



**HAL**  
open science

# Source plasma pour la décontamination microbiologique des liquides

Ibtissam Courti

► **To cite this version:**

Ibtissam Courti. Source plasma pour la décontamination microbiologique des liquides. Bactériologie. Université Paul Sabatier - Toulouse III, 2023. Français. NNT : 2023TOU30174 . tel-04344963

**HAL Id: tel-04344963**

**<https://theses.hal.science/tel-04344963>**

Submitted on 14 Dec 2023

**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.



# THÈSE

En vue de l'obtention du  
**DOCTORAT DE L'UNIVERSITÉ DE TOULOUSE**  
Délivré par l'Université Toulouse 3 - Paul Sabatier

---

Présentée et soutenue par  
**Ibtissam COURTI**

Le 2 juin 2023

**Source plasma pour la décontamination microbiologique des  
liquides**

---

Ecole doctorale : **GEETS - Génie Electrique Electronique, Télécommunications et  
Santé : du système au nanosystème**

Spécialité : **Ingénierie pour la santé et pour le vivant**

Unité de recherche :  
**DPHE - Diagnostic des plasmas hors équilibre**

Thèse dirigée par  
**Philippe GUILLOT et Florent SAINCT**

Jury

**M. PIERRE-MARIE GIRARD**, Rapporteur  
**M. Thierry DUFOUR**, Rapporteur  
**Mme Marie-Pierre ROLS**, Examinatrice  
**M. Laurent MOULIN**, Examineur  
**M. Philippe GUILLOT**, Directeur de thèse  
**M. Eric ROBERT**, Président





## ***ALLOCATION DE RECHERCHE SOUTIEN AUX DOCTORANTS 2019***

Par la délibération de l'assemblée du Conseil Régional du 7 juin 2019, une subvention régionale a été attribuée à l'INU Champollion dans le cadre de la politique régionale d'aide à la recherche (ALDOCT-000767/I9008746). Cette mesure est destinée à soutenir la valorisation des connaissances et le transfert du savoir-faire au bénéfice notamment des laboratoires par la formation des jeunes doctorants.

L'objectif est de permettre à des étudiants préparant une thèse en Occitanie d'effectuer un travail de recherche dans un des établissements du site. Dans le cadre de cette thèse, le complément de financement a été apporté par l'INU Champollion.

Nous tenons à remercier la région Occitanie et l'INU Champollion de leur soutien dans le cadre de ce travail de recherche.



*“ La vie n'est facile pour aucun de nous. Mais quoi, il faut avoir de la persévérance, et surtout de la confiance en soi. Il faut croire que l'on est doué pour quelque chose, et que, cette chose, il faut l'atteindre coûte que coûte. ” Marie Curie*

*“ Le succès vient de la curiosité, de la concentration, de la persévérance et de l'autocritique. ” Albert Einstein*

*À mes grands-parents,*

*À mes parents,*

*À ma petite sœur,*

*À ma famille,*

*À mes ami(e)s,*

## *Remerciements*



La thèse est désormais défendue, il est temps d'exprimer ma gratitude envers les personnes qui ont joué un rôle essentiel dans le succès de cette aventure.

Tout d'abord, je tiens à adresser mes remerciements à M. Pierre-Marie Girard, directeur de recherche à l'Université Paris-Sud ; M. Thierry Dufour, maître de conférences à l'Université Sorbonne ; M. Éric Robert, directeur de recherche à l'Université d'Orléans ; M. Laurent Moulin, directeur de recherche à l'Eau de Paris ; et à Mme Marie-Pierre Rols, directrice de recherche à l'Université Paul Sabatier. Votre présence lors de la journée du 2 juin 2023 a été un honneur pour moi. Je vous remercie sincèrement pour l'intérêt que vous avez porté à mon travail de recherche et pour la discussion enrichissante qui a suivi ma présentation.

Je souhaite avant tout exprimer ma profonde gratitude envers mon encadrante Cristina Muja, qui m'a accompagnée tout au long de cette aventure en me prodiguant ses précieux conseils et en partageant son expertise éclairée. Je te remercie sincèrement pour le temps précieux que tu as généreusement consacré à mon égard, aussi bien sur le plan scientifique que technique. Ton soutien inestimable a été d'une valeur inestimable. Je tiens également à souligner les circonstances délicates qui ont marqué le déroulement de cette thèse, notamment en raison de la crise sanitaire liée à la Covid-19 qui a entravé notre progression. Malgré ces obstacles, tu as su me soutenir de manière exemplaire pendant ces périodes extrêmement difficiles, en m'insufflant confiance et en me considérant comme ta propre fille. Il est indéniable que sans ton travail acharné, cette thèse n'aurait jamais pu voir le jour. Je tiens à t'exprimer une fois de plus ma reconnaissance la plus profonde, du fond du cœur.

Je souhaite exprimer ma profonde gratitude envers mon encadrant Florent Saint pour la confiance dont il a fait preuve à mon égard. Lorsque j'ai intégré le laboratoire, mes connaissances en cet état captivant de la matière étaient plutôt limitées. Merci pour le temps précieux que tu m'as consacré afin de m'initier aux fondements de la physique des plasmas.

J'aimerais à présent exprimer mes sincères remerciements à mon directeur de thèse Philippe Guillot. Merci pour ta confiance et pour le temps que tu m'as consacré. Merci pour tes remarques et tes conseils, parfois durs, mais toujours constructifs. Et enfin merci pour les moments de convivialité que nous avons partagés, notamment nos discussions sur les pâtisseries et les plats de mon Maroc.

Je remercie aussi Bruno, Laurent et Juslan pour leur bonne humeur et leur bienveillance.

Je passe maintenant à la jeunesse du labo Thomas "TomTom". Par où commencer ? Devrais-je te remercier pour ton précieux soutien dans la réalisation de mes expériences ? Te remercier pour ton accompagnement lors de mes présentations ? Te remercier d'avoir consacré du temps à la lecture de ce manuscrit de thèse ? Te remercier d'avoir patiemment corrigé mes innombrables lettres de motivation ? Ou tout simplement te remercier d'être la personne extraordinaire que tu es ? Merci pour ta confiance en moi, ta gentillesse et ton humeur magnifique.

Aux anciens doctorants, Manon ! Cette biologiste qui a fait une entrée remarquée dans votre bureau de physiciens est devenue docteure. Mais ce n'est pas tout ! Elle a également progressé et évolué grâce à des personnes comme toi. Merci pour ton aide précieuse, ton énergie et ton savoir-faire que tu as su me transmettre. Je te remercie du fond du cœur pour toutes ces fois où tu m'as appelée, même quand nos conversations duraient jusqu'à ce que nos téléphones nous lâchent, et de prendre de mes nouvelles, surtout pendant les moments difficiles de rédaction. Je souhaite également exprimer ma chaleureuse gratitude envers Ludo, Laurent et Fatima pour les précieux moments que j'ai pu partager avec eux.

Aux petits mignons doctorants, Tatiana ! Un gros merci pour tous nos délires au bureau, nos soirées Netflix et les tonnes de glaces qu'on s'est enfilées ensemble. Je suis vraiment reconnaissante pour ton soutien de folie et pour l'ambiance trop cool que t'as créée au labo, ambiance à la libanaise ! Et à toi, petit Pierre, "Ohhhh trop marrant", merci pour ton amour inconditionnel aux pizzas chèvre-miel. Ta spontanéité de vivre, c'est juste génial. Sérieux, je n'aurais jamais cru qu'on aurait une demi-finale de la Coupe du Monde Maroc - France. Ce match, ça va rester gravé dans ma caboche (surtout le penalty pour le Maroc ^^, désolé, je ne peux pas m'en passer). Et à Abdoul, le gars le plus zen du bureau des doctorants, un grand merci pour toutes les fois où je t'ai demandé un coup de main et où tu l'as fait avec plaisir. Et je suis trop ravie de continuer cette aventure avec toi chez Lab'Science. Merci à vous trois pour les super moments que nous avons passés ensemble.

Aux doctorants de l'équipe BTSB, Steven ! Mon premier coloc de toute l'histoire. Merci pour ton enthousiasme et ta bonne humeur. Merci pour tes conseils, ton aide et ton soutien moral dans les moments parfois difficiles. Merci également à Valentine, Lucie, Lucia, Stéphanie, Caroline et Guillaume pour tous les bons moments passés ensemble.

Je souhaite exprimer ma profonde gratitude envers Sébastien Allix. La première personne à me faire confiance en me donnant l'opportunité de quitter mon pays pour venir en France, tout d'abord pour mon stage de M2, puis pour décrocher ce poste de doctorat. Notre collaboration a débuté en 2018 et perdure depuis lors. Ta confiance en moi a été déterminante dans mon parcours.

À ma famille !

Je tiens à exprimer ma profonde gratitude envers ma chère grand-mère, « Lalla Fatima Touhami Kadiri », cette femme qui a été une source inestimable de bénédictions dans ma vie. J'aurais tellement souhaité que tu sois encore parmi nous pour voir comment j'ai grandi. Ton amour inconditionnel et ta sagesse m'ont guidée et ont contribué à façonner la personne que je suis aujourd'hui. Même si tu n'es plus physiquement présente, ton héritage continue de m'inspirer et de me guider. Du fond du cœur, Milalla, je te remercie pour tout ce que tu as apporté à ma vie.

À mon père ! L'homme qui a su m'apporter ses nobles valeurs de vie et qui a été un guide inestimable dans mon cheminement personnel. Je tiens à t'exprimer ma plus profonde gratitude pour ton amour inconditionnel, ta sagesse

inspirante et ta bienveillance constante. Tu m'as transmis des principes moraux solides et m'as enseigné l'importance de l'intégrité, de la persévérance et de l'empathie. Grâce à toi, j'ai acquis des fondations solides qui ont façonné ma personnalité et m'ont permis de grandir en tant qu'individu responsable et respectueux.

À ma mère ! Mon pilier inébranlable, ma source d'existence, celle qui est mon oxygène même. Je souhaite exprimer toute ma gratitude envers toi pour ta présence constante et ton amour infini. Tu es celle qui m'a donné la vie, qui m'a nourrie et qui m'a façonnée en tant qu'individu. Chaque jour, tu m'inspires par ta bienveillance, ta sagesse et ta capacité à surmonter les obstacles avec grâce. Tu es mon roc, ma confidente et mon soutien dans les moments les plus difficiles.

À ma chère petite sœur Zainab ! Ma moitié indissociable, celle qui est à la fois mon délire et mon réconfort. Merci pour tous les moments de complicité et de folie que nous avons partagés. Ta présence illumine ma vie et ton soutien inconditionnel m'apporte force et réconfort dans les moments difficiles.

À toute la famille de Courti, Echchoayebi, Touhami et El Allaoui, je souhaite vous exprimer ma profonde gratitude à chaque personne ayant fait confiance en moi.

À Zoubida et Fatiha ! Mes chères et fidèles amies, je tiens à vous exprimer ma profonde gratitude pour ces 12 années d'amitié inestimable. Depuis si longtemps, vous êtes à mes côtés, traversant avec moi les hauts et les bas de la vie. Votre présence constante, votre soutien et votre amitié sincère ont été des piliers essentiels dans ma vie.

À Yazan ! Mon petit frère que ma mère ne m'a pas donné. Merci pour tout tes conseils et tes encouragements.

À Yassine ! Merci pour ta précieuse compagnie et pour tous les moments de bonne humeur que nous partageons.

*Résumé / Abstract*

## Résumé

De nos jours, la sécurité sanitaire est au centre des préoccupations des acteurs socio-économiques. L'un des problèmes sanitaires émergents est la libération de bactéries pathogènes et résistantes aux antibiotiques dans l'environnement aquatique. Les décharges plasma à la pression atmosphérique sont d'un grand intérêt pour de nombreuses applications. L'une de ces applications est la décontamination microbiologique des liquides. Les travaux développés dans cette thèse participent à mieux appréhender l'intérêt du plasma pour la décontamination microbiologique de liquides et pour la dégradation des gènes de résistance aux antibiotiques.

La source utilisée est un multi-jets plasma généré à partir d'un mélange gazeux hélium-oxygène à la pression atmosphérique. Différents diagnostics ont été réalisés pour la caractérisation de la décharge plasma. Les mesures de courant et de tension réalisées nous ont permis de déterminer l'énergie du plasma. La spectroscopie d'émission optique mise en œuvre nous a permis de mettre en évidence et d'identifier les espèces réactives de l'oxygène et de l'azote (RONS) dans le plasma. La création de RONS tels que le peroxyde d'hydrogène, les nitrites et les nitrates dans le liquide modifie la chimie du liquide. Dans ce contexte, nous avons quantifié la production de ces espèces dans le liquide.

L'interaction plasma-bactérie pour la décontamination microbiologique des liquides a été évaluée à travers trois études distinctes. La première consiste à comprendre l'influence de la phase de croissance des bactéries sur l'efficacité du procédé de décontamination par plasma. Nous avons montré que les bactéries en phase exponentielle sont plus sensibles au traitement plasma que les bactéries issues de la phase stationnaire. De plus, les cellules en phase exponentielle sont plus susceptibles de réduire leur activité métabolique en passant à l'état de bactéries viables mais non-cultivables (VBNC) après un court temps d'exposition au plasma, tandis que celles en phase stationnaire acceptent un temps plus long d'exposition au plasma avant d'entrer dans cet état. Pour mieux appréhender les raisons qui peuvent expliquer ces différences, nous avons évalué l'effet du plasma sur l'intégrité de la membrane cellulaire et de l'ADN. Dans la seconde étude, nous avons évalué l'effet de la présence du plasmide sur la sensibilité des bactéries au traitement par plasma. Cette étude a révélé que les bactéries portant un plasmide sont plus sensibles au plasma que celles qui en sont dépourvues. Les bactéries soumises à une intégration de plasmide ont subi plus de dommages membranaires et un taux de ROS intracellulaires plus élevé après exposition au plasma. Nous suggérons que la présence de plasmides présente des inconvénients pour les bactéries en diminuant leur croissance et en imposant un état d'affaiblissement. La dernière étude consiste à évaluer l'effet du plasma sur la dégradation des gènes de résistance aux antibiotiques et sur la réduction des mécanismes de transfert horizontal des gènes (HGT) entre les bactéries donneuses traitées par plasma et celles réceptrices non traitées par plasma. Nous avons démontré que le plasma réduit le nombre de cellules donneuses, ce qui diminue par conséquent la fréquence de transfert conjugal. Nous avons également conclu que le transfert de plasmides pourrait se produire chez les bactéries VBNC. Toutefois, la prolongation du temps d'exposition entraîne une inhibition de HGT.

Le plasma semble être une solution pour la décontamination des liquides et la dégradation des gènes de résistance aux antibiotiques. Il serait donc pertinent de réaliser des études intégrant des conditions qui se rapprochent de l'environnement réel avec la présence de matière organique et en augmentant le volume du liquide traité.

**Mots clés :** Plasma à pression atmosphérique – Décontamination des liquides – Bactéries – Gènes de résistances aux antibiotiques.

## Abstract

Nowadays, health safety is a central concern for socio-economic actors. One of the emerging health problems is the release of pathogenic and antibiotic-resistant bacteria into the aquatic environment. Plasma discharges at atmospheric pressure are of great interest for many applications. One of these applications is the microbiological decontamination of liquids. The work developed in this thesis contributes to a better understanding of the potential of plasma for the microbiological decontamination of liquids and for the degradation of antibiotic resistance genes.

The source used is a multi-jet plasma generated from a helium-oxygen gas mixture at atmospheric pressure. Various diagnostics were performed to characterize the plasma discharge. The current and voltage measurements carried out allowed us to determine the energy of the plasma. Optical emission spectroscopy was used to highlight and identify the reactive oxygen and nitrogen species (RONS) in the plasma. The creation of RONS, such as hydrogen peroxide, nitrites, and nitrates, in the liquid modifies the chemistry of the liquid. In this context, we quantified the production of these species in the liquid.

The interaction between plasma and bacteria for the microbiological decontamination of liquids was evaluated through three separate studies. The first study aims to understand the influence of the growth phase of the bacteria on the efficiency of the plasma decontamination process. We demonstrated that bacteria in the exponential phase were more sensitive to plasma treatment compared to bacteria from the stationary phase. In addition, bacteria in the exponential phase were more likely to reduce their metabolic activity by entering the viable but non-cultivable (VBNC) state after a short exposure to plasma, whereas those in the stationary phase required a longer exposure to plasma before entering this state. To better understand the reasons for these differences, we assessed the effect of plasma on cell membrane and DNA integrity. In the second study, we evaluated the effect of the presence of the plasmid on the sensitivity of the bacteria to plasma treatment. This study revealed that bacteria carrying a plasmid were more susceptible to plasma than those without. Plasmid-integrated bacteria showed more membrane damage and higher intracellular ROS levels after exposure to plasma. We suggest that the presence of plasmids presents disadvantages to the bacteria by reducing their growth and imposing a weakened state. The final study evaluates the effect of plasma on the degradation of antibiotic resistance genes and the reduction of horizontal gene transfer (HGT) mechanisms between plasma-treated donor bacteria and non-plasma-treated recipient bacteria. We demonstrated that plasma reduces the number of donor cells and, consequently, reduces the frequency of conjugative transfer. Furthermore, we deduced that plasmid transfer could also occur in VBNC bacteria. However, prolonging the exposure time leads to an inhibition of HGT.

Plasma appears to be a solution for the decontamination of fluids and the degradation of antibiotic resistance genes. It would be relevant to conduct studies incorporating conditions that approximate the real environment, with the presence of organic matter and by increasing the volume of the treatment liquid.

**Keywords:** Atmospheric pressure plasma - Liquid decontamination - Bacteria - Antibiotic resistance genes.

## *Publications*

## Revue Internationale

- Degradation of Bacterial Antibiotic Resistance Genes during Exposure to Non-Thermal Atmospheric Pressure Plasma- DOI: 10.3390/antibiotics11060747  
Ibtissam Courti, Cristina Muja, Thomas Maho, Florent P. Sainct, Philippe Guillot  
Journal Antibiotics, 2022 May 31; 11(6):747
- Impact of Bacterial Growth Phase on Liquid Decontamination Efficiency Using Atmospheric Pressure Plasma - DOI: 10.1615/PlasmaMed.2022041486  
Ibtissam Courti, Cristina Muja, Thomas Maho, Florent P. Sainct, Philippe Guillot  
Journal Plasma medicine, Volume 11, Issue 4, 2021, pp. 85-104

## Conférences Internationales

- Plasma for microbiological decontamination of liquids - Oral  
Ibtissam Courti, Cristina Muja, Thomas Maho, Florent P. Sainct, Philippe Guillot  
9<sup>ème</sup> Conférence Internationale de Plasma Médecine 27-1 Juillet 2022, Utrecht (Pays-Bas)
- Impact of Bacterial Growth Phase on Liquid Decontamination Efficiency Using Atmospheric Pressure Plasma - Poster  
Ibtissam Courti, Cristina Muja, Thomas Maho, Florent P. Sainct, Philippe Guillot  
8<sup>ème</sup> Conférence Internationale de Plasma Médecine 3-6 Aout 2021, en ligne (Corée du Sud)

## Conférences nationales

- The potential of cold plasma technology in the reduction of horizontal genes transfer - Oral  
Ibtissam Courti, Cristina Muja, Thomas Maho, Florent P. Sainct, Philippe Guillot  
Congrès de la Société Française de microbiologie 3-5 Octobre 2022, Montpellier (France)
- Décontamination microbiologie des liquides par plasma - Oral  
Ibtissam Courti, Cristina Muja, Thomas Maho, Florent P. Sainct, Philippe Guillot  
Congrès de l'école doctorale GEETS 14 Avril 2022, Toulouse (France)



- Influence des caractéristiques physiologiques bactériennes sur la décontamination des liquides par plasma - Oral  
Ibtissam Courti, Cristina Muja, Thomas Maho, Florent P. Saint, Philippe Guillot  
Colloque GdR HappyBio 24-16 Novembre 2021, Toulouse (France)
- Influence de l'agitation sur la décontamination des liquides par plasma - Poster  
Ibtissam Courti, Cristina Muja, Thomas Maho, Florent P. Saint, Philippe Guillot  
Colloque Plasma-Liquide Interaction 5-8 Juillet 2021, Toulouse (France)
- Influence de l'agitation sur la production des espèces réactives lors de la décontamination des liquides par plasma - Oral  
Ibtissam Courti, Cristina Muja, Thomas Maho, Florent P. Saint, Philippe Guillot  
Colloque GdR HappyBio 12-14 Novembre 2020, en ligne (France)

## **Prix**

- Lauréate de la meilleure publication dans la catégorie des doctorants (Best Student Paper Award) à la Conférence Internationale de Plasma Médecine (ICPM 8) en Corée du Sud en août 2021.

## *Abréviations*

ADN	Acide désoxyribonucléique
AGPI	Acides gras polyinsaturés
AMPc	Adénosine monophosphate cyclique
AOP	Procédés d'oxydation avancés
ARB	Bactéries résistante aux antibiotiques
ARGs	Gènes de résistance aux antibiotiques
ARN	Acide ribonucléique
ATP	Adénosine triphosphate
CAT	Catalase
CMI	Concentration minimale inhibitrice
DBD	Décharge à barrière diélectrique
DMSO	Diméthylsulfoxyde
EMG	Élément génétique mobile
GASP	Avantage de croissance en phase stationnaire
HGT	Transfert horizontal de gènes
JPPA	Jets plasma à pression atmosphérique
MDA	Malondialdéhyde
OMD	Objectifs du millénaire pour le développement
OMS	Organisation mondiale de la Santé
PE	Phosphatidyléthanolamines
PG	Phosphatidylglycérols
PS	Phosphatidylsérines
RNS	Espèce réactive de l'azote
RONS	Espèce réactive de l'oxygène et de l'azote
ROS	Espèce réactive de l'oxygène
SARM	Staphylococcus aureus résistant à la méticilline
SCDI	Inhibition dépendante du contact en phase stationnaire
SOD	Superoxyde dismutase
Te	Température des électrons
Tg	Température du gaz
Ti	Température des ions
UNICEF	Fonds des nations unies pour l'enfance
VBNC	Bactéries viables non cultivables

## *Table de matières*

<b>Remerciements</b> .....	<b>6</b>
<b>Résumé / Abstract</b> .....	<b>10</b>
<b>Publications</b> .....	<b>13</b>
<b>Abréviations</b> .....	<b>16</b>
<b>Table de matières</b> .....	<b>18</b>
<b>Table de figures et de tableaux</b> .....	<b>24</b>
<b>Introduction générale</b> .....	<b>30</b>
<b>Chapitre I : Synthèse bibliographique</b> .....	<b>35</b>
1. Les entérobactéries.....	35
1.1. L'espèce bactérienne de <i>Escherichia coli</i> .....	37
1.1.1. Structure cellulaire.....	37
1.1.2. Croissance cellulaire.....	39
1.1.3. Pouvoir pathogène.....	40
1.1.4. Mécanismes d'adaptation.....	41
1.1.4.1. Adaptations morphologiques et moléculaires.....	41
1.1.4.2. Adaptations physiologique.....	44
1.1.4.3. Adaptations transcriptomiques.....	46
2. Les entérobactéries support de l'antibiorésistance.....	48
2.1. Support génétique de l'antibiorésistance.....	49
2.1.1. Résistance endogène par mutation chromosomique.....	49
2.1.2. Résistance exogène par transfert horizontal des gènes.....	49
2.1.2.1. Eléments génétiques mobiles.....	50
2.1.2.2. Mécanismes de transfert horizontal des gènes.....	52
2.2. Diversité des entérobactéries résistantes aux antibiotiques dans l'environnement aquatique.....	54
3. Plasma non-thermique à la pression atmosphérique.....	57
3.1. Propriétés fondamentales du plasma.....	57
3.1.1. Degré d'ionisation.....	57
3.1.2. Température.....	58
3.2. Génération d'un plasma.....	58
3.3. Source de plasma non-thermique à la pression atmosphérique.....	58
3.3.1. Décharges à barrières diélectriques.....	59
3.3.2. Jets plasma.....	60
3.4. Interactions plasma-liquide.....	61
3.4.1. Espèces réactives de l'oxygène.....	62

3.4.2.	Espèces réactives de l'azote .....	63
3.5.	Classification des décharges plasma en interaction avec le liquide .....	65
4.	Plasma non-thermique à la pression atmosphérique pour la décontamination .....	67
4.1.	Dommmages cellulaires des RONS.....	68
4.1.1.	Dommmages engendrés sur la paroi .....	69
4.1.2.	Dommmages engendrés aux protéines et effet sur l'activité enzymatique .....	70
4.1.3.	Dommmages engendrés aux acides nucléiques .....	71
4.2.	Réponses cellulaires contre le stress oxydant .....	71
4.2.1.	Réponses enzymatiques .....	72
4.2.2.	Réponses transcriptomiques .....	73
5.	Plasma non-thermique à la pression atmosphérique pour la dégradation des gènes de résistances aux antibiotiques.....	75
5.1.	Procédés d'oxydation avancés (AOP).....	75
a)	AOP à l'échelle laboratoire .....	76
b)	AOP à l'échelle pilote.....	77
c)	AOP à l'échelle réelle .....	78
5.2.	Alternative plasma pour le traitement des eaux .....	79
5.3.	Position du plasma dans le traitement des eaux .....	80
<b>Conclusion.....</b>		<b>83</b>
<b>Chapitre II : Matériel &amp; Méthodes .....</b>		<b>86</b>
1.	Caractérisation physique du plasma.....	87
1.1.	Configuration de la décharge plasma .....	87
1.2.	Alimentation électrique du multi-jets plasma .....	88
1.3.	Liquide en interaction avec le multi-jets plasma.....	89
1.4.	Diagnostics du multi-jets plasma.....	89
1.5.	Diagnostic électrique.....	90
1.5.1.	Mesure des signaux de tension et de courant .....	90
1.5.2.	Mesure de la puissance et de l'énergie .....	91
1.6.	Diagnostic optique.....	93
1.6.1.	Spectroscopie d'émission optique : principe physique.....	93
1.6.2.	Protocole expérimental .....	94
2.	Caractérisation chimique du liquide.....	95
2.1.	Mesures de la température et du pH .....	95
2.2.	Spectroscopie d'absorption UV-visible : principe physique.....	95
2.2.1.	Mesure du peroxyde d'hydrogène .....	96

2.2.2.	Mesure du nitrite et nitrate .....	96
3.	Caractérisation des effets du plasma sur les bactéries.....	97
3.1.	Souches de bactérie et plasmide .....	97
a)	<i>E. coli</i> K-12 MG1655.....	97
b)	<i>E. coli</i> DH5 $\alpha$ .....	97
c)	<i>E. coli</i> HT-99.....	97
d)	<i>E. coli</i> J-53R.....	98
e)	Vecteur pUC19.....	98
3.2.	Composition des milieux cultures .....	98
3.3.	Conditions de conservation .....	99
3.4.	Etude 1 : Influence de la phase de croissance sur l'efficacité de la décontamination des liquides .....	99
3.4.1.	Cinétique de croissance de <i>E. coli</i> K-12 sur milieu non restrictif.....	99
3.4.2.	Cinétique de croissance de <i>E. coli</i> K-12 sur milieu restrictif.....	100
3.4.3.	Préparation de la suspension bactérienne .....	101
3.4.4.	Evaluation de la viabilité bactérienne.....	101
3.4.4.1.	Viabilité sur milieu de culture solide.....	101
3.4.4.2.	Activité métabolique .....	102
3.4.4.3.	Intégrité membranaire .....	103
3.4.4.4.	Taux des ROS intracellulaires.....	103
3.4.5.	Evaluation de l'intégrité de l'ADN génomique.....	104
3.5.	Etude 2 : Effet du plasma sur l'inactivation des ARB et l'inhibition des HGT.....	104
3.5.1.	Transformation bactérienne de <i>E. coli</i> DH5 $\alpha$ .....	104
3.5.2.	Cinétique de croissance de <i>E. coli</i> DH5 $\alpha$ sur milieu restrictif.....	105
3.5.3.	Préparation des suspensions de DH5 $\alpha$ , DH5 $\alpha$ (ampR), HT-99 et J-53R.....	105
3.5.4.	Evaluation de la viabilité bactérienne.....	106
3.5.5.	Evaluation de l'activité enzymatique.....	106
3.5.5.1.	Extraction des protéines .....	106
3.5.5.2.	Quantification de la SOD .....	106
3.5.5.3.	Quantification de la CAT.....	107
3.5.6.	Evaluation de la concentration minimale inhibitrice (CMI) .....	108
3.5.7.	Evaluation de la fréquence de HGT .....	108
4.	Analyse statistique .....	109

