). Mélanger [5.3.2.6a)] et placer le tube dans un bain d'eau maintenu à la température q pendant le temps t . Juste avant expiration du temps t , mélanger [5.3.2.6a)] à nouveau.

NOTE : Il n'est pas nécessaire de préparer la concentration la plus élevée de la solution d'essai du produit 1,25 fois supérieure à la concentration dérivée (effectivement soumise à essai) même si elle est diluée pendant la validation de la méthode par la substance interférente et le diluant (8+1+1). Dans l'essai N_a , la quantité de neutralisant liée à la solution d'essai du produit est plus importante.

- à l'issue du temps t , transférer 1,0 ml du mélange dans un tube contenant 8,0 ml de neutralisant (utilisé en 5.5.2.2). Déclencher le chronomètre, mélanger [5.3.2.6a)] et placer le tube dans un bain d'eau maintenu à (20 \pm 1) °C pendant 5 min \pm 10 s. Ajouter 1,0 ml de suspension de validation (5.4.1.5). Déclencher un chronomètre au début de l'adjonction et mélanger [5.3.2.6a)]. Placer le tube dans un bain d'eau maintenu à (20 \pm 1) °C pendant (30 \pm 1) min. Juste avant expiration de ce laps de temps, mélanger [5.3.2.6a)] à nouveau.
- À l'issue de ce laps de temps, prélever un échantillon de 1,0 ml du mélange C en double et l'ensemencer en utilisant la technique du dénombrement en profondeur ou la technique de dénombrement en surface [5.5.2.2b)].

Pour l'incubation et le dénombrement, voir 5.5.2.6.

5.5.2.6 - Incubation et dénombrement du mélange d'essai et des mélanges témoins et de validation

- Incuber les boîtes (5.3.2.3) pendant 20 h à 24 h. Écarter toutes les boîtes sur lesquelles il est impossible de compter les colonies (pour quelque raison que ce soit). Compter les boîtes et déterminer le nombre d'unités formant colonies. Incuber les boîtes 20 h à 24 h de plus. Ne pas recompter les colonies sur les boîtes qui ne présentent plus de colonies bien séparées. Recompter les colonies sur les autres boîtes. Si le nombre de colonies a augmenté, utiliser uniquement le nombre le plus élevé pour toute évaluation ultérieure.
- pour chaque boîte, noter le nombre exact de colonies mais enregistrer > 330 pour tous les dénombrements supérieurs à 330 et déterminer les valeurs V_c conformément à 5.6.2.2 ;
- calculer les nombres d'UFC/mL dans les mélanges d'essai N_a et N_w et dans les mélanges de validation A, B et C selon les méthodes indiquées en 5.6.2.3b), 5.6.2.4 et 5.6.2.6. Vérifier conformément au 5.7.

5.6 - Données expérimentales et calculs

5.6.1 - Explication des termes et abréviations

5.6.1.1 - Vue d'ensemble des différentes suspensions/des différents mélanges d'essai

- N et N_v représentent les suspensions bactériennes, N_a représente le mélange d'essai bactéricide, N_w représente le mélange d'essai dans le témoin eau, A (témoin de conditions expérimentales), B (témoin de neutralisant), C (validation de la méthode) représentent les différents mélanges d'essai témoins.
- N , N_v , N_{v0} , N_a , et A, B, C représentent le nombre de cellules dénombrées par mL dans les différents mélanges d'essai selon le Tableau 1 :

Tableau 1 - Nombre de cellules dénombrées par mL dans les différents mélanges d'essai

	Nombre de cellules par mL dans les suspensions bactériennes	Nombre de cellules par mL dans les mélanges d'essai au début du temps de contact (temps 0)	Nombre de survivants par mL dans les mélanges d'essai au terme du temps de contact t (A), de 5 min (B) ou de 30 min (C)
Essai	N Suspension d'essai	$N/20$ (= nombre théorique) sur le portegerme	N_a , N_w (avant neutralisation)
Témoins	N_v Suspension de validation	$N_{v0}(N_{v0} = N_v / 10)$	A, B, C

5.6.1.2 - Valeurs V_c

Toutes les données expérimentales sont consignées sous la forme de valeurs V_c : la valeur V_c est le nombre d'UFC dénombrées par échantillon de 1,0 mL.

5.6.2 - Calculs

5.6.2.1 - Généralités

La première étape est la détermination des valeurs V_c , la deuxième le calcul de N , N_a , N_w , N_v , N_{v0} , A, B et C. La troisième étape est le calcul de la réduction R (voir 5.8).

5.6.2.2 - Détermination des valeurs V_c

- Les limites habituelles pour le dénombrement des bactéries sur les boîtes de gélose se situent entre 15 et 300 colonies. Dans la présente Norme européenne, un écart de 10 % est accepté, les limites sont donc de 14 et 330.

NOTE 1 La limite inférieure (14) repose sur le fait que la variabilité est d'autant plus importante que le nombre obtenu dans l'échantillon (1 mL) est faible ; par conséquent, les calculs ultérieurs peuvent donner des résultats erronés. La limite inférieure s'applique uniquement à l'échantillon (et pas nécessairement au dénombrement sur une boîte), par exemple, deux boîtes par échantillon de 1 ml avec 11 UFC et 5 UFC donnent une valeur V_c de 16. La limite supérieure (330) reflète l'imprécision du dénombrement des colonies confluentes et l'inhibition de la croissance due à l'épuisement des éléments nutritifs. Elle fait uniquement référence au dénombrement sur une boîte et pas nécessairement à l'échantillon.