<b>Chapitre III : Chimie des Interaction Plasma-Liquide</b> .....	<b>111</b>
1. Etude des espèces réactives émissives en phase gazeuse .....	112
1.1. Spectre optique des émissions du jet plasma.....	112
1.2. Intensité des espèces réactives le long du jet plasma .....	113
1.3. Température du gaz .....	115
2. Etude des espèces réactives en phase liquide.....	117
2.1. Evaluation de la température et du pH.....	117
2.2. Quantification du peroxyde d'hydrogène.....	119
2.3. Quantification des nitrite et nitrate.....	121
<b>Conclusion</b> .....	<b>123</b>
<b>Chapitre IV : Influence de la Phase de Croissance Bactérienne sur la Décontamination Microbiologique des Liquides par Plasma</b> .....	<b>126</b>
1. Etude de la viabilité bactérienne .....	127
1.1. Influence de la phase de croissance bactérienne sur la réduction bactérienne .....	127
1.2. Influence de la phase de croissance sur l'apparition des lésions sous létale .....	129
2. Etude des caractéristiques physiologiques .....	131
2.1. Influence de la phase de croissance sur l'activité métabolique .....	131
2.2. Influence de la phase de croissance sur l'entrée des bactéries à l'état VBNC .....	132
3. Etude des caractéristiques morphologiques et moléculaires .....	135
3.1. Influence de la phase de croissance sur l'intégrité membranaire .....	135
3.2. Influence de la phase de croissance sur l'accumulation des ROS intracellulaires .....	137
3.3. Influence de la phase de croissance sur l'intégrité de l'ADN .....	139
<b>Conclusion</b> .....	<b>142</b>
<b>Chapitre V : Effets du plasma sur l'inactivation des bactéries résistantes aux antibiotiques et sur l'inhibition des mécanismes de transfert horizontal de gènes</b> .....	<b>144</b>
1. Effet du plasma sur les ARB.....	146
1.1. Influence de la présence de plasmide sur la viabilité bactérienne.....	146
1.2. Influence de la présence de plasmide sur l'apparition des lésions sous létales.....	148
1.3. Influence de la présence de plasmide sur la physiologie bactérienne .....	149
1.4. Influence de la présence de plasmide sur l'intégrité membranaire .....	152
1.5. Effet du plasma sur la réponse au stress oxydatif.....	154
2. Effet du plasma sur les mécanismes de HGT .....	156
2.1. Effet du plasma sur la concentration minimale inhibitrice de HT-99 .....	156
2.2. Effet du plasma sur le transfert conjugatif de HT-99 .....	157
2.3. Relation entre les bactéries VBNC et les mécanismes de HGT .....	160
<b>Conclusion</b> .....	<b>161</b>



<b>Conclusion &amp; Perspectives .....</b>	<b>163</b>
Chimie des interactions plasma-liquide.....	164
Influence de la phase de croissance bactérienne sur la décontamination microbiologie des liquides par plasma .....	164
Effets du plasma sur l'inactivation des bactéries résistantes aux antibiotiques et sur l'inhibition des mécanismes de transfert horizontal de gènes.....	165
Perspectives.....	166
<b>Références Bibliographiques .....</b>	<b>167</b>

## *Table de figures et de tableaux*

Figure 1 Photographie et structure cellulaire de Escherichia coli, adaptée de (Scheutz et al. 2015), (Bertrand et al. 2015). .....	38
Figure 2 La courbe de croissance d'une culture bactérienne, adaptée de Bacterial Growth Curve, BioRender.com (2022), extrait de <a href="https://app.biorender.com/illustrations/638743578a2ca47c1e4258ef">https://app.biorender.com/illustrations/638743578a2ca47c1e4258ef</a> .....	39
Figure 3 Comparaison structurelle et moléculaire des cellules en : a) phase exponentielle et b) phase stationnaire, adaptée de ((Jaishankar et Srivastava 2017) et BioRendre .com (2022))......	43
Figure 4 Phases de croissance bactérienne. Cellules d'Escherichia coli se développant dans des conditions de laboratoire optimales, milieu riche, à 37°C avec aérobie. 1, phase de latence ; 2, phase exponentielle ; 3, phase stationnaire ; 4, phase de déclin ; 5, phase stationnaire à long terme. Les lignes colorées en pointillés représentent la croissance continue et la prédominance des différents mutants qui apparaissent au sein d'une population en phase stationnaire prolongée (cycles VBNS, GASP et SCIDI), adaptée de ((Navarro et al. 2010)). .....	44
Figure 5 Structure de l'ARN polymérase : a) réaction de formation de l'holoenzyme, b) structure de l'ARN polymérase ( $\alpha_2\beta\beta'\omega$ )facteur « $\sigma_{38}$ » de E. coli, adaptée de (Chen et al. 2017)......	48
Figure 6 Éléments génétiques mobiles (MGE) : les transposons, les intégrons et les plasmides sont les principaux moteurs de la propagation de la résistance aux antimicrobiens chez de nombreuses bactéries, adaptée de (Rozwadowski et Gawel 2022). .....	51
Figure 7 Les mécanismes de HGT : a) conjugaison, b) transformation, c) transduction, adaptée de Conjugaison, Transformation, Transduction, adaptée de (Zaneveld et al. 2008), (Dodd 2012), (von Wintersdorff et al. 2016)......	53
Figure 8 Les états de la matière, adaptée de (Misra et al. 2016). .....	57
Figure 9 Les diverses configurations des décharges DBD : a), b) et c) plan-plan, d) cylindrique, adaptée (Wagner et al. 2003)......	60
Figure 10 les diverses configurations JPPA : a) jet avec deux électrodes annulaires, b) jet avec une seule électrode annulaire, c) jet avec une électrode à broche et une électrode annulaire, d) jet avec deux électrodes annulaires fixées à la surface de deux disques diélectriques perforés au centre, adaptée de (Lu et al. 2012)......	61
Figure 11 Les diverses espèces réactives formées dans la phase gazeuse, l'interface plasma liquide et dans le liquide, adaptée (Bruggeman et al. 2016). .....	62
Figure 12 Les trois groupes de génération de plasma dans le liquide, a) décharges produites dans la phase gazeuse en contact avec la surface de liquide, b) décharges produites directement dans le liquide, c) décharges qui sont créés dans des bulles dans le liquide, adaptée de (Bruggeman et Leys 2009). .....	67
Figure 13 Les mécanismes des dommages causés par les ROS aux cellules bactériennes, adaptée de Round Membrane Cell, Biorendre.com (2022). .....	69
Figure 14 Les mécanismes d'action de la SOD et la CAT sur les ROS intracellulaires, adaptée de BioRendre.com (2022). .....	73
Figure 15 Les mécanismes des régulateurs OxyR et SoxRS, adaptée de (Bessaiah et al. 2021) et de BioRendre.com (2022). .....	74
Figure 16 Classification des différents AOP en fonction de leur niveau de maturation technologique, adoptée (B. Miklos et al. 2018)......	76
Figure 17 Représentation schématique de la source plasma multi-jets.....	88
Figure 18 Représentation schématique du montage expérimental avec les différents outils de diagnostic électrique et optique. ....	90
Figure 19 Profils de tension et de courant mesurés aux bornes de la décharge plasma. ....	91

Figure 20 Mesure du décalage temporel, a) signaux non synchronisés, b) signaux synchronisés. ....	92
Figure 21 Comparaison de l'énergie dissipée sans et avec décharge sur le front montant de l'impulsion. Energie avec plasma (noir), énergie de la décharge plasma (bleu), et énergie sans plasma (rouge). ....	92
Figure 22 Représentation schématique du principe de la spectroscopie d'émission optique .....	93
Figure 23 Représentation schématique du principe de fonctionnement d'un spectromètre d'émission optique, adapté de (Douat 2014).....	94
Figure 24 Représentation schématique du montage optique.....	95
Figure 25 Cinétique de croissance de E. coli K-12 sur milieu non restrictif avec les trois phases de croissance distinctes.....	100
Figure 26 Cinétique de croissance de E. coli K-12 sur milieu restrictif. ....	101
Figure 27 Cinétique de croissance de E. coli DH5 $\alpha$ sur milieu restrictif. ....	105
Figure 28 Spectre d'émission du jet plasma en interaction avec la surface du liquide en position Z=Y=0 mm ; (a) domaine UV, (b) domaine visible. Le plasma est généré à une tension de 6kV, des impulsions de 2,5 $\mu$ s, une fréquence de 20kHz et un débit He/0,2% O <sub>2</sub> de 2 L.min <sup>-1</sup> . ....	113
Figure 29 Distribution de l'intensité des espèces réactives le long d'un seul jet plasma ; a) espèces de l'air ambiant, b) espèces du gaz. Le plasma est généré à une tension de 6kV, des impulsions de 2,5 $\mu$ s, une fréquence de 20kHz et un débit He/0,2% O <sub>2</sub> de 2 L.min <sup>-1</sup> . ....	114
Figure 30 Spectres de T <sub>vib</sub> simulés avec le logiciel SPECAIR de la transition C <sup>3</sup> Pu → B <sup>3</sup> Pg , pour une T <sub>rot</sub> de 375 K, et des T <sub>vib</sub> de 5000, 6000 et 7000 K, entre 370 et 377 nm. Le plasma est généré à une tension de 6kV, des impulsions de 2,5 $\mu$ s, une fréquence de 20kHz et un débit He/0,2% O <sub>2</sub> de 2 L.min <sup>-1</sup> . ....	116
Figure 31 Spectres de T <sub>rot</sub> simulés avec le logiciel SPECAIR de la transition C <sup>3</sup> Pu → B <sup>3</sup> Pg , pour une T <sub>vit</sub> de 6000K, et des T <sub>rot</sub> de 275, 375 et 474K, entre 376 et 382 nm. Le plasma est généré à une tension de 6kV, des impulsions de 2,5 $\mu$ s, une fréquence de 20kHz et un débit He/0,2% O <sub>2</sub> de 2 L.min <sup>-1</sup> . ....	117
Figure 32 Evolution de la température et du pH de la solution saline en fonction du temps d'exposition aux multi-jets plasma. Cible traitée eau ultra-pure, volume 100 mL. Le plasma est généré à une tension de 6kV, des impulsions de 2,5 $\mu$ s, une fréquence de 20kHz et un débit He/0,2% O <sub>2</sub> de 2 L.min <sup>-1</sup> . ....	118
Figure 33 Evolution de la concentration du peroxyde d'hydrogène de la solution saline en fonction du temps d'exposition aux multi-jets plasma. Cible traitée eau ultra-pure, volume 100 mL. Le plasma est généré à une tension de 6kV, des impulsions de 2,5 $\mu$ s, une fréquence de 20kHz et un débit He/0,2% O <sub>2</sub> de 2 L.min <sup>-1</sup> . ....	119
Figure 34 Evolution de la concentration des nitrites et nitrates de la solution saline en fonction du temps d'exposition aux multi-jets plasma. Cible traitée eau ultra-pure, volume 100 mL. Le plasma est généré à une tension de 6kV, des impulsions de 2,5 $\mu$ s, une fréquence de 20kHz et un débit He/0,2% O <sub>2</sub> de 2 L.min <sup>-1</sup> . ....	121
Figure 35 Réduction de la survie de E. coli K-12 en phase exponentielle et stationnaire après exposition au plasma. Cible traitée solution saline à 0,9 %, volume 100 mL. Le plasma est généré à une tension de 6kV, des impulsions de 2,5 $\mu$ s, une fréquence de 20kHz et un débit He/0,2% O <sub>2</sub> de 2 L.min <sup>-1</sup> . ....	128
Figure 36 Réduction de la survie E. coli K-12 en (a) phase exponentielle et (b) stationnaire sur TSA et TSA supplémenté par NaCl à 3%, après exposition au plasma. La zone rayée correspond à la population de bactéries avec des lésions sous-létales. Cible traitée solution saline à 0,9 %, volume	

100 mL. Le plasma est généré à une tension de 6kV, des impulsions de 2,5 $\mu$ s, une fréquence de 20kHz et un débit He/0,2% O<sub>2</sub> de 2 L.min<sup>-1</sup>. .....130

Figure 37 Réduction de l'activité métabolique des bactéries en phase exponentielle et stationnaire après exposition au plasma. Cible traitée solution saline à 0,9 %, volume 100 mL. Le plasma est généré à une tension de 6kV, des impulsions de 2,5 $\mu$ s, une fréquence de 20kHz et un débit He/0,2% O<sub>2</sub> de 2 L.min<sup>-1</sup>. .....132

Figure 38 Comparaison de la viabilité bactérienne estimée par dénombrement sur TSA et celle estimée l'activité métabolique, pour les bactéries des deux phases de croissances (a) exponentielle et (b) stationnaire. La zone rayée correspond à la population de bactéries à l'état VBNC. Cible traitée solution saline à 0,9 %, volume 100 mL. Le plasma est généré à une tension de 6kV, des impulsions de 2,5 $\mu$ s, une fréquence de 20kHz et un débit He/0,2% O<sub>2</sub> de 2 L.min<sup>-1</sup>. .....133

Figure 39 Comparaison de l'intégrité membranaire des bactéries des deux phases de croissance exponentielle et stationnaire. Cible traitée solution saline à 0,9 %, volume 100 mL. Le plasma est généré à une tension de 6kV, des impulsions de 2,5 $\mu$ s, une fréquence de 20kHz et un débit He/0,2% O<sub>2</sub> de 2 L.min<sup>-1</sup>. .....136

Figure 40 Taux de ROS intracellulaire des bactéries des deux phases de croissance, exponentielle et stationnaire, après exposition au plasma. Cible traitée solution saline à 0,9 %, volume 100 mL. Le plasma est généré à une tension de 6kV, des impulsions de 2,5 $\mu$ s, une fréquence de 20kHz et un débit He/0,2% O<sub>2</sub> de 2 L.min<sup>-1</sup>. .....138

Figure 41 Suivi de la dégradation de l'ADN génomique pour les bactéries en phase exponentielle et stationnaire après exposition au plasma, a) image du gel d'agarose, b) intensité des bandes calculé à partir du gel avec le logiciel ImageJ. Cible traitée solution saline à 0,9 %, volume 100 mL. Le plasma est généré à une tension de 6kV, des impulsions de 2,5 $\mu$ s, une fréquence de 20kHz et un débit He/0,2% O<sub>2</sub> de 2 L.min<sup>-1</sup>. .....140

Figure 42 Réduction de E. coli après exposition au plasma : a) DH5 $\alpha$  et DH5 $\alpha$  + pUC19, b) HT-99 et J-53R. Cible traitée solution saline à 0,9 %, volume 100 mL. Le plasma est généré à une tension de 6kV, des impulsions de 2,5 $\mu$ s, une fréquence de 20kHz et un débit He/0,2% O<sub>2</sub> de 2 L.min<sup>-1</sup>. .....147

Figure 43 Réduction de la survie de DH5 $\alpha$  et DH5 $\alpha$  + pUC19 LBA et LBA supplémentée par NaCl à 1%, après exposition au plasma. La zone rayée correspond à la population de bactéries avec des lésions sous-létales. Cible traitée solution saline à 0,9 %, volume 100 mL. Le plasma est généré à une tension de 6kV, des impulsions de 2,5 $\mu$ s, une fréquence de 20kHz et un débit He/0,2% O<sub>2</sub> de 2 L.min<sup>-1</sup>. .....149

Figure 44 Réduction de l'activité métabolique après exposition au plasma : a) DH5 $\alpha$  et DH5 $\alpha$  + pUC19, b) HT-99 et J-53R Cible traitée solution saline à 0,9 %, volume 100 mL. Le plasma est généré à une tension de 6kV, des impulsions de 2,5 $\mu$ s, une fréquence de 20kHz et un débit He/0,2% O<sub>2</sub> de 2 L.min<sup>-1</sup>. .....150

Figure 45 Comparaison de la viabilité bactérienne estimée par dénombrement sur milieux gélose et celle estimée l'activité métabolique après exposition au plasma : a) DH5 $\alpha$ , b) DH5 $\alpha$  + pUC19, c) J-53R et d) HT-99. La zone rayée correspond à la population de bactéries à l'état VBNC. Cible traitée solution saline à 0,9 %, volume 100 mL. Le plasma est généré à une tension de 6kV, des impulsions de 2,5 $\mu$ s, une fréquence de 20kHz et un débit He/0,2% O<sub>2</sub> de 2 L.min<sup>-1</sup>. .....151

Figure 46 Comparaison de l'intégrité membranaire après exposition au plasma : a) DH5 $\alpha$  et DH5 $\alpha$  + pUC19, b) HT-99 et J-53R. Cible traitée solution saline à 0,9 %, volume 100 mL. Le plasma est généré à une tension de 6kV, des impulsions de 2,5 $\mu$ s, une fréquence de 20kHz et un débit He/0,2% O<sub>2</sub> de 2 L.min<sup>-1</sup>. .....153

Figure 47 Taux de ROS intracellulaire après exposition au plasma : : a) DH5 $\alpha$ et DH5 $\alpha$ + pUC19, b) HT-99 et J-53R. Cible traitée solution saline à 0,9 %, volume 100 mL. Le plasma est généré à une tension de 6kV, des impulsions de 2,5 $\mu$ s, une fréquence de 20kHz et un débit He/0,2% O <sub>2</sub> de 2 L.min <sup>-1</sup> .....	154
Figure 48 Evaluation de l'activité de (a) SOD et (b) CAT de J-53R et HT-99 après exposition au plasma. Cible traitée solution saline à 0,9 %, volume 100 mL. Le plasma est généré à une tension de 6kV, des impulsions de 2,5 $\mu$ s, une fréquence de 20kHz et un débit He/0,2% O <sub>2</sub> de 2 L.min <sup>-1</sup> . .....	155
Figure 49 Concentration de CMI de HT-99 au chloramphénicol après exposition au plasma. Cible traitée solution saline à 0,9 %, volume 100 mL. Le plasma est généré à une tension de 6kV, des impulsions de 2,5 $\mu$ s, une fréquence de 20kHz et un débit He/0,2% O <sub>2</sub> de 2 L.min <sup>-1</sup> . .....	157
Figure 50 Effet du plasma sur la fréquence de transfert conjugatif de E. coli HT-99 après un contact avec E. coli J-53R : a) 6 heures de croisement, b) 9 heures de croisement, c) 24 heures de croisement et d) 48 heures de croisement. Cible traitée solution saline à 0,9 %, volume 100 mL. Le plasma est généré à une tension de 6kV, des impulsions de 2,5 $\mu$ s, une fréquence de 20kHz et un débit He/0,2% O <sub>2</sub> de 2 L.min <sup>-1</sup> . .....	159
Figure 51 Relation entre les VBNC et le transfert conjugatif de HT-99 : a) l'estimation de bactéries VBNC, b) fréquence de transfert conjugatif après 6h de contact entre HT-99 et J-53R. Cible traitée solution saline à 0,9 %, volume 100 mL. Le plasma est généré à une tension de 6kV, des impulsions de 2,5 $\mu$ s, une fréquence de 20kHz et un débit He/0,2% O <sub>2</sub> de 2 L.min <sup>-1</sup> .....	160
Table 1 Principaux des ARB et ARGs identifiés dans l'influent, l'effluent et les boues activées des stations d'épuration, adapté de (Pazda et al. 2019).....	56
Table 2 Synthèse de la littérature de l'application du plasma pour la dégradation des gènes de résistance aux antibiotiques.....	82
Table 3 Liste des milieux de culture et des concentrations d'antibiotique utilisées. ....	98



## *Introduction générale*

Les plasmas sont des gaz ionisés émettant de la lumière et produisant une grande variété de réactions chimiques. Ils sont qualifiés de quatrième état de la matière, après l'état solide, liquide et gazeux. Le principe de génération d'un plasma repose sur la création d'une décharge électrique dans un milieu gazeux induisant un arrachement des électrons aux atomes et aux molécules qui composent le gaz. Le plasma est un milieu constitué de nombreuses espèces réactives chargées (ions et électrons) ou neutres (atomes, molécules et radicaux). On distingue deux types de plasmas : le plasma thermique où toutes les espèces (neutres, électrons, ions) sont quasiment à la même température, et le plasma non-thermique où la température des électrons est très élevée par rapport à la température des neutres et des ions (Rozwadowski et Gawel 2022).



Les progrès en ingénierie des plasmas ont conduit à accroître la recherche de nouvelles applications des plasmas non-thermiques dans plusieurs domaines. Le traitement et la modification des surfaces des matériaux thermosensibles sont parmi les premières applications des plasmas froids, comme le dépôt de fines couches de polymère sur les matériaux pour la production de micro-puces dans l'industrie électronique (S. V. Nguyen 1986). En industrie agroalimentaire, le plasma non-thermique est utilisé pour le développement de surfaces revêtues de dépôts aux propriétés antiadhésives et antibactériennes afin de limiter la formation des biofilms (López et al. 2019). Récemment, son utilisation s'est étendue au domaine biomédical notamment pour la régénération des tissus, la cicatrisation des plaies (Maho et al. 2021) et pour le traitement des cancers (Vaquero et al. 2020). Le plasma est également appliqué à la décontamination microbiologie des surfaces et des liquides (von Woedtke et al. 2012), (Lackmann et al. 2014), (Liao et al. 2017). L'inactivation des micro-organismes par le plasma est principalement attribuée aux espèces réactives de l'oxygène et de l'azote. Ces espèces agissent sur la cellule par l'oxydation de ses constituants majeurs tels que les protéines, les lipides et les acides nucléiques, et produisent des changements qui conduisent à la mort cellulaire.

Actuellement, l'une des préoccupations majeures de la santé publique est la propagation des bactéries pathogènes dans l'environnement aquatique, et plus particulièrement celles portant des gènes de résistance aux antibiotiques (Dodd 2012), (von Wintersdorff et al. 2016), (Uluseker et al. 2021). Certaines bactéries appartenant à la famille des entérobactéries présentent des caractéristiques physiologiques qui leur permettent de survivre dans l'environnement. Par exemple, *Escherichia coli* survit jusqu'à 12 jours et *Klebsiella spp.* et *Salmonella spp.* jusqu'à 7 jours (Bertrand et al. 2015). Les entérobactéries regroupent non seulement des bactéries commensales, mais aussi des bactéries opportunistes pathogènes associées à des infections nosocomiales intestinales et extra-intestinales (Farmer et al. 2010). En outre, les entérobactéries sont considérées comme les principaux réservoirs des gènes de résistance aux antibiotiques (Eskova et al. 2022). Dans l'environnement aquatique, les bactéries peuvent intégrer ou échanger des fragments d'ADN codant pour des résistances aux antibiotiques par le biais de trois mécanismes de transfert horizontal de gènes (HGT) : la conjugaison, la transformation et la transduction (Dodd 2012). Ces mécanismes contribuent à l'augmentation de la fréquence des variations génétiques et à l'apparition éventuelle de nouvelles bactéries résistantes aux antibiotiques.

À l'heure actuelle, le plasma fait l'objet de nombreuses études en lien avec le vivant. Dans cette thèse, l'objectif principal des travaux entrepris est de contribuer à la compréhension du potentiel du plasma dans la réduction de la charge bactérienne dans les liquides et la limitation de la dissémination des gènes de résistance aux antibiotiques. Ces travaux visent à démontrer la

faisabilité technique de l'utilisation du plasma pour la décontamination des effluents hospitaliers avant leur rejet dans le réseau d'assainissement urbain. Ainsi, ce manuscrit de thèse sera divisé en cinq chapitres majeurs.

Le chapitre I est un état de l'art permettant de situer le contexte scientifique de l'étude. Après une description des caractéristiques morphologique, moléculaire, physiologique et transcriptomique d'*Escherichia coli*, les différents mécanismes et les supports de transfert horizontal des gènes de résistance sont présentés. Un état des lieux de la diversité des entérobactéries présentes dans l'environnement aquatique est effectué. Par la suite, les différentes caractéristiques fondamentales des sources plasma utilisées pour la décontamination des liquides sont introduites. Enfin, une description des mécanismes d'action du plasma sur les composantes bactériennes ainsi que la réponse cellulaire contre le stress oxydatif est abordée. Cette revue se conclut par une vue d'ensemble de l'application du plasma pour la décontamination des effluents, ainsi que de son effet sur la réduction de la charge bactérienne et la dégradation des gènes de résistance aux antibiotiques dans ces effluents.

Après une description des principaux objectifs des travaux de thèse, le chapitre II porte sur le matériel et les méthodes. Il est composé de trois parties. La première correspond à la description de la source plasma et des différents paramètres pour la génération de la décharge (la tension, la fréquence, le gaz et le débit de gaz). Une synthèse des outils de diagnostics adoptés pour la caractérisation électrique et optique de la décharge plasma est présentée. La deuxième partie est consacrée à l'analyse des propriétés physico-chimiques du liquide après l'exposition au plasma en mesurant la température et le pH de la solution ainsi qu'en quantifiant la formation des espèces réactives à longue durée de vie : le peroxyde d'hydrogène, les ions nitrite et nitrate. Enfin, la troisième partie est relative aux souches de bactéries et au vecteur de transmission de la résistance choisi pour l'étude. Une description des conditions de culture et de stockage des souches est présentée. Afin de faciliter la lecture et la compréhension, les protocoles expérimentaux de la partie microbiologie sont décrits par cas d'étude.

Le chapitre III comprend les résultats expérimentaux de la chimie issue des interactions entre le plasma, le milieu environnant et la cible liquide. Ce chapitre est présenté en deux parties distinctes. La première concerne l'identification des espèces réactives émissives générées par le plasma en phase gazeuse et le suivi de leur distribution spatiale le long du jet plasma. A la suite de ces résultats, nous avons également déterminé la température caractéristique du plasma. La deuxième partie de ce chapitre est relative à la caractérisation physico-chimique du liquide

« solution saline » avec des mesures de pH, de température et de concentration d'espèces réactives de l'oxygène et de l'azote.

Le chapitre IV présente les résultats de l'influence de la phase de croissance bactérienne sur l'efficacité de la décontamination des liquides par plasma. Après traitement, un ensemble de paramètres microbiologie et moléculaire sont analysés. Nous avons d'abord étudié la viabilité bactérienne et la présence de bactéries avec des lésions sous-létales. Nous nous sommes ensuite intéressés à l'influence des changements physiologiques par l'estimation de l'activité métabolique intracellulaire et par la détermination de la présence de bactéries à l'état viable mais non-cultivable (VBNC). Cette partie s'est poursuivie par l'étude de l'intégrité membranaire des bactéries des deux phases de croissance après l'exposition au plasma. Enfin, des mesures de ROS intracellulaires et leur influence sur l'intégrité de l'ADN bactérien sont présentées.

Le dernier chapitre V est dédié aux résultats de l'effet du plasma sur l'inactivation des bactéries résistantes aux antibiotiques et sur l'inhibition des mécanismes de transfert horizontal de gènes. Ce chapitre comprend deux objectifs distincts. Le premier est d'évaluer l'influence de la présence de l'ADN plasmidique sur le comportement des bactéries face au stress oxydatif induit par le plasma. De la même manière que dans le chapitre IV, différents paramètres microbiologie et moléculaire ont été ciblés tels que la viabilité bactérienne, la sous-létalité, l'activité métabolique, l'intégrité membranaire et le taux de ROS intracellulaires. Le second objectif est relatif à l'effet du plasma sur le transfert horizontal de gènes de résistance aux antibiotiques. Pour cela, nous avons établi un modèle conjugatif entre une bactérie donneuse exposée au plasma et une bactérie réceptrice non exposée au plasma. En parallèle, nous nous sommes également intéressés à l'effet du plasma sur les comportements cellulaires des deux souches après traitement grâce à une mesure de la concentration minimale inhibitrice et au dosage d'enzymes antioxydantes (la superoxyde dismutase et la catalase) en post-traitement plasma.

Enfin, une conclusion générale et les perspectives clôturent ce manuscrit.



# *Chapitre I : Synthèse bibliographique*

## 1. Les entérobactéries

La maîtrise de la qualité microbiologique de l'environnement aquatique est un enjeu de santé publique majeur. L'Organisation Mondiale de la Santé (OMS) et le Fonds des Nations Unies pour l'Enfance (UNICEF) ont mis en place les Objectifs du Millénaire pour le Développement (OMD) visant à garantir l'accès des populations à une ressource en eau potable améliorée, dont la nature de sa constitution et du traitement actif effectué, la protège de contaminations externes notamment de contaminations fécales (OMS 2017). En 2015, selon l'OMS, environ 90 % de la population mondiale avait accès à un point d'eau qui répondait aux critères d'accessibilité, de disponibilité et de potabilité (OMS 2015). Cependant, il est important de noter que même si une

source d'eau est protégée et répond aux critères de potabilité, cela ne garantit pas nécessairement qu'elle est exempte de contaminants fécaux. Les matières fécales peuvent contenir des agents pathogènes tels que des bactéries, des virus et des parasites qui peuvent contaminer l'eau et provoquer des maladies lorsqu'elle est consommée. Près de 2 milliards de personnes dans le monde utilisent encore une source d'eau potable contaminée par des matières fécales, ce qui entraîne un risque significatif pour la santé. La contamination de l'eau par des matières fécales peut se produire en raison de divers facteurs. Cela peut être dû à des infrastructures d'approvisionnement en eau inadéquates, à un assainissement insuffisant, à des pratiques agricoles ou industrielles inadéquates, à une mauvaise gestion des eaux usées, entre autres raisons. Les conséquences de l'utilisation d'une eau contaminée sont très préoccupantes, avec plus de 500 000 décès par an attribués à cette cause (Bain et al. 2014), (Rochelle-Newall et al. 2015), (Paruch et al. 2019).

Selon le rapport de l'OMS de 2017, les maladies liées à la contamination de l'eau représentent une charge socio-économique considérable pour l'humanité. Les agents pathogènes d'origine fécale constituent une priorité dans la fixation des objectifs sanitaires destinés à garantir la sécurité microbiologique de l'environnement aquatique (Clasen et al. 2014). Les rejets d'eaux usées sont les principales sources de contamination des eaux environnementales par la matière fécale et une cause de propagation des microorganismes pathogènes d'origine fécale (Rochelle-Newall et al. 2015), (Van Duin et Doi 2017), (Paruch et al. 2019). Les maladies liées aux infections fécales sont généralement associées à des infections d'origine bactérienne, causant des maladies gastro-intestinales. Un exemple de bactéries abondantes dans l'environnement aquatique est la famille des entérobactéries. Elle est considérée comme un indicateur microbiologique de contamination fécale (Gorrasi et al. 2021). D'un point de vue taxinomique, les entérobactéries sont une famille complexe comprenant 33 genres et 134 espèces. Sur le plan structural, elles sont caractérisées par leur morphologie de bacilles à Gram négatif, leur capacité à être aérobies-anaérobies facultatifs, leur absence de sporulation et leur mobilité fréquente (Farmer et al. 2010).

Les entérobactéries sont naturellement présentes dans l'environnement et ont la capacité d'y survivre pendant de longues périodes. Leur habitat principal est le tractus intestinal des humains et des animaux, ainsi que l'environnement aquatique. La plupart des genres d'entérobactéries ont une relation commensale avec les humains et les animaux, faisant partie du microbiote intestinal (Farmer et al. 2010), (Gorrasi et al. 2021), (Salamandane et al. 2021). Cependant, certaines variantes pathogènes opportunistes sont associées à des infections intestinales et extra-intestinales nosocomiales qui affectent des millions de personnes chaque année. Les principales entérobactéries pathogènes d'origine hydrique, qui peuvent infecter le

tractus gastro-intestinal chez les humains et les animaux et qui sont excrétées dans l'environnement avec les matières fécales comprennent *Salmonella spp.*, *Shigella spp.*, *Vibrio cholerae*, les variantes pathogènes d'*Escherichia coli* (par exemple, *E. coli* entérotoxigène, *E. coli* entérohémorragique O157:H7), *Yersinia enterocolitica*, *Campylobacter spp.* et *Helicobacter pylori* (Szewzyk et al. 2000), (Theron et Cloete 2002).

En raison de leur abondance dans l'environnement et dans le tractus intestinal, de leur mobilité, de la rapidité de leur cycle de multiplication et de leur propriété pathogène, les entérobactéries présentent un défi majeur pour le contrôle des infections (Janda et Abbott 2021), (Eskova et al. 2022). Dans ce contexte, l'exemple prototypique est celui d'*Escherichia coli*. La grande majorité des souches d'*Escherichia coli* chez l'homme est commensale et adaptée pour coloniser l'hôte sans provoquer de maladies. Cependant, certaines souches pathogènes d'*Escherichia coli* peuvent provoquer des infections gastro-intestinales graves (Kaper et al. 2004), (Tenaillon et al. 2010), (Scheutz et Strockbine 2015).

### 1.1.L'espèce bactérienne de *Escherichia coli*

Isolée pour la première fois en 1885 par Theodor Escherich lors d'une étude sur le microbiote intestinal des nourrissons (Scheutz et Strockbine 2015), *Escherichia coli* (*E. coli*) est l'espèce bactérienne la plus étudiée en microbiologie. Ses caractéristiques de croissance, avec un temps de génération de 20 minutes et sa facilité d'isolation, en font un modèle incontournable pour étudier l'évolution des microorganismes. *E. coli* est souvent rejetée dans l'environnement par les matières fécales ou les effluents des eaux usées (Tenaillon et al. 2010). La présence d'*E. coli* dans l'environnement aquatique a longtemps été considérée comme un indicateur de contamination fécale (Khan et Gupta 2019).

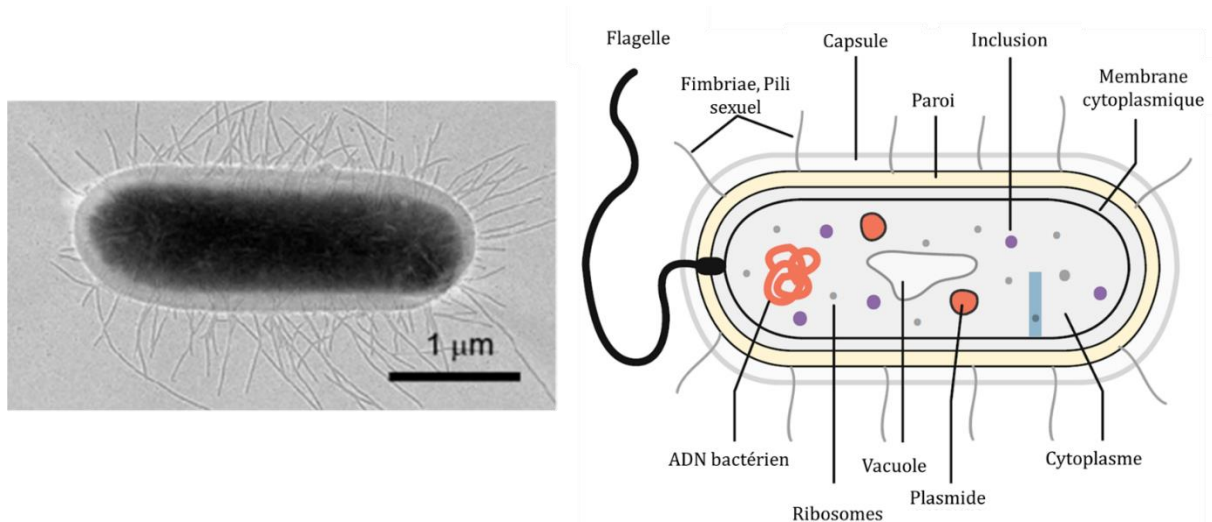
#### 1.1.1. Structure cellulaire

*Escherichia coli* se présente sous forme de bacille avec des extrémités arrondies, mesurant environ 1 à 1,5 µm de diamètre et 2 à 6 µm de longueur. Elle peut être mobile ou non et présente une structure flagellaire péritriche (Figure 1). Les *E. coli* sont des bactéries non sporulées avec un métabolisme aéro-anaérobie facultatif (Scheutz et Strockbine 2015).

La découverte de l'architecture générale d'*E. coli* remonte aux années 1930 avec le développement du microscope électronique (Scheutz et Strockbine 2015). En tant que procaryote,

la cellule d'*E. coli* présente une structure simple (Bertrand et al. 2015). Elle possède des éléments internes constants tels que la paroi cellulaire, qui constitue un squelette protégeant la cellule de son milieu externe et responsable de la forme de la bactérie. La membrane cytoplasmique, située à l'interface entre la paroi et le cytoplasme, permet de délimiter les éléments internes de la cellule. Elle sert également à contrôler les flux entrants et sortants de la bactérie. Le cytoplasme se présente comme un hydrogel colloïdal dépourvu de structures intracellulaires. Il est le siège de la plupart des réactions métaboliques cellulaires. Il contient une variété de substances nutritives de réserve et le matériel génétique bactérien. Ce dernier regroupe l'ADN génomique double-brin circulaire et l'ARN. Les structures les plus fines contenues dans le cytoplasme sont les ribosomes. Ils servent à la synthèse des protéines (Maier et al. 2009), (Bertrand et al. 2015).

*E. coli* possède également des éléments facultatifs, généralement externes. La capsule est une enveloppe visqueuse qui entoure la surface externe de la paroi et permet aux bactéries d'adhérer plus facilement aux surfaces. Les flagelles ou les cils sont des filaments longs et très fins permettant le déplacement des bactéries. Les pili sont des filaments courts et permettent aux cellules de se fixer sur les surfaces. Ces derniers jouent un rôle prépondérant dans le transfert du matériel génétique au cours du mécanisme de la conjugaison bactérienne. Enfin, les plasmides sont des molécules d'ADN généralement acquises au cours du processus de transformation bactérienne. Ils peuvent conférer certains avantages aux bactéries tels que la résistance à des antibiotiques ou être des facteurs de virulence (Maier et al. 2009), (Bertrand et al. 2015)."

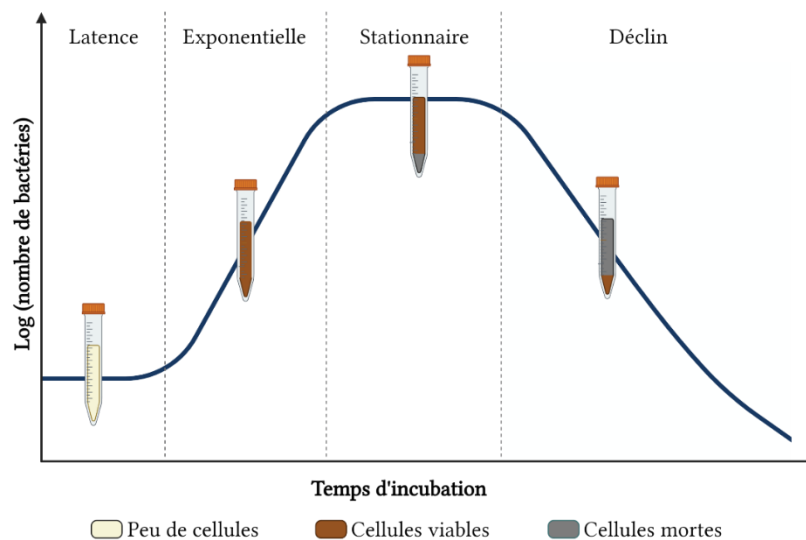


**Figure 1** Photographie et structure cellulaire de *Escherichia coli*, adaptée de (Scheutz et al. 2015), (Bertrand et al. 2015).



### 1.1.2. Croissance cellulaire

La croissance bactérienne est un processus complexe impliquant de nombreuses réactions anaboliques, telles que la synthèse des constituants cellulaires et moléculaires, mais aussi des réactions cataboliques ayant pour fonction la dégradation des métabolites et des toxines. Par définition, la croissance bactérienne correspond à l'accroissement du nombre de bactéries et non à la taille des cellules (Maier et al. 2009). La plupart des informations disponibles concernant la croissance d'*E. coli* et des bactéries en général résultent d'études contrôlées en laboratoire utilisant des cultures pures. Afin de comprendre le processus de croissance d'une bactérie, les cellules sont généralement cultivées dans un milieu liquide dans lequel les nutriments et les conditions environnementales sont contrôlés en termes de température, de pH et d'oxygène. L'augmentation du nombre ou de la masse bactérienne peut être mesurée en fonction du temps pour obtenir une courbe de croissance. Plusieurs phases de croissance distinctes peuvent être observées dans une courbe de croissance (Figure 2) : la phase de latence, la phase exponentielle ou logarithmique, la phase stationnaire et la phase de déclin. Chacune de ces phases représente une période distincte de croissance associée à des changements physiologiques typiques dans la culture cellulaire (Maier et al. 2009).



**Figure 2** La courbe de croissance d'une culture bactérienne, adaptée de *Bacterial Growth Curve*, BioRender.com (2022), extrait de <https://app.biorender.com/illustrations/638743578a2ca47c1e4258ef>.

Lorsqu'un inoculum est placé dans un milieu frais, la croissance commence après une période appelée phase de latence. Cette phase correspond à la période d'adaptation physiologique des cellules bactériennes aux conditions de culture. Il s'agit du temps nécessaire à l'induction de

la synthèse de l'ARN messager (ARNm) et de protéines spécifiques pour répondre aux nouvelles exigences du milieu environnant. La deuxième phase de croissance est la phase exponentielle. Elle est caractérisée par une période de croissance exponentielle. Il s'agit de la période reproductive pendant laquelle le taux d'augmentation des cellules dans la culture est proportionnel au nombre de cellules présentes à un moment donné, autrement dit au nombre de cellules viables. La troisième phase de croissance est la phase stationnaire. Elle est définie comme un état d'absence de croissance bactérienne. Bien qu'il n'y ait pas de croissance nette en phase stationnaire, les cellules continuent de croître et de se diviser. La croissance est simplement équilibrée par un nombre égal de nouvelles cellules et d'autres qui meurent. La phase finale de la courbe de croissance est la phase de déclin. Elle se caractérise par une perte nette de cellules viables. En revanche, bien qu'il puisse encore y avoir des divisions cellulaires, le nombre de cellules mortes reste supérieur au nombre de cellules vivantes (Maier et al. 2009).

### 1.1.3. Pouvoir pathogène

*E. coli* comprend non seulement des souches commensales mais également des souches pathogènes à l'origine de diverses maladies humaines entraînant plus de 2 millions de décès chaque année (Kaper et al. 2004), (Tenailon et al. 2010). Il existe sept pathotypes intestinaux bien étudiés d'*Escherichia coli* qui sont associés à des infections intestinales spécifiques. Ces pathotypes d'*E. coli* peuvent varier en termes de virulence et de mécanismes de pathogénicité. Les *E. coli* productrices de la shigatoxine (STEC) sont des souches qui produisent des toxines appelées shigatoxines, également connues sous le nom de toxines de type Shiga. Elles sont associées à des infections sévères, telles que la colite hémorragique et le syndrome hémolytique et urémique (SHU). Les *E. coli* entérotoxigènes (ETEC) produisent des toxines de type entérotoxine qui entraînent une augmentation de la sécrétion de fluides dans l'intestin, conduisant à des diarrhées profuses. Les *E. coli* entérotoxigènes (EPEC), les *E. coli* entéroaggrégatifs (EAEC), les *E. coli* diffus, les *E. coli* adhérents et les *E. coli* entéro-invasifs sont des pathotypes associés à des diarrhées et à des lésions sur les cellules intestinales.

Les souches STEC et EPEC ont été fréquemment signalées comme responsables d'épidémies d'origine hydrique dans le monde (Chandran et Mazumder 2015), (Haymaker et al. 2019), (Berthe et al. 2013). La contamination de l'environnement par *E. coli* peut se produire par les eaux usées des abattoirs et par les effluents des stations de traitement des eaux usées urbaines (Balière et al. 2015). Bien que des études approfondies aient été réalisées sur les aspects cliniques des souches pathogènes d'*E. coli*, y compris le mode de pathogénèse, leur source et leur prévalence

dans l'environnement ne sont pas examinés de manière approfondie. Cela souligne la nécessité d'études supplémentaires pour comprendre l'écologie de ces bactéries dans les environnements extra-intestinaux (Kaper et al. 2004), (Haldar et al. 2022).

#### 1.1.4. Mécanismes d'adaptation

Afin de survivre à des périodes prolongées de stress, les entérobactéries, dont *E. coli*, ont développé des stratégies de survie qui leur permettent de persister dans l'environnement jusqu'à ce que les conditions redeviennent favorables à leur croissance. Lors de ces conditions de stress, ces bactéries peuvent changer leur état physiologique en passant d'une croissance rapide et exponentielle à une croissance lente et stationnaire. Ce changement entraîne des modifications morphologiques, moléculaires, physiologiques et transcriptomiques des cellules, donnant naissance à des cellules dont le potentiel de survie à long terme est accru (Nyström 2004), (Navarro et al. 2010), (Jaishankar et Srivastava 2017).

##### 1.1.4.1. Adaptations morphologiques et moléculaires

L'entrée des bactéries en phase stationnaire est caractérisée par une diminution de la taille des cellules et par des changements des différents constituants cellulaires et subcellulaires (Jaishankar et Srivastava 2017).

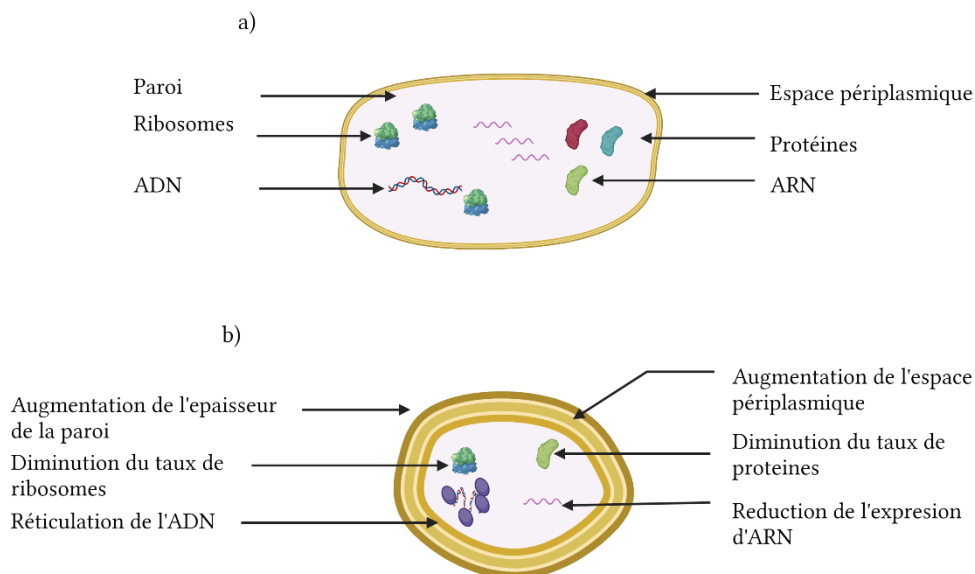
Étant donné que c'est une barrière qui sert à protéger les structures subcellulaires contre le stress du milieu environnant, le passage en phase stationnaire s'accompagne d'une augmentation de l'épaisseur du peptidoglycane, constituant majeur de la paroi. Ce dernier représente 0,7 à 0,8 % du poids sec de la cellule dans les cellules en phase exponentielle, alors qu'en phase stationnaire il augmente de 1,4 à 1,9% (Jaishankar et Srivastava 2017), (Mengin-Lecreux et van Heijenoort 1985). Lors du passage des bactéries de la phase exponentielle à la phase stationnaire, plusieurs changements physicochimiques se produisent au niveau de la membrane, tels que la diminution du potentiel et de la fluidité membranaire, ainsi qu'une augmentation de la rigidité membranaire (Gohrbandt et al. 2022), (Needham et Trent 2013), (Rowlett et al. 2017).

Le potentiel membranaire joue un rôle essentiel dans de nombreuses fonctions cellulaires. Il fait référence à la différence de charge électrique de part et d'autre de la membrane cellulaire. La membrane cellulaire d'*E. coli* maintient un potentiel électrique négatif à l'intérieur de la cellule

par rapport à l'extérieur, estimé à -100 mV. Ce potentiel membranaire est principalement généré par l'accumulation d'ions potassium (K<sup>+</sup>) à l'intérieur de la cellule et la sortie d'ions protons (H<sup>+</sup>) à l'extérieur. Cela crée une différence de concentration d'ions entre les deux côtés de la membrane, ce qui contribue à maintenir le potentiel membranaire. Le potentiel membranaire est impliqué dans plusieurs processus métaboliques chez les bactéries, tels que le transport actif des nutriments et des ions à travers la membrane, la génération d'énergie pour la synthèse d'adénosine triphosphate (ATP) par la chaîne respiratoire, la régulation de l'équilibre osmotique de la cellule et la réponse aux stimuli environnementaux. Pendant la phase stationnaire, le potentiel membranaire peut diminuer. Cela est souvent causé par une fuite d'ions potassium (K<sup>+</sup>) du cytoplasme des cellules. Cette fuite d'ions K<sup>+</sup> entraîne une dépolarisation du potentiel membranaire, ce qui peut affecter les échanges avec le milieu extracellulaire. Ces perturbations du potentiel membranaire peuvent avoir des conséquences négatives sur la physiologie de la cellule (Needham et Trent 2013), (Rowlett et al. 2017), (Stautz et al. 2021), (Mikoyan et al. 2020). Par exemple, affecter le fonctionnement normal des protéines membranaires et des systèmes de transport. De même, ces changements dans le potentiel membranaire peuvent influencer la sensibilité des bactéries à certains antibiotiques ou agents chimiques. La fluidité membranaire est un aspect important de la structure et du fonctionnement de la membrane cellulaire. Elle fait référence à la mobilité des lipides constituant la bicouche lipidique de la membrane. Chez les bactéries, la fluidité membranaire est un élément crucial pour de nombreuses fonctions cellulaires, telles que la mobilité des protéines membranaires, le transport des nutriments et des métabolites à travers la membrane, la signalisation cellulaire et la réponse aux stimuli environnementaux. Plusieurs facteurs peuvent réguler la fluidité membranaire, tels que la composition en lipides, la longueur des chaînes lipidiques et la présence d'acides gras insaturés. Ces facteurs influencent la façon dont les lipides sont organisés et interagissent les uns avec les autres dans la membrane. La membrane des bactéries est principalement constituée de phospholipides, tels que les phospholipides à chaîne longue tels que les phosphatidylglycérols (PG) et les phosphatidyléthanolamines (PE), et de phospholipides à chaîne courte comme les phosphatidylsérines (PS) (Needham et Trent 2013), (Rowlett et al. 2017). La proportion relative de ces lipides peut varier en fonction des conditions de croissance et des besoins métaboliques de la bactérie. Lorsque les bactéries passent de la phase exponentielle à la phase stationnaire de croissance, on observe une augmentation des phospholipides à chaîne longue, tels que les PG et les PE, par rapport aux phospholipides à chaîne courte, comme les PS. Cette augmentation des lipides à chaîne longue peut contribuer à rendre la membrane plus rigide et moins fluide. Ces changements permettent aux bactéries de résister aux conditions de stress et d'améliorer leur capacité de survie.

Au niveau subcellulaire, lorsque les bactéries entrent en phase stationnaire, plusieurs changements significatifs se produisent. Tout d'abord, il y a une réduction du volume total du cytoplasme, ce qui est généralement associé à une diminution de la taille de la cellule. Une augmentation du ratio ADN/protéine, indiquant que la quantité d'ADN devient relativement plus élevée par rapport à la quantité de protéines présentes. Cette augmentation peut être attribuée à des facteurs tels qu'une réduction de la synthèse des protéines ou une augmentation de la réplication de l'ADN. De plus, l'ADN subit une condensation, entraînant des modifications structurales qui rendent l'ADN plus compact et dense. Cette condensation de l'ADN contribue à la protection du matériel génétique et à la préservation de sa stabilité pendant la phase stationnaire. En parallèle à ces changements, on observe également une "hibernation" des fonctions cellulaires pour certaines molécules impliquées dans la division cellulaire, telles que l'ARN et les ribosomes. Cela signifie que ces molécules réduisent leur activité, ce qui est essentiel pour économiser l'énergie cellulaire et maintenir la viabilité dans des conditions de stress (Jaishankar et Srivastava 2017), (Navarro et al. 2010).

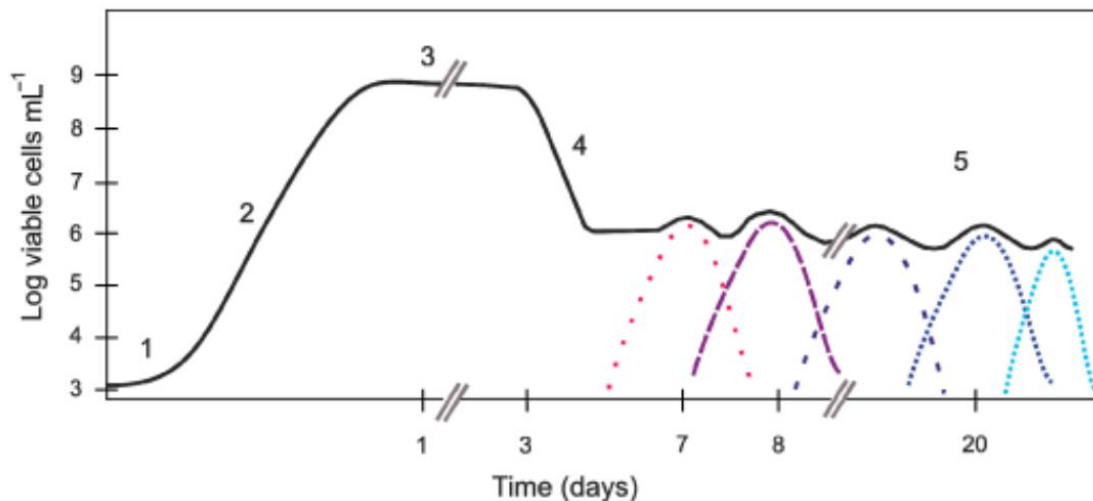
Ces changements subcellulaires reflètent l'adaptation des bactéries à des conditions environnementales défavorables et à des ressources limitées pendant la phase stationnaire. Ils contribuent à la capacité des bactéries à ralentir leur métabolisme, à conserver leur matériel génétique et à survivre dans des conditions hostiles jusqu'à ce que des conditions plus favorables se présentent. La Figure 3 présente une illustration des changements cellulaires et subcellulaires les plus pertinents qui se produisent dans une cellule pendant la phase stationnaire (Jaishankar et Srivastava 2017), (Navarro et al. 2010).



**Figure 3** Comparaison structurelle et moléculaire des cellules en : a) phase exponentielle et b) phase stationnaire, adaptée de (Jaishankar et Srivastava 2017) et BioRendre .com (2022).

### 1.1.4.2. Adaptations physiologique

Après la phase de déclin, les bactéries peuvent maintenir une croissance continue en passant à une phase dite « stationnaire longue ». L'observation de la survie des bactéries après la phase de déclin montre que, pendant une incubation assez prolongée, sans changement du milieu nutritif, la courbe de croissance présente des montées et des descentes successives caractéristiques du nombre de cellules viables (Figure 4, Navarro et al. 2010). En effet, au cours de leur évolution, les bactéries ont développé des stratégies d'adaptation qui leur permettent de conserver un état de viabilité. Ces stratégies sont décrites comme étant des phénotypes. On distingue trois phénotypes d'adaptation au stress : le phénotype de cellules viables mais non cultivables (VBNC), le phénotype d'avantage de croissance en phase stationnaire (GASP) et le phénotype d'inhibition dépendant du contact en phase stationnaire (SCDI). Bien que ces processus partagent certains critères pour leur déclenchement, Lemonnier et al. (2008) ont démontré qu'ils sont distincts d'un point de vue génétique et fonctionnel.



**Figure 4** Phases de croissance bactérienne. Cellules d'*Escherichia coli* se développant dans des conditions de laboratoire optimales, milieu riche, à 37°C avec aérobie. 1, phase de latence ; 2, phase exponentielle ; 3, phase stationnaire ; 4, phase de déclin ; 5, phase stationnaire à long terme. Les lignes colorées en pointillés représentent la croissance continue et la prédominance des différents mutants qui apparaissent au sein d'une population en phase stationnaire prolongée (cycles VBNS, GASP et SCDI), adaptée de (Navarro et al. 2010).

Le phénotype de bactéries viables mais non cultivables (Viable But Non-Culturable - VBNC) est un état physiologique dans lequel se trouvent certaines bactéries lorsqu'elles sont exposées à des conditions défavorables ou stressantes (Jaishankar et Srivastava 2017). Dans cet état, ces bactéries restent vivantes et métaboliquement actives, mais elles sont incapables de former des colonies sur les milieux de culture conventionnels. Le phénotype VBNC est le résultat d'une réponse adaptative des bactéries pour survivre dans des environnements hostiles tels que

des températures extrêmes, une disponibilité réduite de nutriments, des concentrations élevées de substances toxiques, des variations du pH, ou encore une exposition prolongée à des agents de stress tels que les rayonnements UV ou les désinfectants chimiques (X. Zhao et al. 2017), (Jaishankar et Srivastava 2017). Diverses espèces d'entérobactéries peuvent entrer à l'état VBNC, par exemple, *E. coli* (Fu et al. 2020), *Campylobacter* (Zhou et al. 2020), *Klebsiella pneumoniae* (Alvear-Daza et al. 2021), *Vibrio cholerae* (S. Zhao et al. 2021) et *Salmonella* (Ou et al. 2021). Plusieurs études ont rapporté la détection des bactéries VBNC dans l'environnement aquatique, notamment dans les eaux usées (Jin et al. 2017), (Zhu et al. 2022).