- Selon le nombre de boîtes utilisées par échantillon de 1 ml (5.6.1.2), déterminer et enregistrer les valeurs V_c .

NOTE 2 Si plusieurs boîtes par échantillon de 1 ml ont été utilisées pour déterminer la valeur V_c , il convient de noter les dénombrements par boîte.

Si le dénombrement sur une boîte est supérieur à 330, consigner le nombre dans le rapport sous la forme «> 330». Si plusieurs boîtes ont été utilisées par échantillon de 1 ml et que l'une d'elles au moins présente un nombre de colonies supérieur à 330, consigner cette valeur V_c dans le rapport sous la forme «supérieure à la somme des dénombrements» (par exemple pour > 330, 280, 305», consigner «> 915». Si une valeur V_c est inférieure à 14, consigner le nombre dans le rapport (mais en le remplaçant par «< 14» pour les calculs ultérieurs dans le cas de N_a).

- Seules les valeurs V_c se situant dans les limites de dénombrement sont prises en compte pour les calculs ultérieurs, sauf dans le cas de N_a (voir 5.6.2.4).

5.6.2.3 - Calcul de N et N_w

- N est le nombre de cellules par mL dans la suspension d'essai (5.4.1.4). L'évaluation portant sur deux dilutions de la suspension d'essai (voir 5.4.1.4 conjointement à 5.4.1.6), calculer le nombre d'UFC/mL comme étant le

dénombrement moyen pondéré à l'aide de la formule (1) :
$$N = \frac{c}{(n_1 + 0,1n_2)10^{-7}}$$

- où :
- c est la somme des valeurs V_c prises en compte ;
- n_1 est le nombre de valeurs V_c prises en compte à la première dilution (10^{-7}) ;
- n_2 est le nombre de valeurs V_c prises en compte à la deuxième dilution (10^{-8}) ;
- 10^{-7} est le facteur de dilution correspondant à la dilution minimale.

Arrondir les résultats calculés à deux chiffres significatifs. Si le dernier chiffre est inférieur à 5, ne pas modifier le chiffre précédent ; si le dernier chiffre est supérieur à 5, augmenter le chiffre précédent d'une unité ; si le dernier chiffre est égal à 5, arrondir le chiffre précédent au chiffre supérieur le plus proche. Procéder par étapes jusqu'à obtention de deux chiffres significatifs. Le nombre d'UFC/mL ainsi obtenu est exprimé par un nombre compris entre 1,0 et 9,9 multiplié par la puissance appropriée de 10.

EXEMPLE :
$$N = \frac{168 + 213 + 20 + 25}{(2 + 0,1 \times 2)10^{-7}} = \frac{426}{2,2 \times 10^{-7}} = 1,9364 \times 10^9 = 1,9 \times 10^9 \text{ (en UFC/mL)}$$

- N_W est le nombre de survivants par mL dans le mélange d'essai [voir 5.5.2.2d)] à l'issue du temps de contact et avant neutralisation. Il est dix fois supérieur aux valeurs V_c (voir 5.5.2.6) en raison de l'adjonction de neutralisant [voir 5.5.2.2b) et d)]. Calculer le nombre d'UFC/mL comme étant le dénombrement moyen de la dilution à 10^{-5} en utilisant la formule (2) :
$$N_W = \frac{c \times 10}{n \times 10^{-5}}$$

- où :
- c est la somme des valeurs V_c prises en compte ;
- n est le nombre de valeurs V_c prises en compte.

5.6.2.4 - Calcul de N_a

N_a est le nombre de survivants par mL dans le mélange d'essai [voir 5.5.2.2a)] à l'issue du temps de contact et avant neutralisation. Il est dix fois supérieur aux valeurs V_c (voir 5.5.2.6) en raison de l'adjonction de neutralisant [voir 5.5.2.2b)].

- Calculer la moyenne pour chaque dilution $N_a^0, N_a^{-1}, N_a^{-2}, N_a^{-3}$ en utilisant la formule (3) :

$$N_a^0 N_a^{-1} N_a^{-2} N_a^{-3} = \frac{c \times 10}{n}$$

- où :
- c est la somme des valeurs V_c prises en compte ;
- n est le nombre de valeurs V_c prises en compte.

Si l'une des valeurs V_c en double, ou les deux, est/sont en dessous de la limite inférieure ou au-dessus de la limite supérieure, exprimer les résultats sous la forme «inférieure à» ou «supérieure à».

EXEMPLE 1 :

$$\text{Valeurs } V_c \text{ en double } N_a^{-1} : 2, 16 N_a^{-1} = \frac{(< 14 + 16) \times 10}{2} = < 150 \times 10^1 = < 1\,500 = < 1,5 \times 10^3$$

$$\text{Valeurs } V_c \text{ en double } N_a^{-2} : > 330, 290 N_a^{-2} = \frac{(> 330 + 290) \times 10}{2} = > 3\,100 \times 10^2 = > 310\,000 = > 3,1 \times 10^5$$

Valeurs V_c en double $N_a^0, > 990, > 870$ (trois boîtes par échantillon de 1,0 ml)

$$N_a^0 = \frac{(> 990 + > 870) \times 10}{2} = > 9\,300 \times 10^0 = > 9\,300 = > 9,3 \times 10^3$$

- Pour calculer N_a utiliser uniquement les résultats $N_a^0, N_a^{-1}, N_a^{-2}, N_a^{-3}$ où l'une des valeurs V_c , ou les deux, se situe/situent dans les limites de dénombrement. Des exceptions et des règles s'appliquent dans les cas particuliers : Si toutes les dilutions consécutives de N_a donnent des valeurs moyennes sous la forme «supérieure à», considérer uniquement la dilution maximale (10^{-3}) en tant que résultat pour N_a .

EXEMPLE 2 :

	V_{c1}	V_{c2}		moyenne $\infty 10$	
N_a^0	> 330	> 330	=	> 3 300	$N_a = > 3\,300 \infty 10^3 = > 3,3 \infty 10^6$
N_a^{-1}	> 330	> 330	=	> 3 300	
N_a^{-2}	> 330	> 330	=	> 3 300	
N_a^{-3}	> 330	> 330	=	> 3 300	

Si toutes les dilutions consécutives de N_a donnent des valeurs moyennes sous la forme «inférieure à», considérer uniquement la dilution minimale (10^0) en tant que résultat pour N_a .

EXEMPLE 3 :

	V_{c1}	V_{c2}		moyenne $\infty 10$	
N_a^0	< 14	18	=	< 160	$N_a = < 160 = < 1,6 \infty 10^2$
N_a^{-1}	< 14	< 14	=	< 140	
N_a^{-2}	< 14	< 14	=	< 140	
N_a^{-3}	< 14	< 14	=	< 140	

Si l'une des valeurs V_c en double, ou les deux, dans uniquement une dilution de N_a se situe/situent dans les limites de dénombrement, utiliser ce résultat pour N_a .

EXEMPLE 4 :

(deux boîtes par échantillon de 1 ml) :

	V_{c1}	V_{c2}		moyenne $\infty 10$	
N_a^0	> 660	> 660	=	> 6 600	$N_a = 1\ 015 \infty 10^1 = 1,0 \infty 10^4$
N_a^{-1}	96	107	=	1 015	
N_a^{-2}	< 14	< 14	=	< 140	
N_a^{-3}	< 14	< 14	=	< 140	

Si la dilution maximale dans deux dilutions consécutives de N_a donne une valeur moyenne sous la forme «inférieure à» et si la dilution minimale donne une valeur moyenne sous la forme «supérieure à», considérer uniquement la dilution minimale comme valeur N_a .

EXEMPLE 5 :

(deux boîtes par échantillon de 1 ml) :

	V_{c1}	V_{c2}		moyenne $\infty 10$	
N_a^0	> 660	> 660	=	> 6 600	$N_a = > 6\ 425 \infty 10^1 = > 6,4 \infty 10^4$
N_a^{-1}	> 660	> 625	=	> 6 425	
N_a^{-2}	< 14	29	=	< 215	
N_a^{-3}	< 14	< 14	=	< 140	

- Utiliser au maximum deux dilutions consécutives pour calculer N_a sous forme de moyenne pondérée. Des règles s'appliquent dans les cas particuliers : Si l'une des valeurs V_c en double, ou les deux, dans trois ou plusieurs dilutions consécutives de N_a (y compris N_a^0) se situe/situent dans les limites de dénombrement (par exemple, N_a^{-2} : 17, 23 ; N_a^{-1} : 120, 135 ; N_a^0 : 308, > 330), la totalité de l'essai n'est pas valable (voir 5.7). Si deux dilutions consécutives de N_a donnent des valeurs V_c en double se situant dans les limites de dénombrement, calculer N_a sous forme de moyenne pondérée en utilisant la formule (4) : $N_a = \frac{c \times 10}{2,2 \times 10^z}$

• où :

- c est la somme des valeurs V_c prises en compte ;
- z est le facteur de dilution correspondant à la dilution minimale, par exemple : N_a^{-2} est la dilution minimale comparée à N_a^{-3} .

Si dans deux dilutions consécutives de N_a , les deux valeurs V_c de la dilution maximale se situent dans les limites de dénombrement, et qu'une valeur V_c de la dilution minimale est «supérieure à», calculer N_a sous forme de moyenne pondérée en utilisant la formule (4) :

EXEMPLE 6 :

	V_{c1}	V_{c2}	moyenne $\times 10$	$N_a = \frac{(> 330 + 300 + 46 + 57) \times 10}{2,2 \times 10^0} = > 3\,331,8 = 3,3 \times 10^3$
N_a^0	> 330	300	> 3 150	
N_a^{-1}	46	57	515	
N_a^{-2}	< 14	< 14	< 140	
N_a^{-3}	< 14	< 14	< 140	

Si dans deux dilutions consécutives de N_a , l'une des valeurs en double de la dilution maximale correspond à «< 14» considérer uniquement la dilution minimale pour le résultat de N_a .