L'entrée des bactéries à l'état VBNC induit divers changements, notamment une diminution de l'efficacité de la transmission des nutriments et des substances, une diminution du métabolisme et de l'activité respiratoire, un changement de la composition de la paroi cellulaire et de la membrane, et une modification des niveaux d'expression génétique (Bodor et al. 2020), (Dong et al. 2020). L'état VBNC s'accompagne de changements morphologiques importants. La forme des cellules bactériennes devient sphérique, ce qui modifie considérablement la surface de contact avec le milieu environnant. La diminution de la taille de la cellule affecte de manière significative la transmission des nutriments, et par conséquent l'activité métabolique. Bien que les bactéries VBNC soient généralement dans un état de faible activité, elles peuvent ressusciter et restaurer leur cultivabilité dans des conditions externes favorables (Bodor et al. 2020), (X. Zhao et al. 2017). Fu et al. (2020) ont rapporté que la teneur en adénosine triphosphate (ATP) des bactéries VBNC est maintenue à un niveau relativement élevé. Cela peut être dû au fait que les bactéries sont dans un état de dormance profonde et que les processus métaboliques consommateurs d'énergie sont inhibés, ce qui entraîne une accumulation d'ATP. Les bactéries disposent alors de l'énergie nécessaire au processus de ressuscitation. Le contenu du second messager adénosine monophosphate cyclique (AMPC), un autre métabolite de l'ATP, est significativement plus élevé chez les bactéries VBNC que dans les bactéries cultivables. Noshio et al. (2018) ont démontré que l'AMPC joue un rôle important dans la survie cellulaire et la résistance aux perturbateurs environnementaux. Ils suggèrent que l'AMPC pourrait avoir un effet positif sur le passage des bactéries à l'état VBNC. Un autre phénomène couramment observé chez les cellules VBNC est l'agrégation des protéines. Yeom et Groisman (2021) ont constaté qu'un grand nombre d'agrégats protéiques sont formés dans les *E. coli* à l'état VBNC, mais presque aucun n'a été observé dans les cellules en phase logarithmique et dans les cellules ressuscitées.

Le phénotype de croissance en phase stationnaire (Growth Advantage in Stationary Phase - GASP) est un phénomène observé chez certaines bactéries lorsqu'elles se trouvent en phase stationnaire (Zambrano et Kolter 1996), (Jaishankar et Srivastava 2017). Contrairement aux

VBNC, les bactéries GASP maintiennent leur activité métabolique et conservent la capacité de se reproduire. Le GASP se caractérise par une augmentation de la densité cellulaire et une prolifération continue des bactéries en phase stationnaire longue, ce qui contraste avec la diminution habituelle de la population bactérienne observée à ce stade. Les bactéries GASP peuvent donc avoir un avantage compétitif en utilisant les ressources disponibles de manière plus efficace et en occupant des niches écologiques spécifiques. Les mécanismes moléculaires sous-jacents au phénotype GASP ne sont pas complètement élucidés, mais plusieurs facteurs peuvent contribuer à cette croissance continue en phase stationnaire. Par exemple, des mutations génétiques peuvent survenir, permettant aux bactéries d'acquérir de nouveaux traits ou de modifier des voies métaboliques, ce qui leur confère un avantage en termes de croissance et de survie. De plus, les bactéries GASP peuvent tirer parti de la présence de nutriments résiduels ou de composés métaboliques produits par d'autres bactéries en phase stationnaire, ce qui leur permet de maintenir leur métabolisme actif et leur croissance.

Le phénotype d'inhibition dépendant du contact en phase stationnaire (Stationary Phase Contact Dependent Inhibition - SCDI) est un mécanisme d'adaptation observé chez certaines bactéries en phase stationnaire longue (Lemonnier et al. 2008), (Jaishankar et Srivastava 2017). Lorsque les bactéries se trouvent dans cette phase, elles peuvent produire et libérer des substances inhibitrices qui agissent directement sur d'autres cellules bactériennes en contact avec elles. Ce phénomène d'inhibition dépend du contact physique entre les cellules, ce qui signifie que les substances inhibitrices ne diffusent pas librement dans le milieu environnant, mais sont transmises par contact cellulaire direct. Les mécanismes d'inhibition peuvent varier selon les espèces bactériennes et peuvent impliquer la production de peptides antimicrobiens, de toxines, d'enzymes ou d'autres molécules inhibitrices. Le phénotype d'inhibition dépendant du contact en phase stationnaire peut conférer un avantage compétitif aux bactéries qui le possèdent. En limitant la croissance des autres bactéries en contact avec elles, elles peuvent occuper des niches écologiques spécifiques et réduire la compétition pour les ressources disponibles. Cela peut favoriser leur survie et leur permettre de maintenir une population stable même dans des conditions défavorables.

### 1.1.4.3. Adaptations transcriptomiques

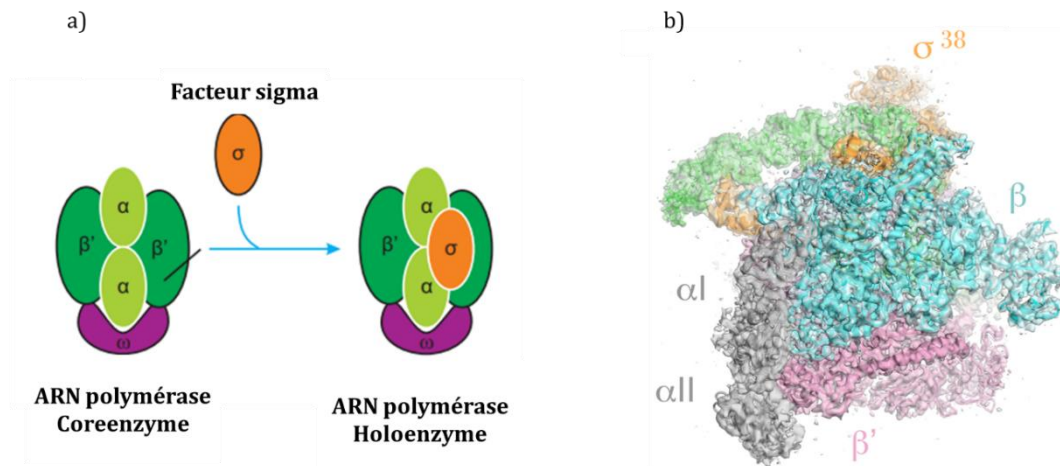
L'entrée en phase stationnaire est un processus extrêmement régulé impliquant des facteurs de transcription et de nombreux régulateurs (Navarro et al. 2010), (Jaishankar et Srivastava 2017). Les signaux environnementaux déclenchent l'action des facteurs et des



régulateurs transcriptomiques qui dirigent l'activité de l'ARN polymérase vers l'expression des gènes. La plupart des mécanismes de régulation de l'expression génétique sont complexes et font intervenir de nombreux liens régulateurs. Un bon exemple de cette complexité est la régulation du facteur sigma «  $\sigma$  » de la phase stationnaire qui contrôle à la fois l'entrée des bactéries en phase stationnaire et la résistance au stress.

La transcription de l'ADN en ARN chez les bactéries est initiée par l'ARN polymérase. Cette enzyme est constituée d'un cœur (Figure 5a) (Navarro et al. 2010), (Roberts et al. 2017). Les deux sous-unités alpha «  $\alpha$  » sont responsables de l'initiation de la transcription et de la reconnaissance du promoteur où doit se fixer l'ARN polymérase. Le centre actif des trois sous-unités «  $\beta\beta'\omega$  » assure la synthèse de l'ARN. Le génome d'*E. coli* code pour sept facteurs «  $\sigma$  » différents :  $\sigma70$ ,  $\sigma38$ ,  $\sigma28$ ,  $\sigma54$ ,  $\sigma32$ ,  $\sigma24$  et  $\sigma18$  (Yuste et al. 2006), (Costanzo et Ades 2006). Chacun est capable de reconnaître spécifiquement un certain groupe de promoteurs et de permettre à la cellule de modifier radicalement son transcriptome en réponse à divers signaux. Par exemple, la synthèse des flagelles et des facteurs chimiotactiques est régulée par sigma «  $\sigma28$  », l'activation du métabolisme de l'azote est codée par sigma «  $\sigma54$  », la réponse au choc thermique par sigma «  $\sigma32$  », la réponse au stress associé aux dommages membranaires par sigma «  $\sigma24$  » et l'expression des gènes de transport du nitrate par sigma «  $\sigma19$  ».

Le facteur  $\sigma38$  (Figure 5b), nommé aussi RpoS ou  $\sigma S$ , est principalement codé par le gène *rpoS* (« RNA polymerase of stationary phase »). Ce facteur agit comme le principal régulateur de la transcription en réponse au stress (Chung et al. 2006), (Navarro et al. 2010). Ce facteur est nécessaire pour la transition de la culture bactérienne vers la phase stationnaire. La quantité de  $\sigma38$  reste relativement faible pendant la phase exponentielle mais augmente nettement en phase stationnaire (Chung et al. 2006). Il existe certains gènes  $\sigma38$ -dépendants dont l'expression est maximale au moment de la transition des cultures de la phase exponentielle à la phase stationnaire. Chez *E. coli*, le facteur  $\sigma38$  est impliqué dans la régulation d'environ 35 gènes (Lushchak 2001), (Chung et al. 2006), (Cho et al. 2014). L'induction du facteur  $\sigma38$  est observée dans des conditions de pH faible, de choc thermique, de dommage de l'ADN, de stress oxydant, d'une densité cellulaire élevée et d'une osmolarité importante. Par exemple, lors d'un stress oxydatif dû au peroxyde d'hydrogène, le facteur sigma régule l'expression de *katG* (HPI, hydroxyperoxydase I), *katE* (hydroxyperoxydase II), *dps* (protéine non spécifique de liaison à l'ADN), *xthA* (exonucléase III), *gorA* (glutathion réductase), et *gdaX* (gène associé au système de résistance à faible pH).



**Figure 5** Structure de l'ARN polymérase : a) réaction de formation de l'holoenzyme, b) structure de l'ARN polymérase ( $\alpha_2\beta\beta'\omega$ )facteur «  $\sigma^{38}$  » de *E. coli*, adaptée de (Chen et al. 2017).

Pour conclure, les facteurs sigma jouent un rôle crucial dans les mécanismes d'adaptation qui permettent aux bactéries de résister aux brusques changements défavorables des conditions environnementales. De nombreux facteurs sigma alternatifs sont produits de manière continue, mais ils restent inactifs jusqu'à ce qu'ils reconnaissent strictement les séquences promoteurs. Cette reconnaissance précise leur permet de réguler de manière globale l'expression d'un vaste ensemble de gènes, permettant ainsi à la bactérie de s'adapter rapidement.

## 2. Les entérobactéries support de l'antibiorésistance

Les entérobactéries représentent une grande menace pour la santé publique en raison de leur multirésistance aux antibiotiques, notamment la résistance aux  $\beta$ -lactamases, aux carbapénèmes et aux quinolones (Van Duin et Doi 2017). Dans son rapport de 2017, l'OMS signale que les entérobactéries résistantes aux carbapénèmes et aux céphalosporines de 3e génération sont classées dans la liste des pathogènes prioritaires critiques (OMS 2017). Ces dernières sont associées à une morbidité et à une mortalité élevée chez les patients hospitalisés. La propagation de l'antibiorésistance au sein des communautés d'entérobactéries est principalement attribuée au transfert horizontal de gènes (HGT) et aux éléments génétiques mobiles (EGM) à travers la conjugaison, la transformation et la transduction (Gillings et al. 2015).

## 2.1. Support génétique de l'antibiorésistance

La résistance aux antibiotiques peut être différenciée en deux types : une résistance naturelle et une résistance acquise (Dodd 2012). La résistance naturelle est une caractéristique de toutes les souches bactériennes appartenant à la même espèce. Étant donné que c'est une résistance située sur le chromosome, elle est transmise à la génération descendante par « transfert vertical » d'une cellule mère à une cellule fille. La résistance naturelle ne se transmet pas d'une bactérie à une autre. Ce type de résistance peut être dû soit à une imperméabilité membranaire, soit à une destruction enzymatique de l'antibiotique par des enzymes intracellulaires. La résistance acquise correspond à l'acquisition d'une nouvelle résistance par une souche normalement sensible à l'antibiotique concerné. Elle peut provenir d'une mutation chromosomique ou de l'acquisition d'un nouveau support génétique via le transfert horizontal. Ce dernier présente un réel risque pour la santé mondiale (C. Reygaert 2018).

### 2.1.1. Résistance endogène par mutation chromosomique

La résistance acquise par mutation chromosomique est un phénomène naturel qui se produit spontanément au cours de la division cellulaire, par exemple par erreur de copie. Les modifications engendrées par ces mutations sont souvent structurelles. Elles peuvent se traduire soit par une modification de la perméabilité membranaire à un ou plusieurs antibiotiques, soit par une modification de l'affinité des cibles spécifiques des antibiotiques, telles que les protéines (C. Reygaert 2018). L'une des principales causes de ce type de résistance est la pression sélective exercée par les antibiotiques. Kohanski et al. (2010) ont montré que lors de l'exposition des souches bactériennes à des doses inhibitrices d'antibiotiques, le stress causé par les antibiotiques augmente la fréquence des mutations, donnant ainsi naissance à de nouvelles souches mutantes « résistantes ». De la même manière, l'exposition à des concentrations sub-inhibitrices engendre un stress oxydatif. Ceci entraîne l'apparition de nouveaux phénotypes de bactéries, dites multirésistantes, qui portent des résistances à plus de trois familles différentes d'antibiotiques (Kohanski et al. 2010).

### 2.1.2. Résistance exogène par transfert horizontal des gènes

Dans la problématique de la dissémination des gènes de résistance aux antibiotiques, on parle souvent de transfert horizontal des gènes (HGT) (Dodd 2012), (von Wintersdorff et al.

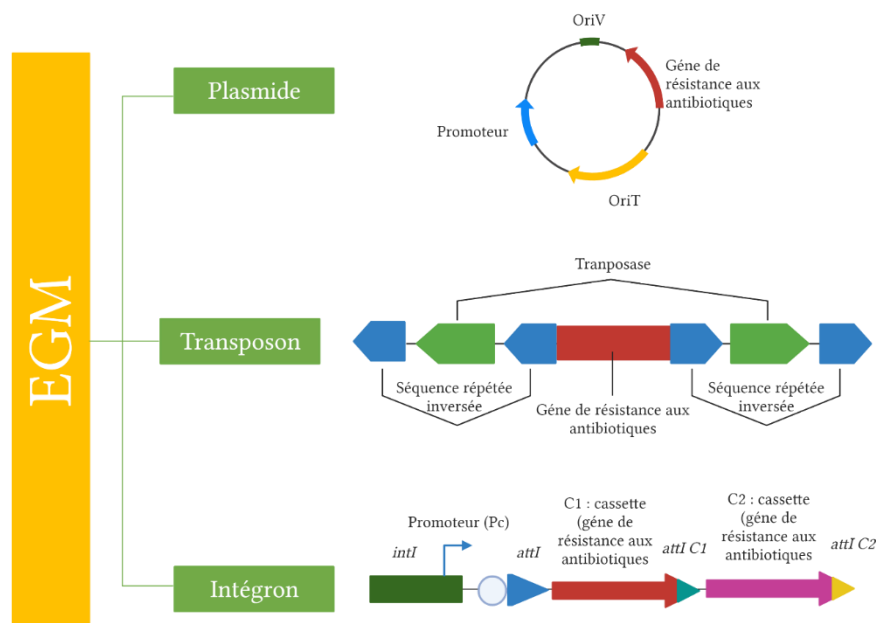
2016), (Uluseker et al. 2021). Ce processus implique trois mécanismes différents : la conjugaison, la transformation et la transduction. Ces mécanismes sont souvent associés à des éléments génétiques mobiles (EGM) tels que les plasmides, les transposons et les intégrons. Ces derniers sont des fragments d'ADN portant généralement une ou plusieurs résistances aux antibiotiques.

### 2.1.2.1. Eléments génétiques mobiles

Les plasmides sont des ADN extrachromosomiques circulaires à double brin (Figure 6) (Zaneveld et al. 2008), (Rozwadowski et Gawel 2022). Ce sont des éléments génétiques autonomes pouvant se répliquer de manière indépendante dans les bactéries hôtes et se transmettre de façon régulière et stable d'une bactérie mère à une bactérie fille. Leur taille varie de quelques kilobases (kb) à 500 kb. Bien que les plasmides ne soient pas essentiels à la survie des bactéries, ils représentent un avantage majeur pour leur adaptation à des conditions environnementales particulières et difficiles. En général, les plasmides se constituent de cinq principaux éléments. L'origine de répllication (OriV) est la région de l'ADN où la répllication du plasmide commence. L'OriV contient les séquences nécessaires à l'initiation et à la régulation de la répllication du plasmide. La séquence codant pour une résistance spécifique ; les plasmides peuvent contenir différents types de gènes qui confèrent aux bactéries des caractéristiques spécifiques. Par exemple, un plasmide peut porter des gènes de résistance aux antibiotiques, des gènes de dégradation de certains composés chimiques, des gènes de virulence, des gènes de métabolisme, etc. Le marqueur de sélection permet de distinguer les cellules bactériennes qui ont acquis le plasmide de celles qui ne l'ont pas. Et une origine de transfert (OriT) est la région du plasmide impliquée dans le processus de transfert du plasmide d'une cellule à une autre, soit par conjugaison (transfert de plasmides entre bactéries), soit par transfert horizontal d'ADN (par exemple, lors de la transformation ou de la transduction).

Les transposons, également appelés éléments transposables, sont des séquences d'ADN qui ont la capacité de se déplacer d'un endroit à un autre dans le génome d'un organisme (Figure 6) (Zaneveld et al. 2008), (Rozwadowski et Gawel 2022). Ils peuvent se déplacer sur le même brin d'ADN (transposition intramoléculaire) ou se déplacer vers un autre brin d'ADN (transposition intermoléculaire). Les transposons sont souvent constitués de deux extrémités terminales répétées qui entourent un gène ou une séquence d'ADN. Ils contiennent généralement un gène codant pour une enzyme appelée transposase, qui catalyse le processus de transposition en coupant l'ADN au niveau des extrémités terminales répétées et en intégrant l'élément transposable à une nouvelle position dans le génome.

Les intégrons sont des systèmes génétiques présents dans certaines bactéries et qui permettent la capture, l'accumulation et l'expression de gènes sous forme de cassettes (Figure 6) (Zaneveld et al. 2008), (Rozwadowski et Gawel 2022). La structure d'un intégron comprend généralement trois composants principaux. Un site d'intégration (*attI*) est la région de l'intégron où les cassettes géniques peuvent être insérées. Les cassettes géniques, qui sont de petites séquences d'ADN contenant un ou plusieurs gènes, contiennent généralement un promoteur de transcription et une séquence codant pour un gène spécifique. Les cassettes peuvent porter des gènes conférant des résistances aux antibiotiques, des gènes de virulence ou d'autres caractéristiques adaptatives. Et un site de recombinaison (*attC*) ; en effet, les cassettes géniques sont intégrées dans l'intégron grâce à la recombinaison entre le site d'intégration (*attI*) de l'intégron et le site de recombinaison (*attC*) de la cassette génique. Cette recombinaison est catalysée par une enzyme appelée intégrase. Les intégrons permettent aux bactéries d'acquérir rapidement de nouveaux gènes en capturant des cassettes géniques contenant des gènes bénéfiques pour leur survie ou leur adaptation à des environnements changeants. Ils jouent un rôle important dans la dissémination de la résistance aux antibiotiques chez les bactéries pathogènes. Ce sont les éléments génétiques mobiles les plus souvent présents dans les plasmides et ont un rôle majeur dans la propagation de la résistance aux antibiotiques pour les entérobactéries (Chow et al. 2015). Plus de 80 % des résistances aux antibiotiques des entérobactéries sont attribuées aux intégrons (Tenailon et al. 2010), (Marchant et al. 2013).



**Figure 6** *Éléments génétiques mobiles (MGE) : les transposons, les intégrons et les plasmides sont les principaux moteurs de la propagation de la résistance aux antimicrobiens chez de nombreuses bactéries, adaptée de (Rozwadowski et Gawel 2022).*

### 2.1.2.2. Mécanismes de transfert horizontal des gènes

La conjugaison bactérienne est largement reconnue comme l'un des mécanismes de transfert horizontal des gènes les plus répandus dans l'environnement aquatique (Zaneveld et al. 2008), (Dodd 2012), (von Wintersdorff et al. 2016). La conjugaison permet le transfert direct d'ADN d'une bactérie donneuse à une bactérie réceptrice par l'intermédiaire d'un pilus sexuel (Figure 7.a). Le processus de conjugaison commence lorsque la bactérie donneuse, qui porte un élément génétique mobile appelé plasmide de conjugaison, établit un contact physique avec une bactérie réceptrice. Le pilus sexuel, une structure protéique allongée, se forme à partir de la bactérie donneuse et se lie à la bactérie réceptrice, établissant ainsi un pont cytoplasmique entre les deux cellules. À travers ce pont, l'ADN du plasmide est transféré de la bactérie donneuse à la bactérie réceptrice. Cet ADN peut contenir des gènes de résistance aux antibiotiques ou d'autres gènes bénéfiques. Une fois que l'ADN est entré dans la bactérie réceptrice, il peut être intégré dans le génome de la cellule réceptrice ou exister sous forme de plasmide indépendant. La conjugaison bactérienne est particulièrement prévalente dans les environnements aquatiques en raison de la grande disponibilité d'eau comme milieu de transport. Les bactéries aquatiques peuvent entrer en contact physique plus facilement, favorisant ainsi le processus de conjugaison. De plus, les environnements aquatiques peuvent contenir une grande diversité de bactéries, y compris des bactéries pathogènes et des bactéries porteuses de gènes de résistance aux antibiotiques. Cela crée un environnement propice à la conjugaison et à la propagation des gènes de résistance dans les populations bactériennes.

Le deuxième mécanisme impliqué dans le transfert de gènes de résistance par voie horizontale est la transformation bactérienne (Figure 7.b) (Zaneveld et al. 2008), (Dodd 2012), (von Wintersdorff et al. 2016). Elle implique l'incorporation d'ADN extracellulaire dans le cytoplasme d'une bactérie réceptrice. Pour que la transformation se produise, la bactérie réceptrice doit être dans un état physiologique spécifique appelé "état de compétence". L'état de compétence est un état transitoire et limité dans le temps, qui est induit en réponse à des conditions environnementales particulières telles que le manque de nutriments, la température, le pH ou la présence de stress oxydatif. Lorsque la bactérie est dans cet état, elle est capable de capturer et d'incorporer de l'ADN environnant. Le processus de transformation commence par la fixation de l'ADN double brin sur des récepteurs spécifiques situés à la surface de la membrane cellulaire de la bactérie réceptrice. Ensuite, l'ADN est transloqué à travers la membrane cellulaire et clivé en brins simples. Ces brins simples peuvent ensuite être intégrés dans le génome de la bactérie réceptrice ou dans son ADN plasmidique. Une fois que l'ADN étranger est intégré, il peut être exprimé et transmis à la descendance de la bactérie réceptrice. Cela permet la propagation

des gènes de résistance aux antibiotiques ou à d'autres traits bénéfiques au sein de la population bactérienne. La transformation bactérienne est un mécanisme important dans la dissémination de la résistance aux antibiotiques, car elle permet aux bactéries de recevoir de nouveaux gènes de résistance sans avoir besoin de les acquérir par mutation ou par d'autres mécanismes de transfert génétique.

La transduction est un mécanisme de transfert horizontal des gènes (HGT) qui se produit à une fréquence relativement faible dans l'environnement. La transduction est un processus par lequel des fragments d'ADN sont transférés d'une bactérie donneuse à une bactérie réceptrice par l'intermédiaire de bactériophages, des virus qui infectent spécifiquement les bactéries (Figure 7.c) (Zaneveld et al. 2008), (Dodd 2012), (von Wintersdorff et al. 2016). Lorsqu'un bactériophage infecte une bactérie, il injecte son matériel génétique dans la cellule bactérienne hôte. Dans certains cas, au lieu de répliquer le matériel génétique du bactériophage, la machinerie de réplication de la bactérie hôte peut également répliquer l'ADN bactérien environnant. Cela peut inclure des gènes de résistance aux antibiotiques ou d'autres gènes d'intérêt présents dans la bactérie donneuse. Lorsque de nouveaux bactériophages se forment à l'intérieur de la cellule bactérienne hôte, ils peuvent encapsider ces fragments d'ADN bactérien. Lorsque ces bactériophages infectent d'autres bactéries, ils peuvent transmettre ces fragments d'ADN bactérien à la bactérie réceptrice. Cela peut conduire à l'acquisition de nouveaux gènes et à la propagation de caractères tels que la résistance aux antibiotiques dans la population bactérienne.

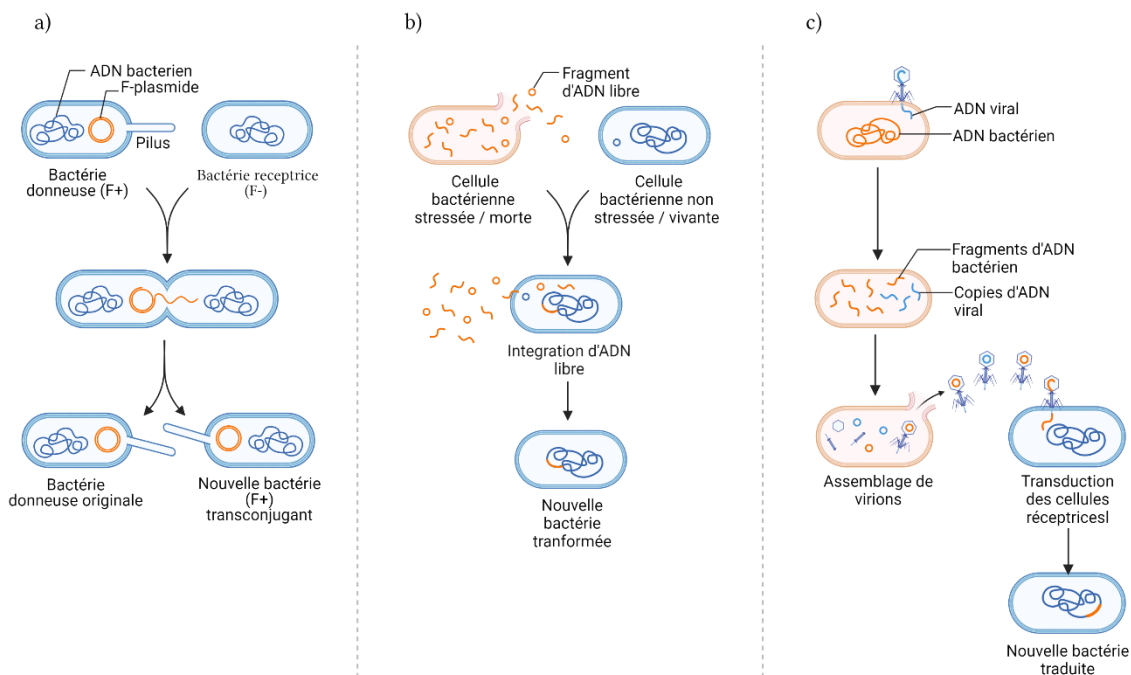


Figure 7 Les mécanismes de HGT : a) conjugaison, b) transformation, c) transduction, adaptée de *Conjugaison, Transformation, Transduction*, adaptée de (Zaneveld et al. 2008), (Dodd 2012), (von Wintersdorff et al. 2016).

## 2.2. Diversité des entérobactéries résistantes aux antibiotiques dans l'environnement aquatique

Au cours des dernières décennies, la menace croissante que représentent les bactéries résistantes aux antibiotiques pour la santé humaine a attiré l'attention sur l'environnement aquatique. Récemment, il a été démontré qu'il existe un lien étroit entre l'environnement aquatique et la dissémination des bactéries résistantes aux antibiotiques (ARB), des gènes de résistance aux antibiotiques (ARGs) et des éléments génétiques mobiles (EGM) (Rochelle-Newall et al. 2015), (Van Duin et al. 2017), (Paruch et al. 2019), (Triggiano et al. 2020).