EXEMPLE 7 :

	V_{c1}	V_{c2}		moyenne $\times 10$	
N_a^0	> 330	> 330	=	> 3 300	$N_a = > 3\,155 \times 10^2 = > 3,2 \times 10^5$
N_a^{-1}	> 330	> 330	=	> 3 300	
N_a^{-2}	301	> 330	=	> 3 155	
N_a^{-3}	< 14	26	=	< 200	

5.6.2.5 - Calcul de N_v et N_{v0}

N_v est le nombre de cellules par millilitre dans la suspension d'essai (5.4.1.5). Il est dix fois supérieur aux dénombrements en termes de valeurs V_c (voir 5.4.1.5) en raison de la dilution à 10^{-1} [voir 5.4.1.5b)].

N_{v0} est le nombre de cellules par millilitre dans les mélanges A, B ou C (5.6.2.5) au début du temps de contact (instant 0). Il représente un dixième de la moyenne des valeurs V_c de N_v [voir 5.4.1.6c)] – prises en compte.

Calculer N_v et N_{v0} à l'aide des formules (5) et (6) suivantes :

$$N_v = \frac{c \times 10}{n} \quad N_{v0} = \frac{c}{n}$$

- où :
- c est la somme des valeurs V_c prises en compte ;
- n est le nombre de valeurs V_c prises en compte.

5.6.2.6 - Calcul de A, B et C (témoins et validation de la méthode)

A, B et C sont les nombres de survivants dans le témoin de conditions expérimentales (5.5.2.3), le témoin de neutralisant (5.5.2.4) et la validation de la méthode (5.5.2.5) à l'issue du temps de contact t (A) ou des temps définis de 5 min (B) et 30 min (C). Ils correspondent à la moyenne des valeurs V_c des mélanges A, B et C prises en compte.

Calculer A, B et C à l'aide de la formule (7) :

$$A, B, C = \frac{c}{n}$$

- où :
- c est la somme des valeurs V_c prises en compte ;
- n est le nombre de valeurs V_c prises en compte.

5.7 - Vérification de la méthodologie

5.7.1 - Généralités

Un essai est valable si :

- tous les résultats satisfont aux critères du 5.7.3 ; et
- toutes les prescriptions du 5.8.2 sont respectées ; et
- il n'est pas invalidé par un résultat indiqué sous 5.6.2.4 c) (premier cas particulier).

5.7.2 - Contrôle des dénombrements moyens pondérés

Pour les résultats calculés en faisant la moyenne pondérée de deux dilutions consécutives (par exemple «N»), le quotient de la moyenne des deux résultats doit être compris entre 5 minimum et 15 maximum. Pour les résultats se situant en dessous de la limite inférieure, on prend le nombre limite inférieure (14). Pour les résultats se situant au-dessus de la limite supérieure [5.6.2.2b)] ; on prend le nombre limite supérieur.

EXEMPLE :

EXEMPLE : Pour N : dilution à 10^{-7} : (168 + 215) UFC, dilution à 10^{-8} : (20 + 14) UFC ; (168 + 215) / (20 + 14) = 383/34 = 11,26 = entre 5 et 15).

NOTE : Lorsque les dénombrements obtenus sur les boîtes se trouvent en dehors des limites fixées pour la détermination des valeurs V_c (5.6.2.2), vérifier la moyenne pondérée tel que mentionné ci-dessus mais utiliser uniquement les valeurs V_c qui se situent dans les limites de dénombrement pour le calcul de N .

5.7.3 - Limites fondamentales

Pour chaque souche d'essai, vérifier que :

a1)	N	est compris entre $1,5 \times 10^9$ UFC/ml et $5,0 \times 10^9$ UFC/ml ($9,17 \leq \lg N \leq 9,70$)
a2)	N_w	n'est pas inférieur à $1,4 \times 10^7$ UFC /ml ($\lg N_w \geq 7,15$) et n'est pas supérieur à $0,05 \times N$ ($\lg N_w \leq (\lg N - 1,3)$).
NOTE : La dilution due à l'adjonction de neutralisant est prise en compte pour définir les limites de N_w . La limite inférieure (7,15) est la valeur minimale de N_w pour permettre la mise en évidence de la valeur requise de R (5.8.1). La limite supérieure reflète la dilution de N avant séchage sur le porte-germe (5.5.1.6).		
b)	N_{vo}	est compris entre 30 UFC/ml et 160 UFC/ml ($3,0 \times 10^1$ et $1,6 \times 10^2$) (N_v est compris entre $3,0 \times 10^2$ UFC/ml) et $1,6 \times 10^3$ UFC/ml)
c)	A, B, C	est supérieur ou égal à $0,5 \times N_{vo}$
d)	Contrôle des dénombrements moyens pondérés (5.7.2) : le quotient est compris entre 5 minimum et 15 maximum.	

5.8 - Expression des résultats et précision

5.8.1 - Réduction

La réduction ($R = N_w/N_a$) est exprimée en logarithme.

Pour chaque souche d'essai, enregistrer le nombre d'UFC/mL dans le témoin eau N_w [5.6.2.3 b)] et les résultats de l'essai N_a (5.6.2.4).