Un exemple typique de milieux aquatiques est représenté par les stations d'épuration. Ces dernières sont considérées comme des points chauds pour la propagation des ARB et des ARGs dans l'environnement. Avec un microbiote intestinal d'origine humaine et animale, elles contiennent un large éventail de bactéries appartenant à la famille des entérobactéries. De nombreuses recherches soulignent la présence des entérobactéries résistantes aux antibiotiques dans les stations d'épuration et leur persistance après le traitement des effluents. Le Tableau 1 présente une liste non exhaustive des ARB identifiées dans les eaux usées. Verburg et al. (2019) ont examiné le devenir des ARB après un traitement des eaux usées dans une station d'épuration municipale aux Pays-Bas. L'analyse a été réalisée sur 2886 isolats de trois espèces différentes (*E. coli*, *Klebsiella spp.*, *Aeromonas spp.*) obtenus avant et après le traitement des eaux usées. Les isolats ont été testés pour leur sensibilité aux antibiotiques, notamment aux  $\beta$ -lactamines, aux céphalosporines, aux fluoroquinolones, aux carbapénèmes et aux gentamicines. Les trois espèces ont montré des résistances à ces antibiotiques. Les résultats ont révélé que la concentration bactérienne est passée de 8 log CFU.L<sup>-1</sup> à 5 log CFU.L<sup>-1</sup>, soit une réduction de 3 log, indiquant une libération de ces espèces bactériennes dans la rivière réceptrice. Łuczkiwicz et al. (2010) ont évalué l'abondance de *E. coli* et des entérocoques dans une station d'épuration. Les tests de sensibilité aux antibiotiques ont montré que 48 % des isolats de *E. coli* étaient résistants à la pénicilline et à la tétracycline. Les souches d'entérocoques, y compris *Enterococcus faecium* (60,8 %) et *Enterococcus faecalis* (22,1 %), présentaient des résistances aux nitrofurantoïnes, aux érythromycines, aux ciprofloxacines et aux tétracyclines. L'abondance de ces espèces résistantes dans la station d'épuration après traitement a été supérieure à 4 log.100 ml<sup>-1</sup>.

En outre, la présence des gènes de résistance aux antibiotiques dans les stations d'épuration suscite également l'attention depuis 2005. Une analyse des données de la littérature sur la diversité des ARGs dans les stations d'épuration a montré que les ARGs couramment



détectés comprennent les gènes de résistance aux  $\beta$ -lactamines (*bla*<sub>CTXM</sub>, *bla*<sub>TEM</sub>, *bla*<sub>OXA-A</sub>), quinolones (*qnrS*, *qnrC*, *qnrD*), sulfonamides (*sul1*, *sul2*, *dhfr1*), tétracyclines (*tetA*, *tetB*, *tetE*), macrolides (*ereA*, *ermB*, *ermC*, *erm43*) et des éléments génétiques mobiles tels que les intégrons de classe 1 (*int1*) (Pazda et al. 2019). Le Tableau 1 présente la liste des ARGs identifiés dans les eaux usées. Pärnänen et al. (2019) ont étudié la prévalence des ARGs dans 12 stations d'épuration situées en Europe. Les résultats ont montré que les gènes codant pour la résistance aux  $\beta$ -lactamines (*bla*<sub>GES</sub>, *bla*<sub>OXA</sub>, *bla*<sub>VEB</sub>), aux macrolides (*ereA*, *ermF*), aux sulfamides (*sul1*), aux tétracyclines (*tetM*, *tetQ*) et aux aminoglycosides (*aadA* et *strB*) ont été détectés en amont et en aval des stations d'épuration.

Les méthodes de traitement traditionnelles utilisées dans les stations d'épuration des eaux usées sont principalement axées sur l'élimination des contaminants organiques et la réduction de la charge polluante. Ces procédés incluent généralement des étapes telles que le prétraitement mécanique, la décantation, la digestion anaérobie, l'aération biologique et la filtration. Ces procédés sont efficaces pour éliminer une variété de composés tels que les solvants, les pesticides, les produits pharmaceutiques et d'autres produits chimiques d'origine anthropique présents dans les eaux usées, visant principalement à améliorer la qualité générale de l'eau traitée afin de respecter les normes réglementaires avant son rejet dans l'environnement. Cependant, ces méthodes traditionnelles ne sont pas spécifiquement conçues pour cibler les bactéries résistantes aux antibiotiques (ARB), les gènes de résistance aux antibiotiques (ARGs) et les éléments génétiques mobiles (EGM). Lorsque les eaux usées traitées, qui contiennent potentiellement des ARB, des ARGs et des EGM, sont rejetées dans les écosystèmes aquatiques tels que les rivières, les lacs ou les océans, ces contaminants peuvent être transférés aux organismes aquatiques. Les bactéries résistantes peuvent infecter les organismes aquatiques, et les ARGs peuvent être transférés à d'autres bactéries présentes dans l'environnement. Cela peut conduire au développement et à la dissémination de la résistance aux antibiotiques dans les écosystèmes aquatiques.

Pour faire face à ces défis, il est essentiel de développer de nouvelles technologies de traitement des eaux usées qui soient plus efficaces et accessibles. Ces technologies doivent être capables d'éliminer de manière sélective et efficace les ARB, les ARGs et les EGM afin de prévenir leur propagation dans les milieux aquatiques. Des approches novatrices telles que les procédés d'oxydation avancée (AOP), la filtration membranaire et l'utilisation de biofilms spécifiques pour la dégradation des contaminants peuvent jouer un rôle crucial dans le développement de ces nouvelles technologies de traitement des eaux usées. Ces méthodes permettent de cibler et d'éliminer spécifiquement les contaminants, offrant ainsi des résultats plus prometteurs que les

méthodes traditionnelles. En outre, il est important d'adopter une approche globale pour lutter contre la résistance aux antibiotiques. Cela implique d'intégrer des mesures de prévention de la contamination dans les pratiques médicales, vétérinaires et agricoles, ainsi que de promouvoir une utilisation responsable des antibiotiques.

**Table 1** Principaux des ARB et ARGs identifiés dans l'influent, l'effluent et les boues activées des stations d'épuration, adapté de (Pazda et al. 2019)

ARB et ARGs	Profils de résistance aux antibiotiques	Origine	ÉCHANTILLON DE LA STEP				Pays	References
			Amont	Boues actives	Aval	Concentrations d'ARB ou d'ARGs après traitement		
ARB								
<i>Escherichia coli</i>	Ciprofloxacine, cotrimoxazole, ampicillin	Hôpital, établissement de soins et station d'épuration	+	na *	+	5 log	Pays bas	(Verburg et al. 2019)
<i>Enterococcus</i>	Penicillin G, ampicillin, vancomycin	Industrie, hôpital et maisons de retraite	+	na *	+	2 log	Allemagne	(Gallert et al. 2005)
<i>Staphylococcus aureus</i>	Multi-résistant	Station d'épuration	na *	na *	+	nd	USA	(Rosenberg Goldstein et al. 2014)
<i>Klebsiella spp.</i>	Ciprofloxacine, cotrimoxazole, ampicillin, triméthoprim	Hôpital, établissement de soins et station d'épuration	+	na *	+	5 log	Pays bas	(Verburg et al. 2019)
<i>Aeromonas spp.</i>	Ciprofloxacine, cotrimoxazole, ampicillin, triméthoprim	Hôpital, établissement de soins et station d'épuration	+	na *	+	5 log	Pays bas	(Verburg et al. 2019)
ARGs								
<i>ampR</i>	Beta-lactams	Station d'épuration	+	na *	+	réduction	Canada	(Biswal et al. 2014)
<i>bla<sub>AmpC</sub></i>		Hôpital, point de collecte des eaux usées de la communauté, et rivières réceptrices	+	na *	+	Augmentation	Allemagne	(Alexander et al. 2015)
<i>bla<sub>TEM</sub></i>		Hôpital, domestique et industrie	+	na *	+	Augmentation	Portugal	(Amador et al. 2015)
<i>mecA</i>		Point de collecte des eaux usées de la communauté et rivières réceptrices	+	na *	+	nd *	Canada	(Neudorf et al. 2017)
<i>tetA</i>	Tetracycline	Station d'épuration	na *	+	+	nd *	Allemagne	(Szczepanowski et al. 2009)
			+	na *	+	Augmentation	Canada	(Biswal et al. 2014)
			+	+	+	réduction	China	(Ying Yang et al. 2014)
+	+		+	réduction	(Zhang et Zhang 2011)			
<i>mdtG</i>	Multidrug efflux pump genes		+	+	+	réduction	China	(Ying Yang et al. 2014)
<i>mdtH</i>			+	+	+			
<i>mdtN</i>		+	+	+				

na \*—non analysé ; nd \*—pas de différence ; +—détecté.

### 3. Plasma non-thermique à la pression atmosphérique

Le terme « plasma » a été introduit en 1920 par Irving Langmuir, par analogie avec le plasma sanguin qui transporte les globules rouges et blancs. Le plasma désigne, au sens large, des particules chargées dans un gaz ionisé soumis à un champ électrique. Le plasma est considéré comme le quatrième état de la matière (solide, liquide, gaz et plasma) (Figure 8). Lorsque l'énergie apportée au gaz est suffisamment grande, le nombre de collisions entre les particules s'accroît, conduisant à la formation de charges positives jusqu'à atteindre une quasi-neutralité avec les charges négatives. C'est l'état de plasma. Le plasma est donc un gaz, partiellement ou totalement ionisé, composé de nombreuses espèces réactives chargées (ions et électrons) et d'espèces réactives neutres (atomes, molécules et radicaux) (Misra et al. 2016).

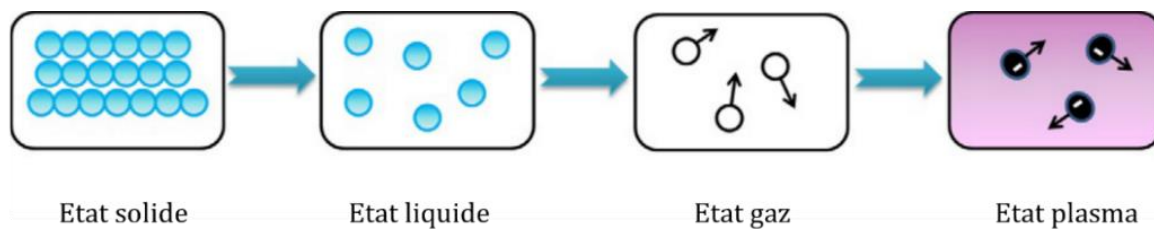


Figure 8 Les états de la matière, adaptée de (Misra et al. 2016).

#### 3.1. Propriétés fondamentales du plasma

##### 3.1.1. Degré d'ionisation

Un gaz est un isolant électrique. L'application d'un champ électrique intense entraîne l'ionisation de ses particules, transformant ainsi le gaz en conducteur. Le degré d'ionisation ( $\delta$ ) d'un plasma est la proportion de particules chargées par rapport au nombre total de particules (neutres et ions). Cette grandeur permet de différencier les plasmas fortement ionisés, appelés « chauds », et les plasmas faiblement ionisés, appelés « froids ». On parle de plasma fortement ionisé lorsque son degré d'ionisation est  $\delta > 10^{-4}$ . Un exemple naturel de ce type de plasma est le soleil, soumis à deux types de forces collisionnelles : électron-électron et électron-ion. En revanche, un plasma faiblement ionisé possède un degré d'ionisation  $\delta \leq 10^{-4}$  et est dominé par les collisions électron-neutre. La foudre et les aurores boréales sont des exemples de plasmas froids naturels. Grâce à leur facilité de mise en œuvre en laboratoire, les plasmas froids sont utilisés dans de nombreux domaines d'application tels que la microélectronique, le biomédical, l'agroalimentaire et la décontamination des surfaces et des liquides (Misra et al. 2016). Le plasma étudié dans cette thèse est un plasma froid.

### 3.1.2. Température

Dans les plasmas froids, deux catégories sont distinguées : les plasmas à l'équilibre thermodynamique et les plasmas hors équilibre thermodynamique. Par définition, un état d'équilibre thermodynamique est un système dans lequel toutes les particules - électrons ( $T_e$ ), ions ( $T_i$ ), neutres ( $T_g$ ) - possèdent la même température. Dans le cas des plasmas thermiques, dits à l'équilibre thermodynamique, toutes les particules composant le plasma ont la même température. On note  $T_e = T_i = T_g$ . En revanche, dans les plasmas non-thermiques (ou hors équilibre thermodynamique), la température des électrons est comprise entre 1000 et 10000 kelvins, tandis que celle des ions et celle des espèces neutres avoisinent la température ambiante. On note  $T_e \gg T_i = T_g$ . Ce type de plasma se caractérise aussi par la température des états excités, notamment les états vibrationnels qui sont un réservoir d'énergie souvent à l'origine de la dynamique du gaz. Les plasmas non-thermiques suscitent un vif intérêt du fait de leurs caractéristiques chimiques en termes d'espèces réactives.

### 3.2. Génération d'un plasma

La création d'un plasma à partir d'un gaz consiste en la dissociation d'au moins un électron de ses atomes. Cette dissociation est établie en appliquant un champ électrique. La création du plasma est principalement régie par des collisions de type inélastiques, impliquant les processus d'ionisation et d'excitation entre les particules du gaz. Lorsqu'un champ électrique est généré dans un gaz, les électrons présents dans le milieu sont accélérés. Si un électron atteint une énergie supérieure au potentiel d'ionisation de l'atome, l'ionisation de ce dernier peut se produire. L'électron est alors arraché de la couche de valence de l'atome. Cette ionisation transforme l'atome neutre en un ion positif. Dans ce cas, l'ionisation est dite positive. Les électrons ainsi libérés vont à leur tour entrer en collision avec les autres atomes du gaz : un plasma est produit. Le maintien du champ électrique dans le gaz permet de maintenir le plasma (Misra et al. 2016).

### 3.3. Source de plasma non-thermique à la pression atmosphérique

De nombreuses décharges plasma ont été étudiées pour le traitement des liquides, telles que la décharge luminescente, la décharge corona, la décharge à barrière diélectrique (DBD), et les jets plasma à pression atmosphérique (JPPA) (Bruggeman et Leys 2009), (B. Jiang et al. 2014), (Vanraes et al. 2016), (Kumar et al. 2021). Ces décharges fonctionnent avec différents signaux

d'alimentation (continus ou alternatifs), une large gamme de fréquences, du Hz au MHz, avec des signaux pulsés ou sinusoïdaux, des configurations d'électrodes différentes (avec ou sans diélectrique), ainsi qu'avec divers gaz de travail (par exemple l'air, l'oxygène, l'hélium, l'argon, etc.). En ce qui concerne ce travail, nous nous sommes intéressés à un jet plasma basé sur une décharge à barrière diélectrique à pression atmosphérique.

### 3.3.1. Décharges à barrières diélectriques

Les décharges à barrière diélectrique (DBD) sont des plasmas générés entre une ou deux électrodes et une barrière diélectrique (B. Jiang et al. 2014). Les matériaux isolants typiques des barrières diélectriques sont le verre, le quartz et la céramique (Vanraes et al. 2016). La présence d'un diélectrique empêche le passage direct du courant dans le plasma entre les deux électrodes et ainsi la formation d'un arc électrique. Ce dernier est un canal de plasma où la température du gaz est égale à celle des électrons. Le fait d'empêcher la formation d'un arc empêche donc le gaz de s'échauffer et permet de maintenir le plasma à l'état non-thermique.

La géométrie des électrodes joue un rôle important dans la détermination de l'intensité du champ électrique entre l'espace inter-électrodes où le plasma se forme, notamment la distance inter-électrodes et l'épaisseur de la barrière diélectrique. Différentes configurations d'électrodes sont présentées dans la littérature, dont les plus étudiées sont dans une configuration plan-plan et cylindrique (Figure 9) (Wagner et al. 2003), (Bruggeman et Leys 2009). Les DBD peuvent fonctionner avec une tension alternative sur une large bande de fréquences (50 Hz - 1 MHz). Les décharges DBD peuvent être générées en utilisant différents gaz : He, Ar, O<sub>2</sub>, N<sub>2</sub> et l'air.

Les décharges DBD sont simples à réaliser, stables, fiables et économiques. Ces avantages ont conduit à un certain nombre d'applications, telles que la production industrielle d'ozone, la modification de surface et le dépôt chimique en phase vapeur assisté par plasma. Les sources DBD permettent de générer un plasma homogène, ce qui présente des avantages pour des applications biologiques. Un grand nombre de configurations de décharge ont été développées et appliquées pour la décontamination des liquides, pour des applications émergentes telles que le traitement des eaux. Il a été démontré que les décharges électriques de type DBD en contact avec un liquide engendrent une grande variété de conditions physiques (particules chargées, UV) et chimiques (radicaux d'oxygène et d'azote) qui peuvent directement ou indirectement causer la dégradation des composés inorganiques tels que les substances pharmaceutiques et des composés organiques comme les microorganismes (B. Jiang et al. 2014), (Kumar et al. 2021).

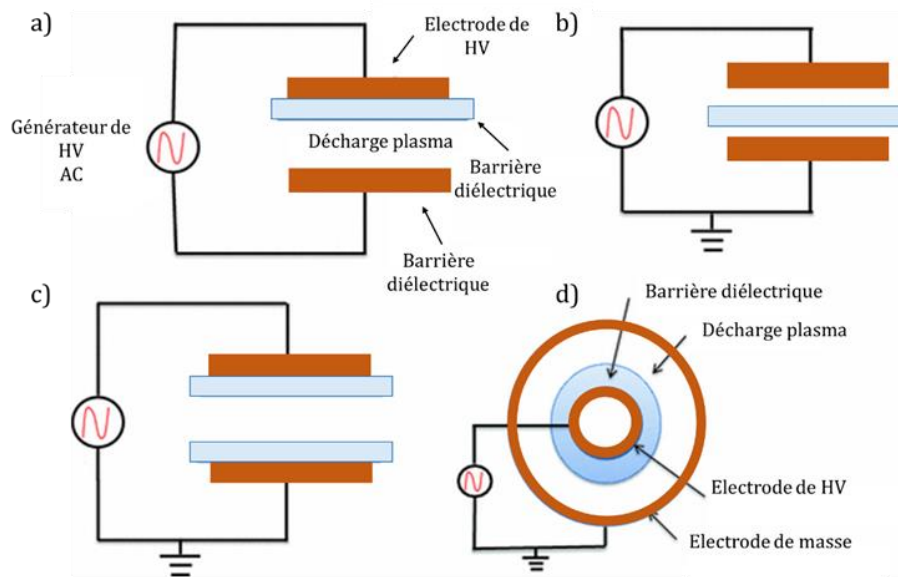
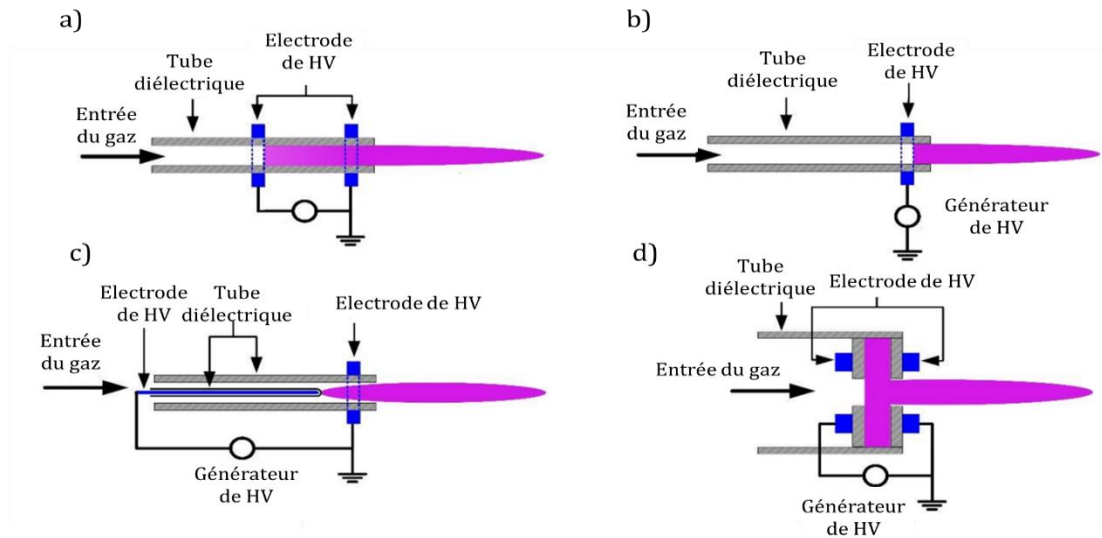


Figure 9 Les diverses configurations des décharges DBD : a), b) et c) plan-plan, d) cylindrique, adaptée (Wagner et al. 2003).

### 3.3.2. Jets plasma

Les jets plasma à pression atmosphérique (JPPA) sont parmi les sources les plus étudiées. Ils sont utilisés dans le domaine biomédical, la production d'eau activée par plasma ainsi que dans le traitement des surfaces et des liquides. Différentes configurations d'électrodes ont été développées pour générer des JPPA. Les configurations les plus répandues sont les JPPA basés sur le principe DBD. Lu et al. (2012) ont classé ces configurations en quatre catégories. La Figure 10 montre les différentes catégories en fonction du nombre d'électrodes et de la position des électrodes vis-à-vis du diélectrique.

Les JPPA sont généralement constitués d'un tube, avec une ou deux électrodes et d'un gaz d'alimentation circulant à l'intérieur du tube diélectrique (Lu et al. 2012), (Vanraes et al. 2016). Dans le cas d'une configuration avec deux électrodes, l'application d'un champ électrique entre les deux électrodes entraîne l'ionisation du gaz dans le tube. Le plasma est créé initialement à l'intérieur d'un tube diélectrique puis s'étend sur plusieurs centimètres dans l'environnement ambiant. Les JPPA fonctionnent avec une alimentation, pulsée ou sinusoïdale, à des fréquences qui varient entre le kHz et le MHz, en utilisant des gaz nobles tels que l'hélium. Néanmoins, ils peuvent être mélangés avec un petit pourcentage de gaz réactifs, comme l' $O_2$  ou l'air pour augmenter la réactivité.



**Figure 10** les diverses configurations JPPA : a) jet avec deux électrodes annulaires, b) jet avec une seule électrode annulaire, c) jet avec une électrode à broche et une électrode annulaire, d) jet avec deux électrodes annulaires fixées à la surface de deux disques diélectriques perforés au centre, adaptée de (Lu et al. 2012).

### 3.4. Interactions plasma-liquide

Les réactions dans le plasma sont principalement pilotées par les électrons (Misra et al. 2016). Les collisions électron-atome et électron-molécule génèrent des espèces réactives par ionisation, dissociation et excitation. En raison de ces processus de collision, une grande variété d'espèces réactives peut être trouvée dans la région centrale du plasma, où la majeure partie de l'énergie est dissipée, ainsi que dans la région du jet plasma, qui commence à la sortie du tube diélectrique et s'étend dans l'environnement ambiant. La génération et la dissociation des espèces réactives dépendent de plusieurs paramètres, notamment de la configuration des électrodes, des conditions électriques (forme, fréquence), des conditions chimiques liées au gaz d'alimentation et des conditions ambiantes relatives à la nature de la cible (Bruggeman et Leys 2009), (Bruggeman et al. 2016). Un jet plasma à la surface d'un liquide entraîne une succession de réactions physiques et chimiques qui ont lieu dans les différentes phases. Ces réactions sont à l'origine de la formation des espèces réactives de l'oxygène et de l'azote (RONS).

Les interactions d'un jet plasma à la surface d'un liquide sont réparties en trois principales phases (Figure 11) (Bruggeman et al. 2016), (Perinban et al. 2019). La première phase est la phase gazeuse. Elle correspond au siège de la formation des espèces réactives primaires. Il s'agit d'espèces moléculaires et atomiques telles que les radicaux hydroxyles ( $\text{OH}\cdot$ ), les radicaux d'oxyde d'azote ( $\text{ON}\cdot$ ), les radicaux super-oxydes ( $\text{O}_2\cdot^-$ ), l'oxygène atomique ( $\text{O}$ ), l'oxygène singulet ( $^1\text{O}_2$ ) et l'azote excité ( $\text{N}$ ). Ces espèces sont directement produites dans la région de décharge en raison de

l'interaction entre les électrons et les molécules du gaz d'alimentation. Ces espèces ont une durée de vie relativement courte et leur concentration dans la région de la décharge est très élevée. La deuxième phase correspond à l'interface plasma-liquide. Les réactions chimiques produites à ce niveau sont le résultat des interactions entre les espèces réactives primaires et les molécules présentes dans l'environnement ambiant. Ces espèces sont converties en espèces secondaires à longue durée de vie, telles que le peroxyde d'hydrogène ( $H_2O_2$ ), le nitrate ( $NO_2$ ), le nitrite ( $NO_3$ ) et l'ozone ( $O_3$ ). En contact avec la surface du liquide, ces espèces diffusent dans le liquide, ce qui correspond à la troisième phase. Les principales espèces réactives produites sont  $ONOO^-$ ,  $ONOOH$ ,  $NO_2^-$ ,  $NO_3^-$  et  $H_2O_2$ . Un aperçu des principales voies de formation de ces espèces sera présenté dans les parties suivantes.

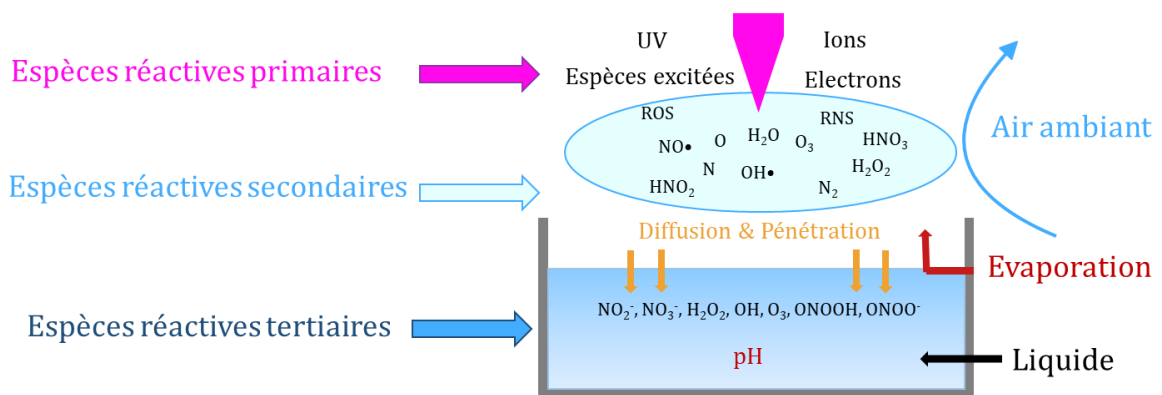


Figure 11 Les diverses espèces réactives formées dans la phase gazeuse, l'interface plasma liquide et dans le liquide, adaptée (Bruggeman et al. 2016).

### 3.4.1. Espèces réactives de l'oxygène

Les espèces réactives de l'oxygène (ROS) jouent un rôle important dans le processus d'inactivation microbienne par plasma. Les principaux ROS produits concernent les radicaux hydroxyles ( $OH\cdot$ ), l'oxygène singulet ( $^1O_2$ ), les radicaux superoxydes ( $O_2\cdot^-$ ), le peroxyde d'hydrogène ( $H_2O_2$ ) et l'ozone ( $O_3$ ) (Lukes et al. 2014), (Bruggeman et al. 2016), (Perinban et al. 2019).

Les radicaux hydroxyles ( $OH\cdot$ ) générés en phase gazeuse se forment par la dissociation de la vapeur d'eau via des collisions avec les électrons ou les particules excitées. Avec un potentiel d'oxydation de 2.8 eV, c'est l'espèce la plus réactive parmi les ROS (J. Jiang et al. 2016), (Lukes et al. 2014). Il agit comme un précurseur de la production de  $H_2O_2$ . Les radicaux superoxydes ( $O_2\cdot^-$ ) ont une durée de vie plus longue (5 s) en solution aqueuse et dans des conditions de faible pH. Ils



sont convertis en radicaux hydroxyperoxyde ( $\text{HO}_2\cdot$ ) par la voie (1). En présence d'oxyde d'azote, les radicaux superoxydes forment l'anion peroxydinitrite ( $\text{ONOO}^-$ ) par la voie (2), qui est un agent antimicrobien puissant (Attri et al. 2015). L'augmentation des ions  $\text{H}^+$  dans le liquide due à la dissociation des molécules d'eau augmente la conductivité électrique et diminue le pH dans le milieu liquide (Lukes et al. 2014), (J. Jiang et al. 2016). Lorsque le pH de la solution est réduit à une valeur critique d'environ 4,5, les ions  $\text{HO}_2\cdot$  et  $\text{O}_2$  réduisent les hydroxydes en peroxyde d'hydrogène ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) (3). Ce dernier est l'une des ROS les plus importantes pour l'inactivation bactérienne (Lukes et al. 2014).  $\text{H}_2\text{O}_2$  est un oxydant puissant, et son potentiel oxydant augmente dans un environnement acide. Il fait partie des ROS à longue durée de vie. La solubilité de  $\text{H}_2\text{O}_2$  en phase gazeuse joue un rôle important dans la génération de  $\text{H}_2\text{O}_2$  en phase liquide. Winter et al. 2014 suggèrent que la formation de  $\text{H}_2\text{O}_2$  ne se fait pas par la dissociation des molécules d'eau, mais plutôt par la diffusion de  $\text{H}_2\text{O}_2$  de la phase gazeuse dans la phase liquide. Les espèces précurseurs de  $\text{H}_2\text{O}_2$  sont les radicaux hydroxydes ( $\text{OH}\cdot$ ), l'oxygène singulet ( $^1\text{O}_2$ ) et les radicaux superoxydes ( $\text{O}_2\cdot$ ).