Pour chaque concentration du produit et chaque condition expérimentale, calculer et enregistrer séparément la réduction logarithmique décimale à l'aide de la formule (8) :

$$R = \frac{N_w}{N_a} \quad \text{ou} \quad \lg R = \lg N_w - \lg N_a$$

Pour les témoins et la validation de la méthode, enregistrer N_{vo} (voir 5.6.2.5), les résultats de A, B et C (voir 5.6.2.6) et leur comparaison avec N_{vo} [voir 5.7.3 c)].

5.8.2 - Contrôle de la solution active et non active d'essai du produit (5.4.2)

Au moins une concentration par essai [voir 5.5.2.2, de a) à c)] doit mettre en évidence une réduction de 5 lg ou plus et une concentration au moins doit mettre en évidence une réduction logarithmique de moins de 5.

5.8.3 - Souche d'essai limitante et concentration bactéricide

Pour chaque souche d'essai, enregistrer la plus faible concentration du produit pour laquelle l'essai est satisfait ($\lg R \geq 5$). Enregistrer comme souche d'essai limitante la souche nécessitant la concentration la plus élevée (il s'agit de celle qui est la moins sensible au produit dans les conditions expérimentales choisies).

La plus faible concentration de produit active sur la souche d'essai limitante est la concentration bactéricide déterminée selon la présente Norme européenne.

5.8.4 - Précision, répétitions

Compte tenu de la précision de la méthodologie déterminée par une analyse statistique sur la base des données fournies par une étude inter-laboratoires, une répétition de l'essai est recommandée. Répéter l'essai signifie mettre en œuvre le mode opératoire complet avec des suspensions d'essai et de validation préparées séparément. La répétition de l'essai peut se limiter à la souche d'essai limitante. La moyenne des résultats des répétitions (et non chaque résultat isolé) doit mettre en évidence une réduction logarithmique d'au moins 5 et doit également être calculée et enregistrée.

5.9 - Interprétation des résultats – conclusion

5.9.1 - Généralités

Les concentrations bactéricides déterminées selon la présente Norme européenne peuvent différer (Article 4) en fonction des conditions expérimentales choisies (obligatoires ou obligatoires et additionnelles).

5.9.2 - Activité bactéricide

5.9.2.1 - Activité bactéricide pour des besoins généraux

Le produit doit être considéré comme conforme à la norme EN 14561 si, lors d'un essai valide, il présente une réduction d'au moins 5 lg en 60 min ou moins à 20 °C avec la substance interférente choisie (conditions d'essai de propreté et/ou de saleté) dans les conditions définies par la présente Norme européenne lorsque les organismes d'essai sont *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus* et *Enterococcus hirae*.

La concentration bactéricide pour les besoins généraux est la concentration active sur la souche limitante.

5.9.2.2 - Activité bactéricide pour des besoins spécifiques

La concentration bactéricide pour besoin spécifique est la concentration du produit soumis à essai pour laquelle une réduction d'au moins 5 lg est observée dans un essai valide dans les conditions d'essai additionnelles choisies. Le produit doit être conforme à l'EN 14561 dans les conditions d'essai obligatoires. La concentration bactéricide pour des besoins spécifiques peut être inférieure à celle déterminée pour les besoins généraux.

5.9.3 - Revendications

Un produit qui réussit l'essai est caractérisé comme désinfectant chimique pour les instruments ayant une activité bactéricide dans des conditions représentatives de celles de l'utilisation pratique.

5.10 - Rapport d'essai

Le rapport d'essai doit faire référence à la présente Norme européenne (EN 14561).

Le rapport d'essai doit, au minimum, comporter les informations suivantes :

- l'identification du laboratoire d'essai ;
- l'identification du client ;
- l'identification de l'échantillon ;
 - le nom du produit ;
 - le numéro du lot et – si elle est disponible – la date limite d'utilisation ;
 - le fabricant ou, à défaut, le fournisseur ;
 - la date de livraison ;
 - les conditions de stockage ;
 - le diluant du produit dont l'utilisation est recommandée par le fabricant ;
 - la (les) substance(s) active(s) et sa (leurs) concentration(s) (facultatif) ;
 - l'aspect du produit ;
- le choix du neutralisant ; tous les détails concernant l'essai destiné à la validation du neutralisant doivent être fournis ;
- les conditions expérimentales :
 - la (les) date(s) des essais (période d'analyse) ;
 - le diluant utilisé pour la solution d'essai du produit (eau dure ou eau distillée) ;
 - les concentrations d'essai du produit ;
 - l'aspect des dilutions du produit ;
 - le temps de contact ;
 - la (les) température(s) d'essai ;
 - la (les) substance(s) interférente(s) ;
 - la stabilité et l'aspect des mélanges au cours de la mise en œuvre du mode opératoire (noter la formation éventuelle d'un précipité ou floculat) : substance interférente plus suspension d'essai, mélange d'essai neutralisé N_a ;
 - la température d'incubation ;
 - le neutralisant ;
 - l'identification des souches d'essai utilisées ;
 - le temps de séchage des porte-germesensemencés ;
- les résultats d'essai :
 - les témoins et la validation ;
 - l'évaluation de l'activité bactéricide ;
 - le nombre de répétitions par souche d'essai ;
- les remarques particulières ;
- la conclusion ;
- la date, le lieu et la signature identifiée.

NOTE : L'Annexe D donne un exemple de rapport d'essai type.

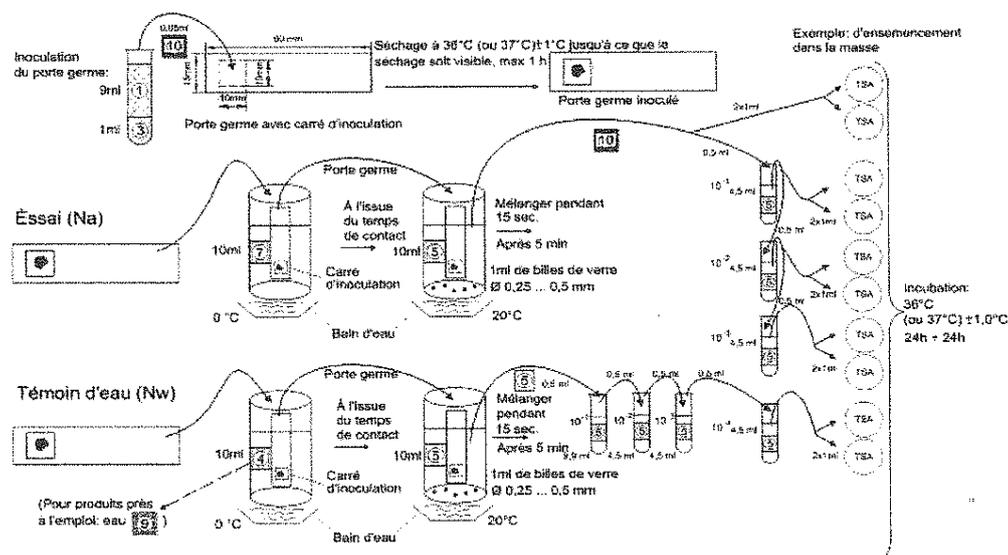
Copyright Afnor 2016. Tous droits réservés.
Imprimé le 2016 janvier 27 11:19:57 par Mielcarek Christine
Raison Sociale : EBI - ECOLE DE BIOLOGIE INDUSTRIELLE

Mielcarek Christine

NF EN 14561 (2007-03)

Annexe C (informative) - Représentations graphiques de la méthode d'essai

Pour l'essai (N_a) et le témoin eau (N_w), voir Figure C.1.



Légende

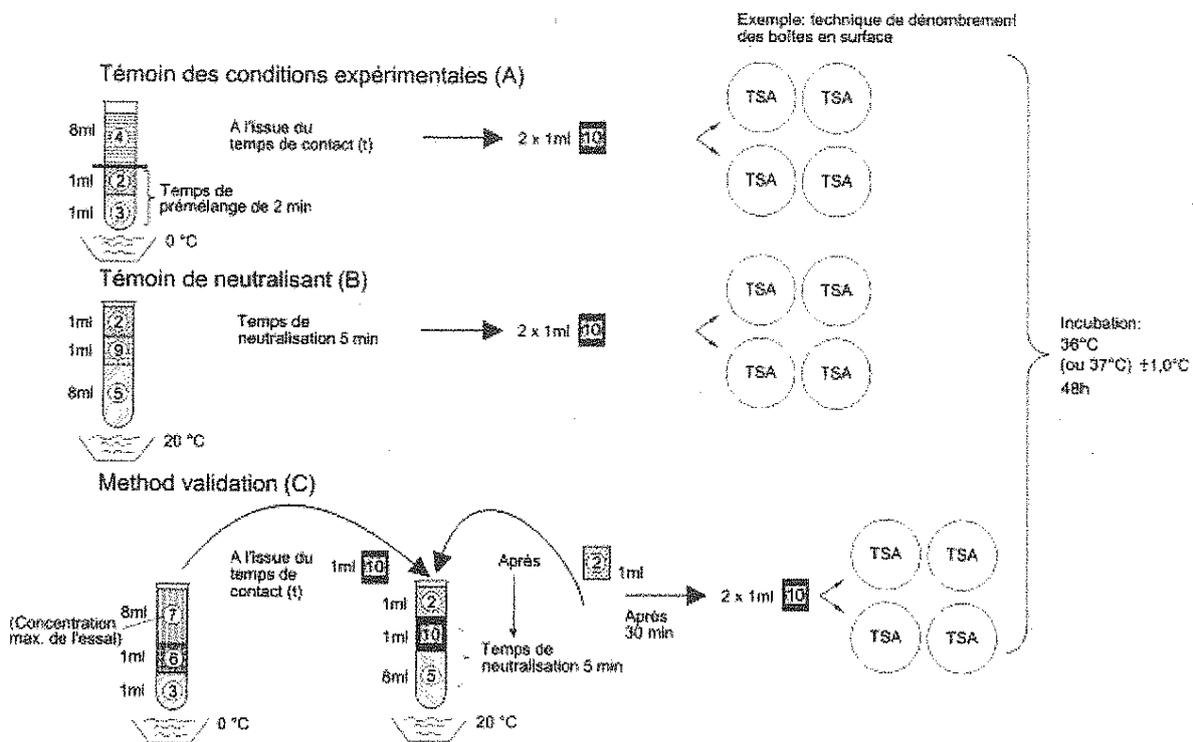
- 1 Suspension d'essai (N)
- 2 Suspension de validation (N_v)
- 3 Substance interférente
- 4 Eau dure
- 5 Neutralisant (20 °C)
- 6 Diluant
- 7 Solution d'essai du produit

9 Eau

10 Mélange

Figure C.1 Essai (N_a) et témoin eau (N_w)

Pour la validation, voir Figure C.2.