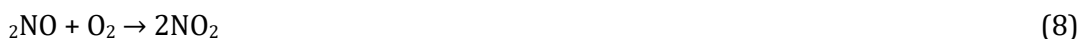


### 3.4.2. Espèces réactives de l'azote

Les espèces réactives de l'azote (RNS) sont initialement produites dans la phase gazeuse. L'azote atomique est le principal précurseur des RNS. Il réagit avec l'oxygène moléculaire selon les équations (4 - 7) :



Dans le liquide  $\text{NO}$ ,  $\text{NO}_2$  et  $\text{O}_2$  réagissent principalement avec  $\text{H}_2\text{O}$ , ce qui entraîne la production de  $\text{NO}_2^-$  et  $\text{NO}_3^-$  (8 - 11) :

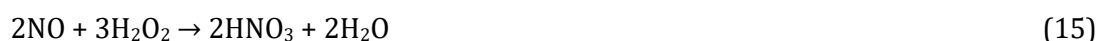




Les oxydes nitriques ( $\text{HNO}_2$ ) et nitreux ( $\text{HNO}_3$ ), produits dans le liquide, se décomposent en proton, nitrite et nitrate par les voies (12- 13):



La formation de nitrite et de nitrate induit une baisse du pH de la solution. Cette réduction entraîne la décomposition de l'acide nitreux en dioxyde d'azote, ce qui provoque une augmentation de la concentration en nitrate (voies 14 et 15). En outre, dans des conditions acides ( $\text{pH} \leq 3,3$ ), de l'acide peroxy-nitreux ( $\text{ONOOH}$ ) est formé à partir du  $\text{NO}_2^-$  et du  $\text{H}_2\text{O}_2$  présents dans la solution. À  $\text{pH} > 3,3$ , le  $\text{HNO}_2$  instable réagit avec le  $\text{H}_2\text{O}_2$  et forme du  $\text{ONOO}^-$  (voie 16):



Les principales difficultés dans l'étude des espèces réactives de l'oxygène et de l'azote formées dans le liquide résident dans leur durée de vie, leur sélectivité et leur stabilité. La durée de vie des RONS est de l'ordre de la microseconde, voire de la nanoseconde, comme c'est le cas pour le radical hydroxyle ( $\text{OH}^\bullet$ ) avec une durée de vie de 100 ns. Les principales RONS étudiées lors des interactions entre le plasma et le liquide sont le peroxyde d'hydrogène ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ), le nitrite ( $\text{NO}_2^-$ ) et le nitrate ( $\text{NO}_3^-$ ). Ces RONS se caractérisent par des durées de vie élevées. Cependant, la difficulté réside dans la méthodologie utilisée pour détecter et évaluer la nature des espèces. Ces méthodes sont généralement indirectes et peu sélectives. Par exemple, le  $\text{H}_2\text{O}_2$  est quantifié sur la base de tests colorimétriques tels que le rouge Amplex, le sulfate de titane ou simplement grâce à des bandes de test  $\text{H}_2\text{O}_2$  commerciales (Tresp et al. 2013), (Hensel et al. 2015). Le  $\text{NO}_2^-$  et le  $\text{NO}_3^-$  sont détectés à l'aide du très courant test du réactif de Griess ou par chromatographie ionique (Mosmann 1983), (Wende et al. 2015), (Dolezalova et al. 2015). De plus, le radical hydroxyle ( $\text{OH}^\bullet$ ) et l'oxyde nitrique ( $\text{ON}^\bullet$ ) sont détectés par spectroscopie de résonance paramagnétique électronique (RPE). Il est également nécessaire d'ajouter des stabilisateurs ou des pièges pour détecter les espèces à courte durée de vie (Tresp et al. 2013). Cela peut avoir pour effet de modifier la composition initiale de l'échantillon. La sélectivité des méthodes de détection des RONS doit être prise en compte, car certains pièges peuvent interagir avec plusieurs espèces. C'est, par

exemple, le cas du 2',7'-dichlorodihydrofluorescéine di-acétate (H<sub>2</sub>DCFDA) qui réagit avec les RNS tels que le peroxy-nitrite (ONOO<sup>-</sup>) ainsi qu'avec les ROS (Dolezalova et al. 2015).

De plus, le milieu réactionnel entre le plasma et le liquide est constitué d'une grande variété de réactions physico-chimiques, comprenant également des émissions de photons, des UV, un champ électrique et une énergie thermique non négligeable (Rezaei et al. 2019). Chaque composante peut faire l'objet d'une étude spécifique pour un domaine d'application précis. C'est la raison pour laquelle les interactions du plasma avec l'air ambiant restent un défi. Le plasma est un environnement intrinsèquement instable, où les conditions du milieu environnant, telles que la température, la pression, l'humidité et la distance entre le plasma et la surface, ne sont pas contrôlées. Cette instabilité peut entraîner des modifications des caractéristiques physico-chimiques de la décharge, ce qui influence le milieu réactionnel des différentes phases d'interaction entre le plasma et le liquide. Ces variations peuvent poser des problèmes de reproductibilité des expériences. Cependant, il est possible de limiter ou de résoudre ces problèmes expérimentaux en prenant des mesures appropriées. Par exemple, l'isolation du jet de plasma par rapport au milieu ambiant peut contribuer à réduire les effets indésirables des variations environnementales. Cela peut être réalisé en utilisant des dispositifs ou des configurations expérimentales qui permettent de séparer physiquement le jet de plasma du milieu environnant, créant ainsi un environnement plus contrôlé. En isolant le jet de plasma, il devient possible de maintenir des conditions expérimentales plus stables, ce qui favorise une meilleure reproductibilité des résultats. Cela permet également de mieux comprendre les mécanismes d'interaction entre le plasma et le liquide, en minimisant les influences externes indésirables. Il convient de noter que chaque configuration expérimentale peut nécessiter des mesures spécifiques d'isolation du jet de plasma en fonction des objectifs de l'étude et des caractéristiques du système. Une approche soigneusement conçue et adaptée aux besoins de l'expérience peut contribuer à atténuer les problèmes de reproductibilité et à améliorer la fiabilité des résultats obtenus lors de l'interaction entre le plasma et le liquide.

### 3.5. Classification des décharges plasma en interaction avec le liquide

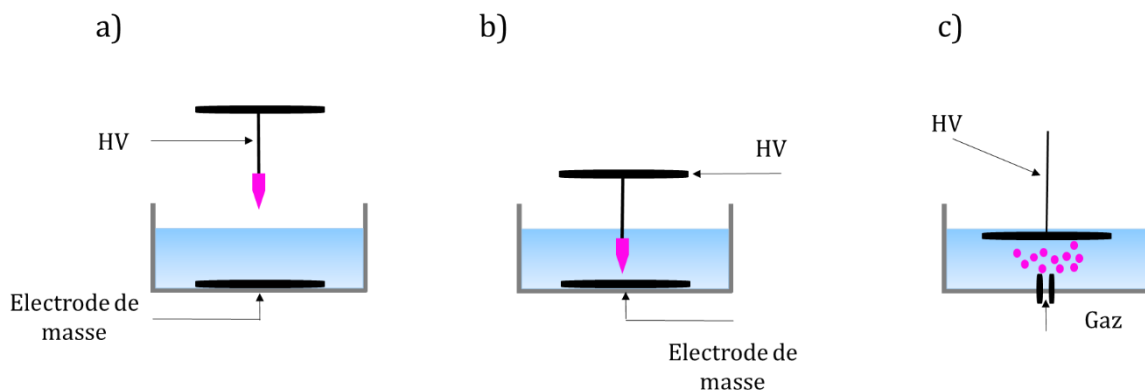
Actuellement, une grande variété de plasmas est étudiée dans la communauté scientifique. Une des caractéristiques importantes est le contact direct ou indirect avec le liquide. Sur la base de ce critère, les décharges plasma en interaction avec le liquide peuvent être subdivisées en trois groupes principaux : les décharges produites dans la phase gazeuse en contact avec la surface du liquide, les décharges produites directement dans le liquide et les décharges qui sont créées dans

des bulles dans le liquide (Bruggeman et Leys 2009), (B. Jiang et al. 2014), (Vanraes et al. 2016). Chaque groupe offre des conditions de production et de distribution des espèces réactives différentes en termes d'interaction entre le plasma et l'air ambiant puis entre le plasma et le liquide.

Les décharges plasma produites au-dessus du liquide sont considérées comme des décharges gazeuses. Dans ce système, le plasma est créé dans le gaz puis entre en contact avec la surface du liquide. Ces décharges plasma se caractérisent par la présence des trois zones de création des RONS : la phase gazeuse, l'interface gaz-liquide et la phase liquide. La configuration de l'électrode haute tension influence le rendement énergétique de la décharge ainsi que la production d'espèces réactives dans la phase liquide. De plus, Vanraes et al. (2016) rapportent que l'efficacité énergétique de ce type de décharge plasma s'améliore en diminuant la distance entre l'électrode et la surface de l'eau. Kumar et al. (2021) ont rapporté que la distance entre les électrodes et le liquide peut déterminer la quantité de ROS formées, ce qui affecte l'efficacité de dégradation des micropolluants (Figure 12. a).

Les décharges plasma produites directement dans le liquide, également appelées décharges électrohydrauliques, sont étudiées depuis de nombreuses années en raison de leur importance dans les procédés de transmission électrique et de leur potentiel pour le traitement des eaux (Vanraes et al. 2016). Les décharges plasma dans un liquide sont considérées comme des décharges chimiquement riches en raison de la formation d'espèces réactives directement dans le liquide qui interagissent immédiatement avec les molécules présentes dans le liquide. Ces décharges sont générées par signal continu, pulsé ou alternatif. Les types de décharges électrohydrauliques les plus couramment signalés sont les décharges DBD (Figure 12. b).

Les décharges électriques à l'intérieur de bulles dans le liquide sont complètement entourées par le liquide qui sert d'électrode. Ces décharges consistent en la génération de bulles de gaz à travers la zone de décharge (Bruggeman et Leys 2009). La chimie de base de ce type de décharge est généralement similaire à celle des décharges directes dans le liquide. Les décharges dans les bulles possèdent une grande surface de contact entre le gaz et le liquide, ce qui augmente l'efficacité de la diffusion des espèces en phase gazeuse dans le liquide. Dans ce type de décharge, le gaz d'alimentation joue un rôle déterminant du fait de l'absence d'interactions entre la décharge plasma et l'air ambiant. Une méthode typique pour la formation des décharges de plasma dans des bulles implique une injection de gaz à travers une anode en forme de buse, dans une électrode mise à la terre, comme indiqué sur la Figure 12. c.



**Figure 12** Les trois groupes de génération de plasma dans le liquide, a) décharges produites dans la phase gazeuse en contact avec la surface de liquide, b) décharges produites directement dans le liquide, c) décharges qui sont créés dans des bulles dans le liquide, adaptée de (Bruggeman et Leys 2009).

Les décharges électriques dans les liquides possèdent des mécanismes de réactions chimiques et des phénomènes physiques similaires. Ces mécanismes incluent la formation de molécules et de radicaux, ainsi que la génération de rayonnement UV. De plus, ces trois types de décharges, qu'elles soient en contact direct ou indirect avec le liquide, créent des canaux de plasma à l'intérieur de l'eau. Ces canaux peuvent atteindre des températures élevées et dégrader thermiquement les molécules.

Chaque type de décharge présente des avantages et des inconvénients. Les décharges à la surface du liquide peuvent être générées à de faibles tensions, allant de 5 à 10 kV. Elles sont également accessibles pour une caractérisation optique. Cependant, elles ont une production limitée d'espèces réactives, ce qui restreint leurs applications potentielles. D'autre part, les décharges produites à l'intérieur du liquide offrent des avantages sur les plans énergétique et chimique, et ont une large gamme d'applications dans les domaines biomédical, environnemental et agricole. Cependant, leur création et leur caractérisation sont plus complexes et difficiles à réaliser.

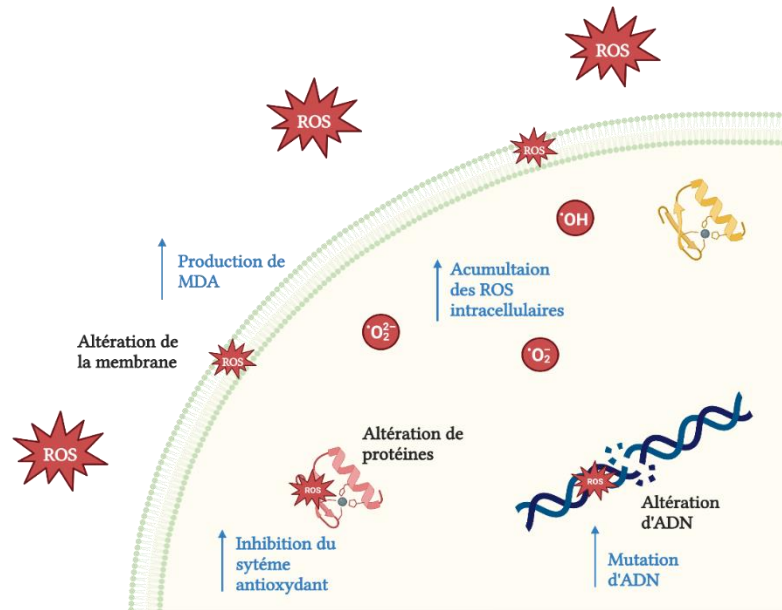
#### 4. Plasma non-thermique à la pression atmosphérique pour la décontamination

Dans le domaine du vivant, les plasmas non-thermiques font l'objet de nombreuses applications, y compris la médecine (Kim et Kim 2021), (Maho et al. 2021), l'agriculture (Misra et al. 2016), (Hage et al. 2022) et l'environnement (Barjasteh et al. 2021), (Magureanu et al. 2021).

L'application qui nous intéresse dans ce travail est la décontamination microbiologique. L'inactivation des microorganismes dans le milieu liquide est basée sur la génération d'espèces réactives par l'interaction du plasma avec le liquide. Dans les conditions de traitement avec une décharge à la surface du liquide, il est rare que les photons, les rayonnements UV, le champ électrique, ainsi que les espèces réactives à l'état fondamental issues du plasma, interagissent directement avec l'échantillon biologique (von Woedtke et al. 2012), (Lackmann et Bandow 2014). Ainsi, les principaux acteurs antibactériens sont les ROS, tels que les radicaux hydroxyles, l'oxygène singulet, les anions superoxydes, le peroxyde d'hydrogène et les nitrites, nitrates. Ces RONS présentent des caractéristiques qui leur permettent d'interagir avec les constituants moléculaires des bactéries, entraînant ainsi des changements physico-chimiques extracellulaires et intracellulaires (Han et al. 2016), (Liao et al. 2017), (Lv et Cheng 2022).

#### 4.1. Dommages cellulaires des RONS

Les effets du plasma non thermique ont été évalués sur un large éventail de microorganismes, sous forme sporulée ou végétative, avec différentes sources de plasma dans différentes conditions de traitement, impliquant une exposition directe ou indirecte des bactéries au gaz ionisé (Liao et al. 2017), (Mizuno 2018), (Liao et al. 2019). L'inactivation des bactéries dans un environnement liquide est considérée comme un traitement indirect. Dans ces conditions, les bactéries sont exposées aux ROS formées dans le liquide. Ces derniers interagissent avec les composants de la cellule bactérienne principalement par des réactions d'oxydation entraînant un stress oxydatif, notamment l'oxydation des lipides, des protéines et des acides nucléiques (Figure 13). Lors de la mise en place d'une application de plasma non thermique, il est utile de comprendre les caractéristiques structurelles et biochimiques de la cible biologique afin de sélectionner les facteurs liés au système et au processus, facteurs qui déterminent les espèces réactives et donc les effets bactéricides souhaités.



**Figure 13** Les mécanismes des dommages causés par les ROS aux cellules bactériennes, adaptée de Round Membrane Cell, Biorendre.com (2022).

#### 4.1.1. Dommages engendrés sur la paroi

La paroi est la première cible d'attaque des ROS par la peroxydation de ses constituants majeurs, les lipides. Les radicaux libres attaquent les acides gras saturés ou non saturés qui constituent la membrane en initiant la peroxydation lipidique. Les lipides membranaires, en particulier les acides gras polyinsaturés (AGPI), sont considérés comme les plus vulnérables en raison de leur localisation près de la surface cellulaire et de leur sensibilité aux espèces réactives de l'oxygène (ROS). Cette peroxydation entraîne une oxydation des protéines transmembranaires, une altération de la membrane et une augmentation de la fluidité membranaire.

Alkawareek et al. (2014) ont évalué les effets d'un JPPA sur l'intégrité et la perméabilité de la membrane des cellules d'*E. coli* en mesurant la concentration extracellulaire d'ATP. Les résultats ont révélé que la fuite d'ATP présente une tendance biphasique avec un taux plus lent lors des courtes expositions, puis une seconde phase avec un taux beaucoup plus élevé en augmentant le temps d'exposition au plasma. Les auteurs ont également suggéré la présence d'un seuil de dommages membranaires, et peut-être de la taille des pores, qui doit être atteint avant qu'une fuite significative de composés subcellulaires puisse se produire.

De plus, la peroxydation des lipides génère des espèces réactives telles que des radicaux libres, des composés carbonylés et des hydroperoxydes. Ces derniers se décomposent souvent par

dégradation chimique ou par catalyse à l'aide d'ions de métaux de transition pour donner naissance à des produits de dégradation plus toxiques tels que des radicaux alcoxy, des radicaux peroxy, des radicaux hydroxyle et des aldéhydes réactifs comme le malondialdéhyde (MDA). Le MDA est un produit majeur de la peroxydation lipidique. Joshi et al. (2011) ont étudié l'accumulation de MDA pour *E. coli*. Les résultats ont montré une forte accumulation de MDA après le traitement par le plasma. Récemment, Lv et Cheng (2022) ont démontré les effets d'une décharge DBD d'air sur l'intégrité membranaire de *Salmonella typhimurium* en examinant la fuite de composants intracellulaires. Quelques secondes d'exposition au plasma ont entraîné une grande quantité de fuite de protéines et/ou d'acides nucléiques, signe d'une perte de l'intégrité membranaire.

#### 4.1.2. Dommages engendrés aux protéines et effet sur l'activité enzymatique

De façon comparable à l'oxydation des lipides, les protéines sont aussi des cibles des ROS, provoquant généralement des dommages irréversibles conduisant à l'inactivation de la protéine. Les ROS peuvent interagir soit de manière sélective au niveau de la chaîne latérale du résidu amino-terminal, soit au niveau du cofacteur métallique (Imlay 2013), (Liao et al. 2017). Cependant, la plupart des ROS sont non sélectifs et peuvent attaquer plusieurs sites actifs au niveau de la protéine. Les ROS engendrent aussi des dommages significatifs sur l'activité de certains enzymes comme celles dépendantes des clusters [Fe-S]. Par exemple, l'anion superoxyde entraîne une inactivation de la déshydratase [4Fe-4S] qui passe alors sous une forme inactive [3Fe-4S]. Cette destruction entraîne la libération du fer qui se retrouve dans le cytoplasme de la cellule et favorise ainsi la réaction de Fenton et la production de l'espèce la plus toxique, le radical hydroxyle (OH•).

Hou et al. (2008) ont étudié les effets d'une décharge de type DBD sur les protéines membranaires chez *Klebsiella pneumoniae*. Les résultats ont montré que la concentration de protéines liées à la membrane diminuait. L'analyse des protéines liées à la membrane a indiqué leur dégradation en peptides de faible poids moléculaire. De même, Takai et al. (2012) ont étudié les effets d'un JPPA sur les protéines dans une solution aqueuse en utilisant le lysozyme comme modèle. Le traitement au plasma a engendré une diminution de l'activité enzymatique. Colagar et al. (2013) ont évalué les effets d'un JPPA sur les cellules de *E. coli* et leurs macromolécules. Le traitement par plasma a conduit à une dégradation des protéines, en commençant par les plus grosses protéines (50-90 kDa), ce qui a entraîné une augmentation de petits fragments de



protéines (25 kDa) dans les échantillons. Alkawareek et al. (2014) ont étudié l'effet d'un JPPA sur deux enzymes modèles, la sérine protéase et la protéinase K. L'augmentation du temps d'exposition au plasma a causé une réduction de l'activité catalytique de la protéinase K. Les auteurs ont suggéré que la réduction de l'activité enzymatique est due à une accumulation de plusieurs évènements moléculaires comme l'oxydation des chaînes latérales d'acides aminés ou la perturbation de la liaison hydrogène dans la structure tertiaire de la protéine.

### 4.1.3. Dommages engendrés aux acides nucléiques

L'une des conséquences de l'exposition des bactéries au plasma est l'oxydation de l'ADN. Le radical hydroxyle ( $\text{OH}\cdot$ ) formé de la réaction de Fenton peut oxyder les bases et les sucres constituant la molécule d'ADN. Ces lésions de l'ADN bloquent la progression de la fourche de réplication ou l'activation des ARN polymérases. La base azotée la plus affectée par les RONS est la guanine car elle a un potentiel redox très faible. La lésion la plus commune est la 8-Oxoguanine (8 OHdG) (Imlay 2015).

Alkawareek et al. (2014) ont étudié l'effet de l'exposition de *E. coli* au JPPA sur l'intégrité de l'ADN. Pour obtenir une analyse quantitative précise, les auteurs ont utilisé l'ADN plasmidique comme représentant, considérant que l'ADN génomique et l'ADN plasmidique connaîtront des interactions analogues avec les espèces réactives oxydatives produites par le plasma. Les résultats ont montré un endommagement rapide de l'ADN plasmidique avec une perte complète de la conformation de l'ADN après 90 s d'exposition au plasma. De la même manière, Joshi et al. (2011) ont étudié les effets oxydatifs induits par une décharge de type DBD sur l'ADN bactérien. Après quelques secondes, le plasma a entraîné des dommages à l'ADN et l'apparition de la lésion 8-OHdG. Ces résultats montrent le lien direct entre la perte de l'intégrité et du fonctionnement de l'ADN et la mort cellulaire.

## 4.2. Réponses cellulaires contre le stress oxydant

Comme mentionné dans la section 1.1.4.3 intitulée "Adaptations transcriptomiques," les bactéries ont développé des mécanismes d'adaptation et de protection pour survivre aux conditions de stress, notamment le changement de leur état physiologique, la réduction de leur activité métabolique et la régulation de leur expression génétique. Dans le cas du stress oxydant, on distingue deux mécanismes de défense couramment étudiés lors des interactions plasma-

bactérie : un mécanisme enzymatique qui recrute des enzymes capables de dismuter l'activité de certains RONS, et un mécanisme génétique impliquant des régulateurs pouvant induire ou inactiver les gènes associés à la réponse au stress.

#### 4.2.1. Réponses enzymatiques

La superoxyde dismutase (SOD) est une famille de protéines répandue chez les bactéries. Elle agit comme une métalloenzyme qui dismute l'anion superoxyde en peroxyde d'hydrogène et en oxygène moléculaire (Imlay 2009). Le rôle principal de la SOD est de réduire le stress oxydatif intracellulaire en maintenant les niveaux de superoxyde à des concentrations sous-nanomolaires (2 nmol) (Imlay et al. 1991). *E. coli* possède trois superoxydes dismutases : la Fe-SOD (SodA) ; la Mn-SOD (SodB) et la Cu-Zn-SOD (SodC). Chacune présente des fonctionnalités différentes (Imlay 2009), (Imlay 2015). La SodA se localise dans le cytoplasme à proximité de l'ADN, le protégeant du peroxyde d'hydrogène. La SodB est distribuée de manière homogène dans le cytoplasme en protégeant principalement les protéines. La SodC se localise dans l'espace périplasmique où elle forme la première couche de protection contre le superoxyde issu de l'environnement de la cellule. La présence de trois molécules de superoxyde pour *E. coli* est expliquée par (Imlay 2015). La superoxyde dismutase est une protéine qui ne diffuse pas à travers la membrane bactérienne. Ainsi, pour dismuter la superoxyde, les enzymes doivent se répartir dans les différents compartiments cellulaires délimités par une membrane. La superoxyde dismutase dans l'espace périplasmique a été observée pour la première fois chez *E. coli* durant la phase stationnaire de la croissance (Imlay 2009). L'induction de la synthèse de la superoxyde dismutase est sous le contrôle du facteur sigma et elle est fortement induite lorsque les cellules bactériennes sont en phase stationnaire.

Les catalases sont courantes pour la plupart des bactéries, à l'exception des bactéries à Gram positif telles que les streptocoques, les entérocoques et les leuconostokes (Mishra et Imlay 2012). *E. coli* possède trois enzymes principales capables de dégrader le peroxyde d'hydrogène : l'alkyl hydroperoxyde réductase (Ahp) ; la catalase G (KatG) et la catalase E (KatE) (Seaver et Imlay 2001). La KatG appartient à la famille des catalase-peroxydases et présente une faible expression lorsque les cellules sont en phase exponentielle de croissance. La KatE est fortement exprimée dans les cellules en phase stationnaire uniquement car elle est induite par le système RpoS (Schellhorn et Hassan 1988).

Yost et Joshi (2015) ont étudié l'effet d'un plasma DBD sur l'induction de l'expression des gènes *sodA*, *sodB*, *katE* et *katG*, sur des souches sauvages d'*E. coli*. Les souches mutantes présentent une forte sensibilité au traitement par plasma. Les résultats ont montré des niveaux d'expression significativement élevés pour la souche sauvage, notamment pour les temps de traitement importants (5 et 10 min). De la même manière, Vaze et al. (2017) ont révélé la forte sensibilité des souches d'*E. coli* mutantes dépourvues des gènes codant pour la superoxyde dismutase et la catalase. Elles se sont révélées significativement plus sensibles à la mort cellulaire que le type sauvage. Dans l'ensemble, les deux études ont montré l'importance de la superoxyde dismutase et de la catalase dans le système de défense d'*E. coli* contre le stress oxydatif induit par le plasma (Figure 14).

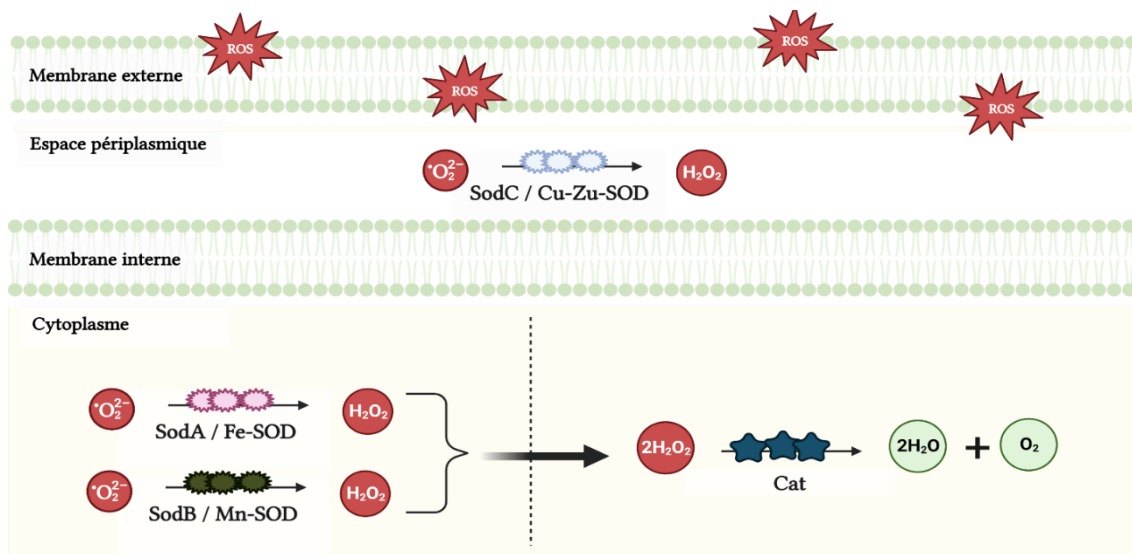


Figure 14 Les mécanismes d'action de la SOD et la CAT sur les ROS intracellulaires, adaptée de BioRendire.com (2022).

#### 4.2.2. Réponses transcriptomiques

En plus de la réponse enzymatique, les bactéries ont développé une réponse transcriptomique contre le stress oxydatif induisant l'expression de plusieurs gènes contrôlée par des régulateurs, dont les plus importants sont les régulateurs OxyR et SoxRS. Le premier est induit en réponse à la présence du peroxyde d'hydrogène et le second en réponse au radical superoxyde. L'activation de ces voies transcriptomiques multigéniques est essentielle à la réponse bactérienne au stress oxydatif.

Le système OxyR est principalement responsable de la reconnaissance et du maintien des niveaux de peroxyde d'hydrogène dans la cellule (figure 15) (Navarro et al. 2010). OxyR est un

régulateur transcriptomique de type LysR, principalement répandu chez les bactéries Gram-négatives. L'activité transcriptomique de OxyR dépend de son état redox. Il peut soit agir comme activateur s'il est sous sa forme oxydée, soit comme répresseur lorsqu'il est dans des conditions réductrices (Pomposiello et Demple 2001). OxyR agit comme un tétramère et se lie spécifiquement aux régions promotrices 5' des gènes cibles au niveau d'un motif de séquence conservé. Pour *E. coli*, le régulon OxyR s'étend sur plus de 20 gènes différents (Pomposiello et Demple 2001) impliqués dans plusieurs mécanismes moléculaires de réponse adaptative au stress redox, tels que l'élimination de  $H_2O_2$  par la catalase (*katE* et *ahpCF*), la peroxydase (*katG*), GSH-réductase (*gorA*) et autres. De plus, OxyR régule l'expression d'OxyS, un petit ARN régulateur qui dirige la réponse au stress lié à la présence du peroxyde d'hydrogène.

Le régulon SoxRS est induit en réponse à la présence de  $O_2^{\bullet-}$  mais pas celle de  $H_2O_2$  (Figure 15) (Imlay 2015). Il est contrôlé par deux protéines SoxR et SoxS. Ces derniers codent pour la transcription distincte d'une cascade d'activateurs modulant plus de 16 autres gènes (Pomposiello et Demple 2001), (Navarro et al. 2010), (Imlay 2015). La protéine SoxR est produite de manière constitutive et joue le rôle d'un signal d'alerte pour les fortes doses de superoxyde. L'activité de la protéine SoxS n'est régulée que par la concentration intracellulaire de la protéine SoxR. Autrement dit, la forme oxydée de SoxR stimule l'activation de SoxS, cette dernière se lie aux régions promotrices des gènes cibles pour recruter l'ARN polymérase. Ces gènes inductibles constituent le régulon SoxRS.

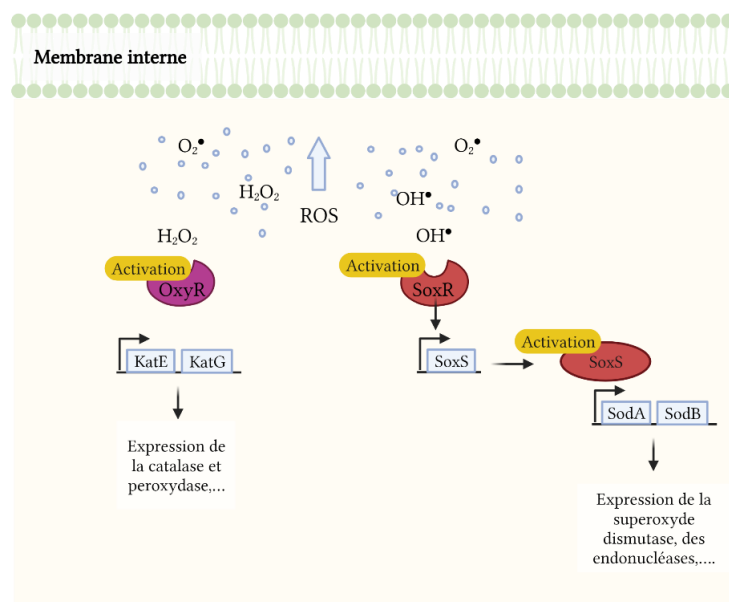


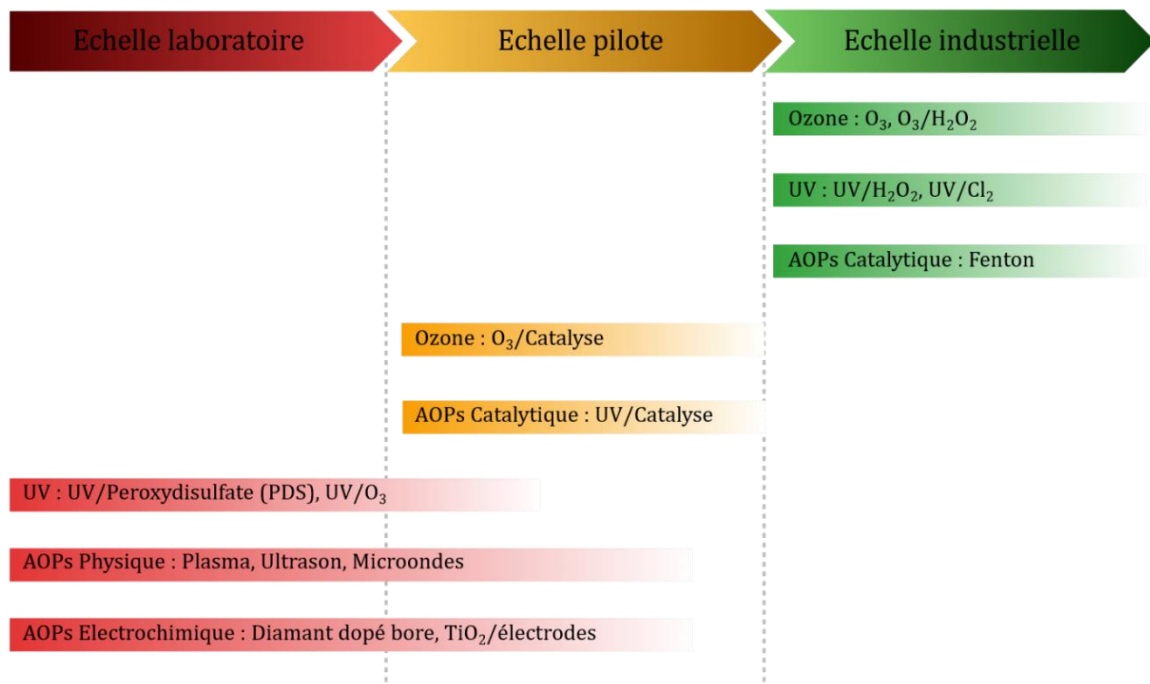
Figure 15 Les mécanismes des régulons OxyR et SoxRS, adaptée de (Bessaiah et al. 2021) et de BioRendre.com (2022).

## 5. Plasma non-thermique à la pression atmosphérique pour la dégradation des gènes de résistances aux antibiotiques

### 5.1. Procédés d'oxydation avancés (AOP)

Les procédés d'oxydation avancée (AOP) constituent des méthodes prometteuses et efficaces pour éliminer les polluants des eaux usées. Tous les AOP comprennent deux étapes : la formation in situ d'espèces oxydantes réactives et la réaction des oxydants avec les contaminants cibles. Le rôle principal des AOP est la destruction des contaminants organiques. Ces substances comprennent une variété de composés tels que les solvants, les pesticides, les produits pharmaceutiques et d'autres produits chimiques d'origine anthropique. Les AOP visent principalement à améliorer la qualité générale de l'eau traitée afin de respecter les normes réglementaires avant son rejet dans l'environnement (Miklos et al. 2018), (Gagol, Przyjazny, et Boczka 2018), (Sillanpää, Ncibi, et Matilainen 2018).

Les AOP jouent également un rôle crucial dans la réduction de la charge microbienne présente dans les rejets des stations d'épuration (Biswal et al. 2014), (A. Q. Nguyen et al. 2021), (Ezeuko et al. 2021). Les AOP génèrent des espèces oxydantes très réactives, telles que les radicaux hydroxyles, qui ont un fort potentiel d'oxydation. Ces espèces oxydantes sont capables d'inactiver les micro-organismes en attaquant la membrane cellulaire, les protéines et le matériel génétique. À l'heure actuelle, une diversité d'AOP est en cours de développement ou se trouve à un stade de développement avancé. Une classification des AOP, selon leur niveau de maturation technologique, est présentée dans la Figure 16. Cette classification distingue les AOP qui sont encore au stade de recherche en laboratoire, ceux qui ont été soumis à des validations sur des échantillons environnementaux à l'échelle pilote, et enfin ceux qui sont actuellement mis en œuvre à grande échelle dans les stations d'épuration.



**Figure 16** Classification des différents AOP en fonction de leur niveau de maturation technologique, adoptée (B. Miklos et al. 2018).

### a) AOP à l'échelle laboratoire

À l'échelle du laboratoire, différents AOP sont développés et soumis à une évaluation à petite échelle afin de déterminer leur faisabilité et leur efficacité dans la dégradation des contaminants. Des expérimentations sont entreprises dans le but d'étudier les mécanismes d'oxydation, d'optimiser les conditions de traitement, ainsi que d'évaluer les performances des AOP sur une gamme spécifique de polluants. Ces études de laboratoire permettent de tester de nouvelles méthodes et de mieux appréhender les mécanismes sous-jacents à ces procédés. Parmi les AOP étudiés à l'échelle du laboratoire, on trouve notamment les AOP électrochimiques (eAOP), les AOP physiques (pAOP) ainsi que les AOP basés sur les ultraviolets (UV) (Miklos et al. 2018), (Gągol, Przyjazny, et Boczka 2018), (Sillanpää, Ncibi, et Matilainen 2018).

Un exemple d'électro-oxydation avancée (eAOP) est représenté par le traitement utilisant une électrode en diamant dopé au bore (BDD) (Chaplin et al. 2013). Ce procédé permet la génération de radicaux oxydants sans nécessiter l'ajout d'autres produits chimiques réactifs. Ainsi, il suscite un intérêt en tant que méthode respectueuse de l'environnement et efficace pour éliminer divers polluants. Cependant, certains paramètres, tels que l'hydrodynamique, doivent être pris en compte, car l'énergie requise pour le pompage de l'eau et son traitement constitue la partie la plus importante de la consommation énergétique de ce procédé (Miklos et al. 2018), (Rajab et al. 2015), (Bergmann et Rollin 2007).

La catégorie des pAOP regroupe des processus physiques spécifiques tels que les décharges plasma à barrière diélectriques (DBD), les ultrasons et les micro-ondes (Jiang et al. 2014), (Jiang et al. 2016), (Miklos et al. 2018). Les DBD en phase liquide ou gazeuse déclenchent des processus chimiques qui entraînent une oxydation directe des contaminants présents dans l'eau. Divers radicaux oxydants ou espèces actives, ainsi que des rayonnements UV et des ondes de choc, se forment lors du rejet, favorisant ainsi l'oxydation. La sonication de l'eau par ultrasons provoque la formation et l'implosion de microbulles résultant de la compression et de la raréfaction induites par les ondes acoustiques (Mahamuni et Adewuyi 2010). Ces bulles implosent violemment après avoir atteint une taille critique, générant ainsi des températures très élevées (>5000 K), des pressions élevées (>1000 bar) et des radicaux hautement réactifs. La destruction des contaminants de l'eau s'opère par le biais de décompositions thermiques et de diverses réactions radicalaires. Ce processus a démontré sa capacité à oxyder divers contaminants aquatiques dans des expériences menées à l'échelle du laboratoire. Cependant, l'application des ultrasons est très énergivore, ce qui se traduit par un rendement électrique très faible par rapport aux autres technologies.

D'autres procédés AOP basés sur les ultraviolets (UV) sont étudiés dans de petits systèmes de laboratoire (Miklos et al. 2018), (Gągol, Przyjazny, et Boczkaj 2018), (Sillanpää, Ncibi, et Matilainen 2018). Ils englobent des processus basés sur l'irradiation UV (principalement UV-C) ainsi que des combinaisons des UV avec différents promoteurs de radicaux, tels que l'ozone ( $O_3$ ) ou le peroxydisulfate (PDS). Dans le procédé UV/ $O_3$ , l'irradiation UV induit la dissociation de l'ozone dissous, suivie d'une réaction rapide entre l'oxygène atomique et l'eau, générant ainsi du peroxyde d'hydrogène ( $H_2O_2$ ) qui se fragmente en radicaux hydroxyle ( $OH\cdot$ ). Cependant, l'utilisation de lampes UV et de générateurs d'ozone nécessite de grandes quantités d'énergie électrique, ce qui entraîne des demandes énergétiques relativement élevées pour la combinaison des UV et de l'ozone.

## b) AOP à l'échelle pilote

D'autres procédés ont montré des résultats prometteurs dans des systèmes pilotes simulant les conditions réelles de traitement de l'eau ou des eaux usées, tels que les AOP catalytiques (cAOP) et l'ozonation catalytique.

Les AOP catalytiques (cAOP) sont des techniques de traitement de l'eau qui associent l'utilisation d'oxydants puissants à des catalyseurs afin de décomposer les polluants présents dans l'eau (Nawrocki et Kasprzyk-Hordern 2010), (Xing et al. 2016), (Miklos et al. 2018). Les

catalyseurs utilisés dans les AOP catalytiques jouent un rôle clé dans le processus d'oxydation. Ils peuvent améliorer l'efficacité de production de radicaux hydroxyle, accélérer la vitesse de réaction et permettre une dégradation plus complète des polluants. Les catalyseurs couramment utilisés comprennent des métaux tels que le fer, le manganèse, le cuivre, le cobalt, ainsi que des matériaux comme le charbon actif, l'alumine et les zéolithes. Les AOP catalytiques présentent plusieurs avantages, tels qu'une haute efficacité d'oxydation, une large gamme d'applications, une réduction des sous-produits indésirables par rapport aux méthodes d'oxydation traditionnelles, et la possibilité d'utiliser des conditions opérationnelles douces. Cependant, il est à noter que les AOP catalytiques peuvent nécessiter des équipements et des coûts d'exploitation supplémentaires en raison de l'utilisation de catalyseurs et d'oxydants spécifiques (Miklos et al. 2018).

Un exemple de procédé cAOP est l'ozonation catalytique (Xing et al. 2016), (Miklos et al. 2018). L'ozone ( $O_3$ ), en tant qu'oxydant puissant, peut décomposer de nombreux contaminants organiques tels que les produits pharmaceutiques, les pesticides, les solvants et les composés organiques volatils, ainsi qu'inactiver les bactéries, les virus, etc. Le catalyseur utilisé dans l'ozonation catalytique accélère la réaction d'oxydation de l'ozone, favorisant ainsi une décomposition plus rapide et complète des polluants (Xing et al. 2016). L'ozonation catalytique présente plusieurs avantages par rapport à l'ozonation seule. Elle permet une réduction plus rapide des contaminants, nécessitant ainsi des temps de contact plus courts. De plus, l'utilisation d'un catalyseur permet de réduire la quantité d'ozone nécessaire, réduisant ainsi les coûts d'exploitation. Cependant, il convient de noter que l'ozonation catalytique peut également produire des sous-produits indésirables, tels que des sous-produits organiques chlorés dans certaines conditions (Miklos et al. 2018).

### c) AOP à l'échelle réelle

Les AOP à base d'ozone et d'UV sont couramment utilisées à grande échelle dans de nombreuses applications de traitement des eaux (Miklos et al. 2018), (Gałol, Przyjazny, et Boczkaj 2018), (Sillanpää, Ncibi, et Matilainen 2018). Les AOP à base d'ozone exploitent les propriétés oxydantes puissantes de l'ozone ( $O_3$ ) pour décomposer et éliminer les polluants organiques présents dans l'eau.

Les AOP à base d'UV font appel aux rayonnements ultraviolets (UV) pour générer des radicaux hydroxyle ( $OH\cdot$ ) (Miklos et al. 2018), (Gałol, Przyjazny, et Boczkaj 2018), (Sillanpää, Ncibi, et Matilainen 2018). Des lampes UV spéciales émettent une longueur d'onde spécifique pour exciter les molécules d'eau et produire des radicaux hydroxyle. Cette méthode est souvent utilisée



en combinaison avec d'autres procédés d'oxydation afin d'améliorer l'efficacité de dégradation des polluants. Les AOP à base d'UV sont couramment employées dans le traitement des eaux de piscine, des eaux usées et dans d'autres applications industrielles nécessitant une désinfection et une dégradation des polluants organiques (Miklos et al. 2018).

Ces deux méthodes d'AOP ont démontré leur efficacité dans le traitement des eaux à grande échelle et sont largement mises en œuvre dans de nombreux systèmes de traitement de l'eau à travers le monde. Elles offrent plusieurs avantages, tels qu'une efficacité élevée de dégradation des polluants, une décontamination supplémentaire, une réduction de la formation de sous-produits indésirables et une large gamme d'applications. Cependant, il est essentiel de souligner que la sélection adéquate des paramètres de traitement, y compris le dosage d'ozone ou d'UV, la durée d'exposition et les conditions opérationnelles, est cruciale pour garantir une efficacité optimale et une sécurité de traitement.

## 5.2. Alternative plasma pour le traitement des eaux

L'utilisation du plasma constitue une alternative prometteuse pour le traitement des eaux. Le plasma a démontré son efficacité dans la dégradation des composés organiques, tels que les médicaments, ainsi que dans l'inactivation des bactéries (Jiang et al. 2014), (Jiang et al. 2016), (Miklos et al. 2018). Les études en laboratoire ont permis d'évaluer l'efficacité du plasma dans des conditions contrôlées, en testant différents paramètres tels que la configuration de la décharge plasma, l'énergie appliquée et la durée d'exposition. Ces expériences ont montré que le plasma était capable de dégrader efficacement les composés organiques, y compris les médicaments présents dans l'eau (Liao et al. 2018). De plus, des études pilotes ont été réalisées pour évaluer l'efficacité du plasma dans des conditions plus proches de celles rencontrées dans l'environnement réel. Ces systèmes pilotes reproduisent les conditions de traitement de l'eau à plus grande échelle. Les résultats ont confirmé l'efficacité du plasma pour la dégradation des composés organiques et l'inactivation des bactéries, offrant ainsi des perspectives intéressantes pour l'application du plasma dans le traitement des eaux (Ye Yang et al. 2020), (Song et al. 2021).

Cependant, il convient de noter que malgré les résultats prometteurs obtenus dans les études en laboratoire et les systèmes pilotes, l'utilisation du plasma dans le traitement des eaux à grande échelle nécessite encore des recherches approfondies. Des études supplémentaires sont nécessaires pour évaluer les performances du plasma dans des conditions variables, optimiser les paramètres de traitement et évaluer l'impact sur d'autres paramètres de qualité de l'eau.

Néanmoins, le potentiel du plasma en tant qu'alternative efficace pour la dégradation des composés organiques et l'inactivation des bactéries dans le traitement des eaux suscite un vif intérêt dans la communauté scientifique et les domaines de l'industrie de l'eau.

### 5.3. Position du plasma dans le traitement des eaux

Le plasma présente diverses actions dans le contexte de la décontamination microbiologique des liquides. Ces actions vont au-delà de la simple réduction de la charge bactérienne et englobent également la dégradation des gènes de résistance aux antibiotiques, qu'ils soient présents à l'intérieur ou à l'extérieur des cellules. La Table 2 présente une liste non exhaustive des différentes décharges plasma appliquées pour la dégradation des bactéries et des gènes de résistance aux antibiotiques.

Liao et al. (2018) étaient parmi les premiers à étudier l'effet du plasma sur la dégradation des gènes de résistance aux antibiotiques en suspension. Dans cette étude, une décharge plasma DBD en phase gazeuse en contact avec le liquide a été appliquée pour l'inactivation de *Staphylococcus aureus* résistant à la méthicilline (SARM) et de son gène de résistance à la méthicilline (*mecA*). Les expériences ont été réalisées dans trois matrices liquides (du PBS et deux modèles synthétisés d'eaux usées laitières et de viande). L'étude a porté sur l'effet du plasma sur les gènes *mecA* intracellulaires (i-) et extracellulaires (e-). Les ARGs intracellulaires sont situés dans le cytoplasme des cellules bactériennes. Lorsque l'enveloppe cellulaire est altérée, les ARGs intracellulaires sont libérés dans l'environnement et deviennent alors des ARGs extracellulaires qui peuvent être acquis par d'autres bactéries via HGT. Les résultats de l'inactivation du SARM ont montré qu'un plasma de 0,12 kJ.cm<sup>-2</sup> entraînait une réduction bactérienne de 5 log. Pour la dégradation des ARGs, e-*mecA* a montré une plus grande sensibilité au traitement plasma par rapport à i-*mecA*. La cinétique de dégradation de i- et e-*mecA* dans des solutions tamponnées au phosphate a montré que la réduction des gènes i-*mecA* était significativement plus lente que celle des gènes e-*mecA*. La faible dégradation du gène *mecA* intracellulaire a été expliquée par l'effet protecteur de l'enveloppe cellulaire externe et par les structures intracellulaires (protéines). De plus, les matières organiques présentes dans les effluents, telles que les protéines et les lipides, agissent comme des pièges pour éliminer les radicaux générés par le plasma, en particulier les ROS. En conséquence, les cellules de *Staphylococcus aureus* et le gène *mecA* résistant sont davantage protégés contre l'attaque des espèces réactives du plasma.

Les intégrons sont un groupe clé de la transmission des ARGs. Song et al. (2021) ont évalué le potentiel d'un plasma à pression atmosphérique à inactiver les ARB et à détruire les ARGs en utilisant une décharge plasma au sein de bulles dans le liquide. Ils ont utilisé une souche *E. coli* résistante aux antibiotiques comme modèle (*AR E. coli*). Les résultats ont montré une réduction d'environ 6,3 log de *AR E. coli* après 10 minutes d'exposition avec leurs paramètres opératoires. L'étude a également mis en évidence que l'inactivation bactérienne augmentait avec le débit de gaz. Ce dernier est à l'origine de la génération de RONS et donc de l'inactivation d'*AR E. coli*. Tous les ARGs ont diminué après le traitement par plasma, avec une efficacité d'élimination supérieure à 90%. Les ARGs comprenant *tetC*, *tetW*, *bla TEM-1*, *aac (3)-II* et le gène de l'intégron *int11* ont diminué de 1,04 ; 0,61 ; 1,84 ; 2,2 et 2,3 log en 10 min, respectivement. Les données ont également révélé que le plasma réduisait la fréquence de transfert conjugatif des ARGs d'environ 63 % après 10 minutes de traitement, confirmant ainsi davantage l'inhibition du transfert horizontal de gènes de résistance aux antibiotiques (HGT) par le plasma.

**Table 2** Synthèse de la littérature de l'application du plasma pour la dégradation des gènes de résistance aux antibiotiques.

Décharges de plasma	Caractéristiques	Bactéries	Profils de résistance aux antibiotiques *	Volume de liquide	Nature du liquide	Concentration initiale	Réduction *	Références	
Décharge en phase gazeuse	V = 14 kV	<i>Staphylococcus aureus</i> (MRSA)	i- <i>mecA</i>		PBS * (pH = 7)	10 <sup>9</sup> CFU.mL <sup>-1</sup>	<i>Staphylococcus aureus</i> (MRSA) = 5 log	(Liao et al. 2018)	
	Freq. * = 10 kHz						i- <i>mecA</i> = 0,8 log		
	Puissance = 2,94 W/cm <sup>2</sup>		e- <i>mecA</i>				e- <i>mecA</i> = 2,6 log		
	Temps = 0 to 8 min								
		<i>E. coli</i> multi-résistant	i- <i>bla<sub>TEM</sub></i>		PBS * (pH = 7)	10 <sup>9</sup> CFU.mL <sup>-1</sup>	<i>E. coli</i> multi-résistant = 3 log		(Liao et al. 2021)
			i- <i>tet</i>				i- <i>bla<sub>TEM</sub></i> = 1,26 log		
			e- <i>bla<sub>TEM</sub></i>				i- <i>tet</i> = 1,55 log		
			e- <i>tet</i>				e- <i>bla<sub>TEM</sub></i> = 3,26 log		
						e- <i>tet</i> = 3,14 log			
Décharge en bulle dans le liquide	V = 18 kV	<i>E. coli</i> multi-résistant	<i>tet C</i>	300 mL	PBS * (pH = 7)	10 <sup>8</sup> CFU.mL <sup>-1</sup>	<i>E. coli</i> multi-résistant = 7 log	(Song et al. 2021)	
	Freq. * = 50 Hz		<i>tet W</i>				<i>tet C</i> = 1,04 log		
	Puissance = 12 W		<i>bla<sub>TEM-1</sub></i>				<i>tetW</i> = 0,61 log		
	Gaz= 2,5 L/min		<i>aac(3)-II</i>				<i>bla<sub>TEM-1</sub></i> = 1,84 log		
	Temps = 10 min		Integron gène ( <i>int11</i> )				<i>aac(3)-II</i> = 2,2 log		
		<i>E. coli</i> multi-résistant	Integron gène ( <i>int11</i> )	500 mL	PBS * (pH = 7)	10 <sup>8</sup> CFU.mL <sup>-1</sup>	<i>E. coli</i> multi-résistant = 4,5 log		(Hu Li et al. 2021)
							<i>int11</i> = 2,3 log		
							<i>int11</i> = 3,10 log		
Décharge dans le liquide	V = 500 V	<i>E. coli</i> multi-résistant	<i>tet A</i>	150 mL	Saline (0.9%)	10 <sup>8</sup> CFU.mL <sup>-1</sup>	<i>E. coli</i> multi-résistant = 7 log	(Ye Yang et al. 2020)	
	Courant = 100 mA		<i>tet R</i>				<i>tet A</i> = 5,8 log		
	Puissance = 50 W		<i>aph A</i>				<i>tet R</i> = 5,4 log		
	Temps = 30 min		Transposase gène ( <i>tnpA</i> )				<i>aph A</i> = 5,5 log		
							<i>tnpA</i> = 5,5 log		

Fréq. \*-fréquence; † i—gène intracellulaire ; e - gène extracellulaire ; PBS \*—solution tamponnée au phosphate.

## Conclusion

Au cours de ce chapitre, nous avons examiné les mécanismes d'adaptation d'*Escherichia coli* face à divers facteurs de stress environnementaux, et nous avons constaté que la bactérie présente un ensemble de mécanismes qui lui permettent de survivre dans un large éventail de conditions stressantes. Parmi ces mécanismes, les adaptations morphologiques ont été observées, entraînant une réduction de la taille de la cellule. Ces adaptations morphologiques modifient les échanges avec le milieu extérieur en réponse à des changements dans la composition de la membrane cellulaire. De plus, des adaptations phénotypiques ont été identifiées, permettant à la cellule bactérienne de passer à un état de croissance lente appelé "VBNC" (Viable But Non-Culturable) en réduisant son activité métabolique. Par ailleurs, des adaptations transcriptomiques ont été mises en évidence pour faire face au stress oxydatif induit par l'environnement extérieur, impliquant des facteurs de régulation tels que le facteur sigma. Ces adaptations permettent aux bactéries de devenir moins sensibles aux traitements de décontamination, ce qui peut avoir des implications importantes, car certaines bactéries peuvent porter des gènes de résistance aux antibiotiques et contribuer ainsi à la dissémination de l'antibiorésistance. Par conséquent, une résistance accrue aux traitements de décontamination peut favoriser une plus grande dissémination de l'antibiorésistance dans l'environnement.

Face à l'efficacité limitée des méthodes actuelles de traitement des eaux usées pour éliminer les bactéries résistantes aux antibiotiques (ARB) et les gènes de résistance aux antibiotiques (ARGs), de nouvelles méthodes de décontamination des eaux usées sont nécessaires. Récemment, plusieurs études ont examiné l'application de plasmas à pression atmosphérique pour la décontamination microbiologique des liquides, montrant les avantages de cette approche. Différents types de décharges plasma ont été étudiés, et des recherches comparatives ont été réalisées pour évaluer leur efficacité dans différentes configurations expérimentales et sur différentes matrices liquides. Ces études ont démontré l'efficacité des plasmas dans la réduction de la charge bactérienne et des gènes de résistance aux antibiotiques. Cependant, il reste encore des aspects à explorer pour mieux comprendre le comportement des bactéries face au traitement par plasma. Par exemple, les phases de croissance bactérienne, telle que la phase exponentielle et la phase stationnaire, méritent d'être étudiées en raison des nombreux changements cellulaires qui s'y produisent. Les éléments mobiles génétiques (EMG), tels que les plasmides, sont également d'une grande importance car ils jouent un rôle crucial dans l'adaptation des bactéries à leur environnement. Bien que les plasmides puissent conférer aux bactéries des caractéristiques de résistance aux antibiotiques et à d'autres agents, leur présence peut également entraîner un "coût d'adaptation" pour la bactérie hôte, réduisant ainsi son

potentiel de croissance. Dans ce contexte, il serait intéressant d'évaluer l'influence de la présence de plasmides sur la sensibilité des bactéries au traitement par plasma. De plus, il est important d'étudier le potentiel du plasma pour inhiber les mécanismes de transfert horizontal de gènes (HGT) en évaluant leur fréquence.