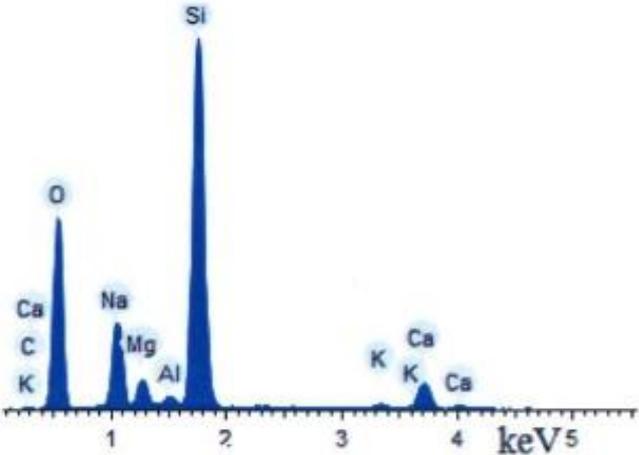


Légende

- 1 Suspension d'essai (N)
- 2 Suspension de validation (N_v)
- 3 Substance interférente
- 4 Eau dure
- 5 Neutralisant (20 °C)
- 6 Diluant
- 7 Solution d'essai du produit
- 9 Eau
- 10 Mélange

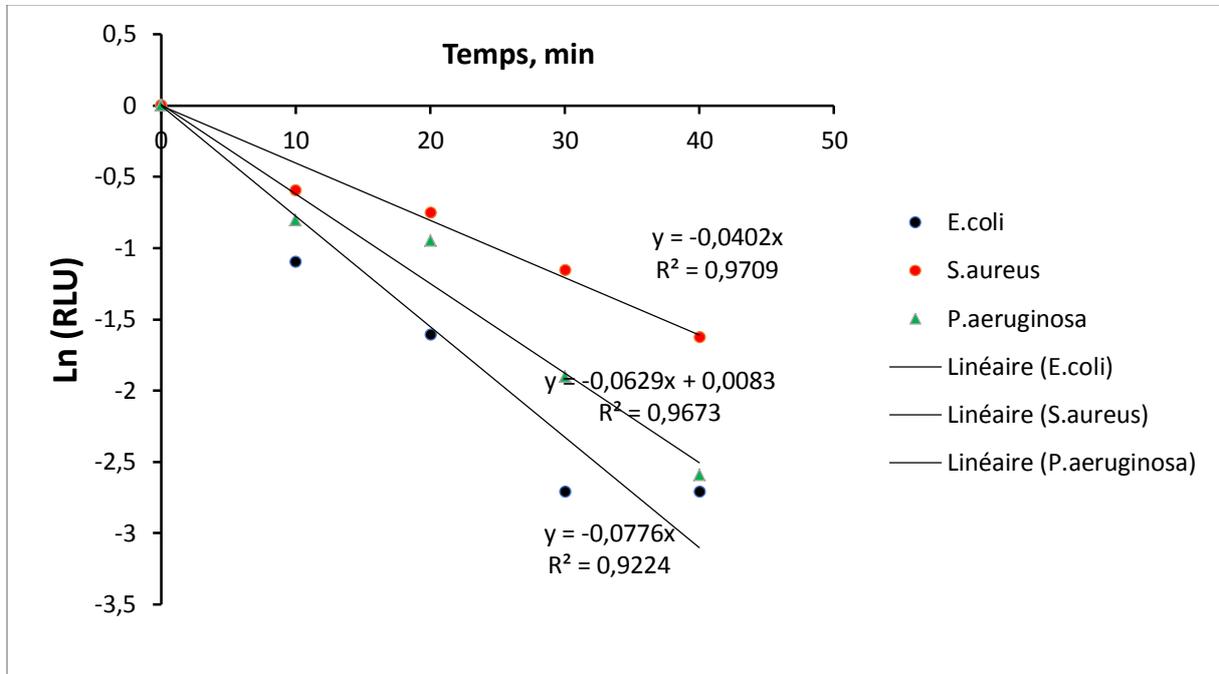
Figure C.2 Validation

Annexe II: Spectre de la plaque de verre sans dépôt

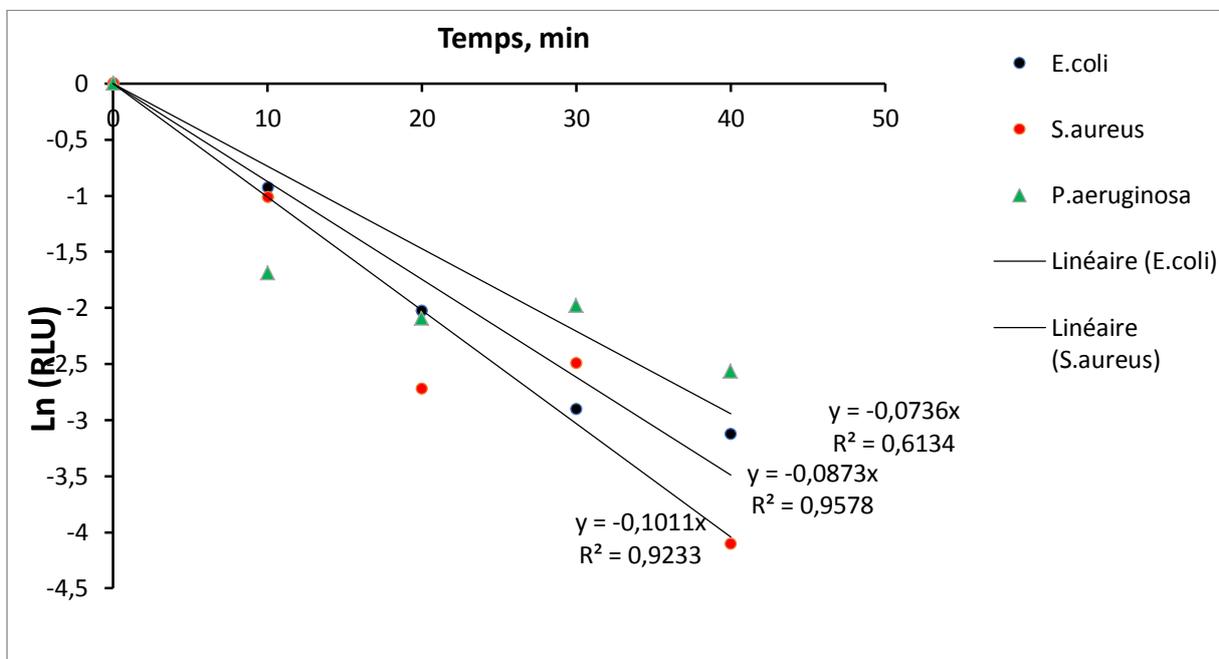


Annexe III: Etude de la cinétique de dégradation des bactéries par ATPmétrie A) CuO et B) ZnO

A)



B)



Résumé :

Ce travail de thèse a pour but la synthèse de nanoparticules d'oxydes métalliques (CuO, ZnO et TiO₂) par la méthode « sol-gel » pour des applications dans le domaine biomédical. Les nanoparticules de ZnO et CuO sont préparées à partir de précurseurs d'acétate, et le TiO₂ est élaboré dans un réacteur à micromélange rapide permettant le contrôle de la taille des nanoparticules. Des couches minces ont été élaborées par le procédé de dip-coating.

L'activité antibactérienne de ces oxydes métalliques a été étudiée sur des souches de la pharmacopée européenne ; une bactérie à Gram positif : *Staphylococcus aureus*, deux bactéries à Gram négatif : *Escherichia coli* et *Pseudomonas aeruginosa* et un champignon : *Candida albicans*. Différentes méthodes ont été adoptées pour l'évaluation de l'activité antibactérienne in vitro : la diffusion sur disque et puits, la bioluminescence (ATPmétrie) et la technique de décrochage sur plaques. Les tests effectués ont démontré une activité antibactérienne des nanoparticules de ZnO et CuO sous forme amorphe et cristalline, et uniquement sous forme cristalline pour le TiO₂. Un modèle mathématique a été élaboré à la base des résultats des tests antibactériens et de la cinétique d'évolution de la population bactérienne. Il a été conclu que la suppression bactérienne est plus efficace lors de la phase exponentielle, tandis que son efficacité est moindre lors de la phase stationnaire et de latence. Les tests de cytotoxicité des NPs en suspension sur des fibroblastes gingivaux ont montré une diminution de la viabilité cellulaire, en partie due à la présence du solvant.

Mots clés : Nanoparticules, CuO, ZnO, TiO₂, activité antibactérienne, modélisation

Abstarct :

This thesis aims are the synthesis of nanoparticles of metal oxides (CuO, ZnO and TiO₂) by soft chemistry "sol-gel" for applications in the biomedical field. Nanoparticles of ZnO and CuO are prepared from acetate precursors, and TiO₂ is produced in a fast micromixer reactor allowing size control of nanoparticles. Thin layers have been developed by dip-coating process.

Metal oxides antibacterial activity has been studied on strains from European Pharmacopoeia; Gram-positive bacterium: *Staphylococcus aureus*, two Gram-negative bacteria: *Escherichia coli* and *Pseudomonas aeruginosa* and a fungus: *Candida albicans*. Different methods have been adopted for antibacterial activity evaluation in vitro: disk diffusion and well diffusion,

bioluminescence (ATP measurements) and stall plate technique. Tests carried out showed an antibacterial activity of nanoparticles of ZnO and CuO in amorphous and crystalline form, and only in crystalline form for TiO₂. A mathematical model has been developed based on the results of the antibacterial tests and kinetic evolution of the bacterial population. It concluded that bacterial suppression is more efficient during the exponential phase, while its efficiency is lower during the stationary phase and latency. Cytotoxicity tests of NPs in suspension on gingival fibroblasts showed a decrease in cell viability, in part due to the presence of the solvent.

Keywords: Nanoparticles, CuO, ZnO, TiO₂, antibacterial activity, modelling