Le travail de thèse vise donc à répondre à ces questions en adoptant une approche à la fois scientifique fondamentale et applicative. Les objectifs de recherche sont les suivants : i) caractériser la décharge de plasma en termes d'émission optique des espèces réactives produites et de leur impact sur la chimie du liquide traité, ii) évaluer l'influence des caractéristiques cellulaires lors des différentes phases de croissance bactérienne sur l'efficacité de la décontamination par plasma, et iii) étudier le potentiel du plasma pour l'inactivation des ARB et l'inhibition des HGT. Ces résultats permettront de mieux comprendre l'effet du plasma sur les propriétés physico-chimiques du liquide traité, sur la cellule bactérienne et sur les gènes de résistance aux antibiotiques, contribuant ainsi à l'avancement des connaissances dans ce domaine et à la mise au point de nouvelles méthodes de décontamination des eaux usées.



## *Chapitre II : Matériel & Méthodes*

Ce chapitre est structuré en trois parties distinctes qui abordent différents aspects de l'interaction entre le plasma et la cible liquide, ainsi que les effets du plasma sur les bactéries.

La première partie se concentre sur la source de plasma utilisée et les diagnostics électriques et optiques employés pour caractériser physiquement la décharge plasma. Cette section présente en détail la source de plasma utilisée dans l'étude, ainsi que les différents paramètres électriques et optiques mesurés pour comprendre les propriétés de la décharge.

La deuxième partie se penche sur les interactions chimiques entre le plasma et la cible liquide. L'objectif de cette section est de quantifier les principales espèces réactives de l'oxygène et de l'azote produites dans la phase liquide après exposition au gaz ionisé. Différentes techniques



analytiques sont utilisées pour mesurer les concentrations d'espèces réactives oxygénées et azotées. Ces mesures permettent de comprendre les mécanismes de transfert des espèces réactives du plasma vers la phase liquide.

La dernière partie aborde les effets des espèces réactives du plasma sur les bactéries. Tout d'abord, cette section présente les souches de bactéries utilisées dans l'étude, ainsi que leurs conditions de culture et de stockage. Ensuite, les protocoles expérimentaux sont regroupés en fonction des cas d'étude spécifiques. Le premier cas d'étude examine l'influence de la phase de croissance bactérienne sur l'efficacité de la décontamination microbiologique des liquides par le plasma. Le deuxième cas d'étude se concentre sur l'effet du plasma sur l'inactivation des bactéries résistantes aux antibiotiques (ARB) et sur l'inhibition des mécanismes de transfert horizontal de gènes (HGT). Ces études expérimentales permettent d'évaluer l'efficacité du plasma en fonction de différents paramètres et conditions expérimentales.

## 1. Caractérisation physique du plasma

### 1.1. Configuration de la décharge plasma

La source de plasma utilisée est une décharge à barrière diélectrique (DBD) présentant une géométrie cylindrique avec quatre tubes de sortie. Un schéma descriptif de la décharge est présenté à la Figure 17. La source est un tube asymétrique en verre de borosilicate constitué de deux parties : une partie supérieure de 38 mm de largeur et de 50 mm de longueur, et une partie inférieure divisée en quatre tubes de 40 mm de longueur, 4 mm de diamètre interne et 6 mm de diamètre externe. L'espace entre chaque tube est de 6 mm. La distance entre les parties supérieure et inférieure est de 20 mm. La partie supérieure est reliée à une électrode de masse de 22 mm de hauteur. La partie inférieure est connectée à l'électrode haute tension de 35 mm de hauteur. Les deux électrodes sont découpées dans un ruban adhésif en aluminium et collées à l'extérieur du tube.

Le gaz utilisé pour créer le plasma est un mélange d'hélium (99,80 %) et de dioxygène (0,2%) fourni par la société Linde. Le gaz est injecté dans la partie supérieure du tube et se diffuse ensuite dans les quatre tubes de la partie inférieure. Le flux d'hélium-dioxygène ( $\text{He}/\text{O}_2$ ) est contrôlé par un débitmètre massique (El-flow Select, Bronkhorst) permettant de fixer le débit à 2  $\text{L}\cdot\text{min}^{-1}$ .

La configuration de la source permet de générer une décharge plasma dans la partie supérieure qui se propage ensuite à travers les quatre tubes, formant ainsi quatre jets de plasma. On l'appellera « multi-jets de plasma ». À la sortie de chaque tube, les espèces réactives produites dans la décharge interagissent avec les composés de l'air ambiant, puis avec la surface du liquide. La source de plasma et le mélange de gaz ont été déterminés à partir de travaux antérieurs du laboratoire DPHE. Les résultats obtenus avaient notamment montré une forte production d'espèces réactives de l'oxygène et de l'azote (Invernizzi 2019). De plus, les jets de plasma à pression atmosphérique d'hélium-dioxygène sont largement étudiés pour des applications de décontamination, ce qui nous permettra de compléter l'analyse des effets antibactériens des procédés par plasma.

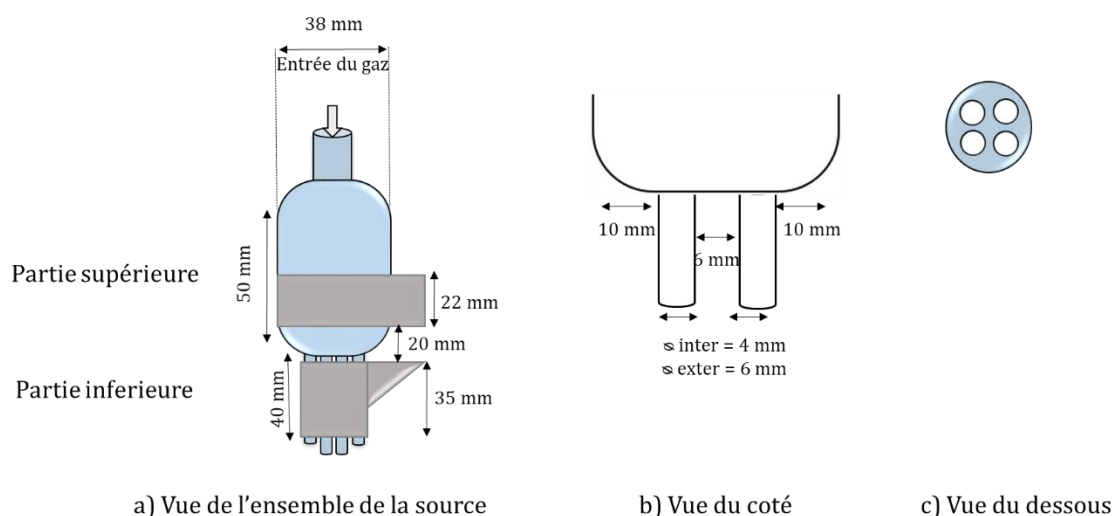


Figure 17 Représentation schématique de la source plasma multi-jets

## 1.2. Alimentation électrique du multi-jets plasma

Le plasma est généré par l'application d'un champ électrique suffisamment élevé entre les deux électrodes, permettant l'ionisation du gaz. Le système d'alimentation utilisé comprend un générateur haute tension (SR10 KV-300 W, Technix) capable de fournir une tension continue allant jusqu'à 10 kV, ainsi qu'un générateur d'impulsions haute tension (Nanogen1, RLC Electronic) qui permet de générer des impulsions électriques de commande. Le générateur d'impulsions permet de découper la tension issue du générateur haute tension à des fréquences allant de 1 Hz à 100 kHz, avec des durées d'impulsions variant entre 150 ns et 50  $\mu$ s. Dans le cadre de ces travaux, la fréquence est fixée à 20 kHz et la durée d'impulsion est fixée à 2,5  $\mu$ s, soit un rapport cyclique de 5 %. La tension est réglée à 6 kV, cette valeur étant choisie de manière à obtenir un plasma stable dans le temps, capable de se propager sur plusieurs centimètres dans

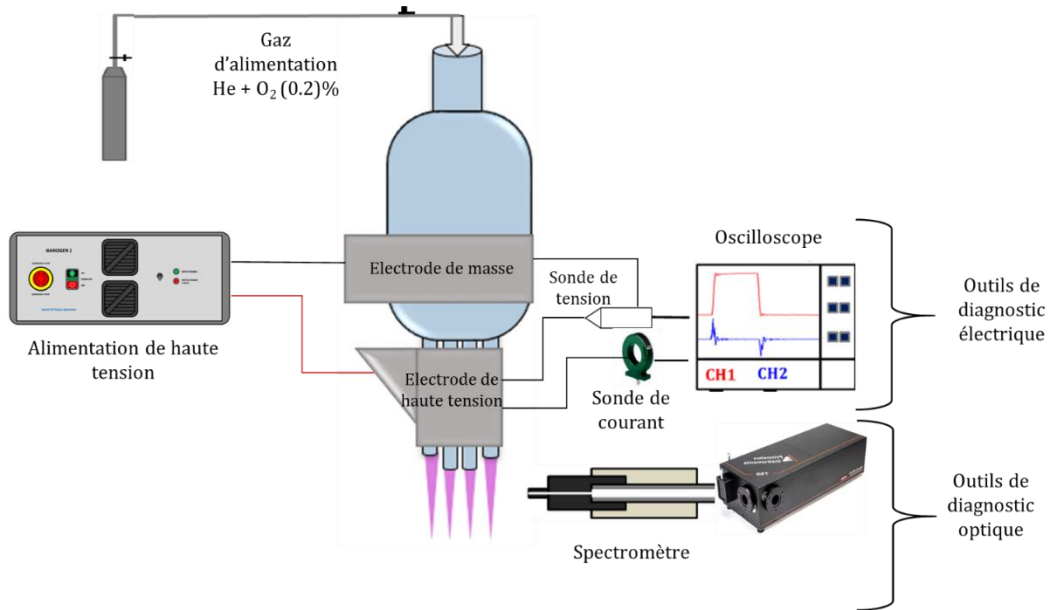
l'air ambiant à la sortie des tubes. L'ensemble du dispositif est relié à la masse pour éviter l'accumulation de charge sur les surfaces métalliques et assurer une manipulation en toute sécurité.

### 1.3. Liquide en interaction avec le multi-jets plasma

La décharge plasma utilisée dans ce travail de thèse est une décharge produite dans la phase gazeuse et qui entre en contact avec la surface du liquide. La distance entre la sortie des multi-jets plasma et la surface du liquide est fixée à 5 mm. Cette distance a été déterminée en fonction de travaux antérieurs réalisés au laboratoire DPHE (Invernizzi 2019). Le liquide utilisé pour l'ensemble des expériences physiques, chimiques et microbiologiques est une solution saline (NaCl 0,9 %) contenue dans un cristalliseur en Pyrex. Le volume de liquide traité est fixé à 100 mL. Le cristalliseur est placé sur une plaque de cuivre reliée à la masse pour éviter que le liquide soit à un potentiel flottant, notamment afin d'assurer la reproductibilité des expériences. Les temps de traitement fixés sont de 5, 10, 20 et 30 minutes, ainsi que 0 minute pour le contrôle.

### 1.4. Diagnostics du multi-jets plasma

Différents outils de mesure ont été utilisés pour caractériser le plasma d'un point de vue électrique (mesures de tension et de courant) et optique. Ces outils sont présentés dans le schéma global du montage expérimental, illustré à la Figure 18. Les divers outils de diagnostic du plasma, tels que l'oscilloscope, les sondes de tension et de courant, ainsi que le dispositif pour la spectroscopie d'émission optique, seront décrits dans la partie suivante.



**Figure 18** Représentation schématique du montage expérimental avec les différents outils de diagnostic électrique et optique.

## 1.5. Diagnostic électrique

### 1.5.1. Mesure des signaux de tension et de courant

Des mesures électriques de tension et de courant sont effectuées pour obtenir des informations sur la génération et la dynamique de la décharge. Ces mesures permettent de calculer la puissance et l'énergie déposées par la décharge. Tous les signaux électriques sont visualisés et enregistrés simultanément à l'aide d'un oscilloscope numérique (Rohde & Schwarz) possédant une bande passante de 2 GHz avec une fréquence d'échantillonnage de 5 GSa/s.

La sonde de tension est connectée en parallèle, entre l'électrode de haute tension et l'électrode de masse (Figure 18). Elle permet de mesurer la tension appliquée entre les bornes des deux électrodes pour générer la décharge électrique. Il s'agit d'un modèle Tektronix P6015A avec une bande passante de 75 MHz. La sonde de tension est connectée à un adaptateur (Tektronix, TCA-1MEG 500 MHz) avant d'être reliée à l'oscilloscope. La Figure 19 présente un exemple de mesures de tension lors d'une décharge.

La sonde de courant est branchée à l'électrode haute tension (Figure 18). Il s'agit d'un modèle Pearson Electronics 6585, avec une gamme de fréquences allant de 40 Hz à 250 MHz et une sensibilité de 1 V/A. La Figure 19 présente un exemple de mesure électrique.

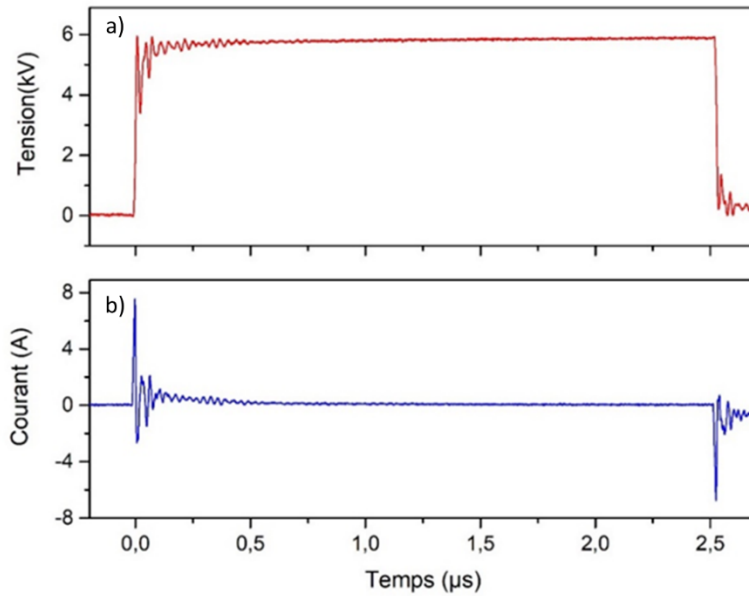


Figure 19 Profils de tension et de courant mesurés aux bornes de la décharge plasma.

### 1.5.2. Mesure de la puissance et de l'énergie

Les signaux provenant des sondes de tension et de courant permettent de calculer l'énergie déposée dans la décharge. Dans le cas des décharges impulsionnelles, la mesure de l'énergie est confrontée au problème du décalage temporel de plusieurs nanosecondes entre les signaux de tension et de courant, ce qui ne permet pas d'estimer correctement l'énergie déposée. Afin de synchroniser temporellement les signaux, des mesures de tension et de courant sont effectuées à 6 kV en l'absence et en présence du plasma. En l'absence du gaz d'alimentation, la source est considérée comme un condensateur parfait  $C_{eq}$ , et le courant et la tension seront estimés selon l'Equation 1 :

$$i(t) = C_{eq} \frac{\partial u(t' + \Delta\tau)}{\partial t'} \quad \text{Equation 1}$$

Où  $i(t)$  est le courant,  $u(t)$  est la tension et  $\Delta\tau$  représente le délai entre  $t$  et  $t'$ . À partir de cette équation, un décalage temporel est ainsi mesuré. La Figure 20 présente le décalage temporel entre la dérivée temporelle du signal de tension et celui du courant, égal à 3,9 ns.

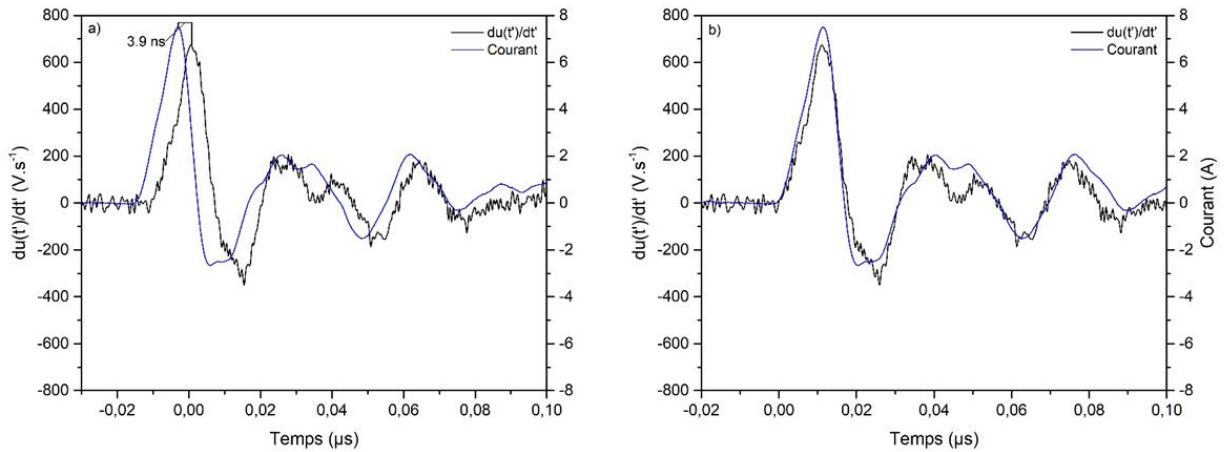


Figure 20 Mesure du décalage temporel, a) signaux non synchronisés, b) signaux synchronisés.

La puissance instantanée  $P(t)$  consommée par le plasma est déterminée en multipliant les signaux de tension et de courant synchronisés. L'intégrale du produit de la puissance permet de déduire l'énergie  $E$  de la décharge durant un intervalle de temps  $[t_1, t_2]$ . La Figure 21 présente l'énergie calculée selon l'Equation 2 :

$$E = \int_{t_1}^{t_2} P(t) dt \quad \text{Equation 2}$$

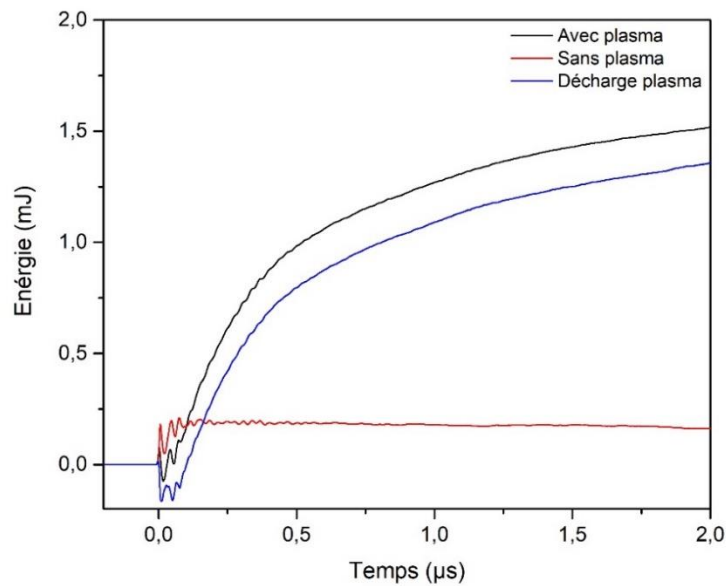


Figure 21 Comparaison de l'énergie dissipée sans et avec décharge sur le front montant de l'impulsion. Energie avec plasma (noir), énergie de la décharge plasma (bleu), et énergie sans plasma (rouge).

## 1.6. Diagnostic optique

### 1.6.1. Spectroscopie d'émission optique : principe physique

La spectroscopie d'émission optique permet la décomposition des émissions lumineuses du plasma et l'identification des espèces réactives excitées. Dans un plasma, les atomes et les molécules se trouvent dans un état excité. Lorsqu'un atome a un niveau d'énergie donné entre en collision avec une espèce excitée, cet atome passe à un autre état excité. Le passage d'un état excité à un autre correspond au changement du niveau électronique. Le retour à l'état fondamental s'accompagne de l'émission d'un photon qui se caractérise par une longueur d'onde, comme illustré dans la Figure 22.

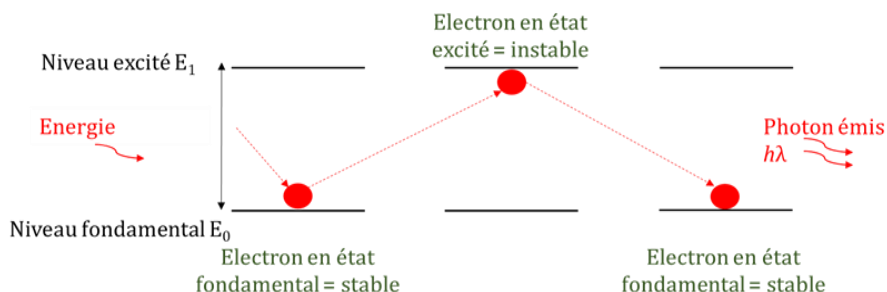
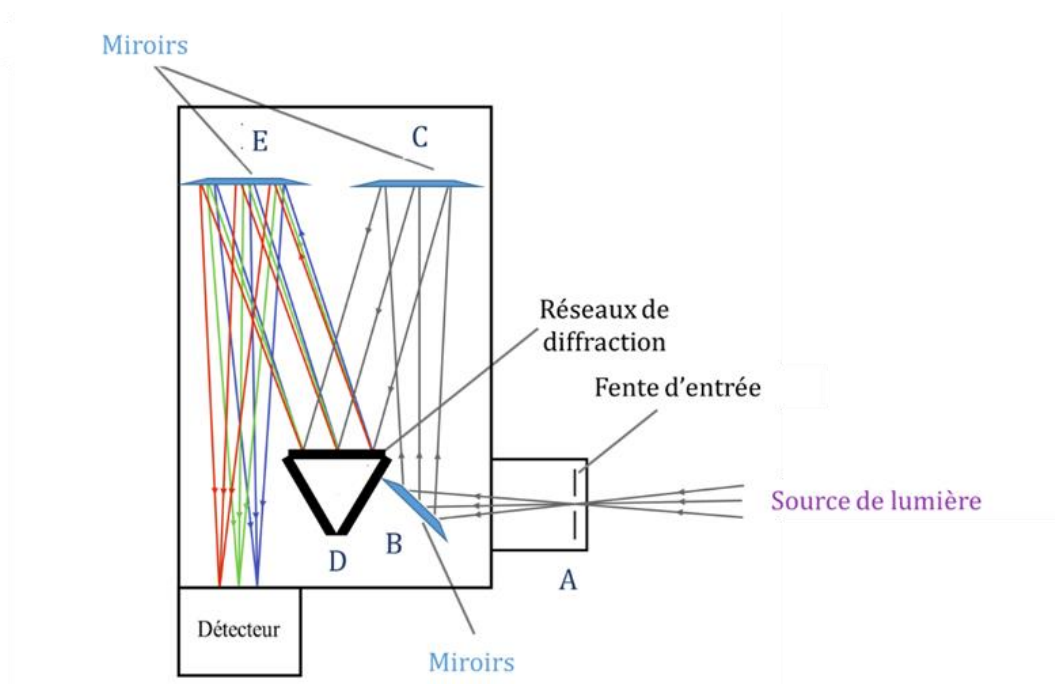


Figure 22 Représentation schématique du principe de la spectroscopie d'émission optique

La lumière émise par le plasma est collectée par un spectromètre, et son intensité est exprimée en fonction de la longueur d'onde. L'identification des espèces émises par le plasma permet de comprendre la chimie générée à l'interface plasma-liquide et les différentes réactions qui peuvent se produire dans le liquide traité. L'étude des spectres d'émission permet également de déterminer les paramètres physiques de la décharge, tels que la température et la densité électronique.

La Figure 23 illustre le principe de fonctionnement d'un spectromètre de type Czerny-Turner. La lumière issue de la décharge du plasma est collectée par une fibre optique, traverse la fente d'entrée du monochromateur (A), puis arrive sur un premier miroir plan (B). Ensuite, la lumière atteint un deuxième miroir parabolique (C), qui réfléchit la lumière en un faisceau de rayons parallèles sur le réseau de diffraction (D). Ce réseau est un système optique composé d'une série de fentes fines, parallèles et équidistantes (traits du réseau) situées dans un même plan. Ces traits sont espacés de manière régulière, et l'espacement est appelé le "pas" du réseau. Plus le réseau contient de traits par millimètre, plus son pouvoir de diffraction est grand. Ce réseau

permet de diffracter et envoyer les faisceaux lumineux sur un troisième miroir (E) qui va les focaliser au niveau du plan focal de la camera iCCD (thèse de Claire Douat, 2014)<sup>1</sup>.



**Figure 23** Représentation schématique du principe de fonctionnement d'un spectromètre d'émission optique, adapté de (Douat 2014).

### 1.6.2. Protocole expérimental

Le montage expérimental mis en place pour le diagnostic optique se compose d'une fibre optique de 600  $\mu\text{m}$  de diamètre, connectée à un monochromateur haute résolution (Princeton Instrument, HRS-750) avec une distance focale de 75 mm, équipé de trois réseaux de diffraction : 300  $\text{trait}.\text{mm}^{-1}$ , 2400  $\text{trait}.\text{mm}^{-1}$  et 3600  $\text{trait}.\text{mm}^{-1}$ , et d'une caméra intensifiée iCCD Pi-MAX4 (Princeton Instruments). Les observations sont réalisées sur un seul jet de plasma. Le spectre a été enregistré à la sortie du jet et au centre, ce qui correspond à  $Z = Y = 0$  mm (Figure 24).

La lumière émise par le plasma traverse une première lentille convergente de distance focale de 100 mm, puis atteint une deuxième lentille convergente de 200 mm de focale. La lumière atteint la fibre optique, puis la fente d'entrée du monochromateur. Un filtre bloquant les émissions inférieures à 450 nm a été utilisé pour éliminer les émissions du 2<sup>ème</sup> ordre, à l'exception des raies atomiques de l'hélium et de l'oxygène. Le temps d'intégration est adapté pour éviter la saturation de la caméra. Le système optique est monté sur un support coulissant avec deux axes.

<sup>1</sup> <https://theses.hal.science/tel-00960400>



L'axe (Y), selon le diamètre du jet plasma, permet de faire un scan en position radiale. L'axe (Z), le long du jet plasma à la sortie du tube, sert à faire un scan en position axiale. L'utilisation de la spectroscopie nous a permis dans un premier temps d'identifier les espèces produites par le plasma, de suivre l'évolution de leur intensité en fonction de la position le long du jet, et de pouvoir déterminer la températures rotationnelle et vibrationnelle de l'azote.

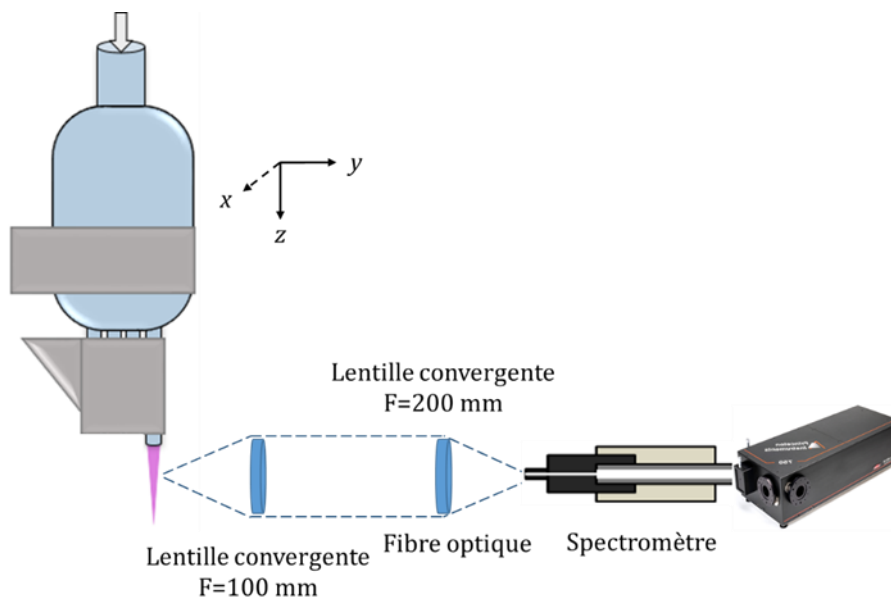


Figure 24 Représentation schématique du montage optique.

## 2. Caractérisation chimique du liquide

### 2.1. Mesures de la température et du pH

Des mesures de température et de pH ont été effectuées pour la solution traitée par plasma à différents temps d'exposition. Pour ce faire, nous avons utilisé un pH-mètre muni d'une sonde fournissant les valeurs du pH et de la température (WTW™ 1AA114). Après étalonnage avec différentes solutions étalons, la sonde est plongée dans la solution traitée. Les valeurs des deux grandeurs sont affichées avec une précision de deux chiffres significatifs après la virgule.

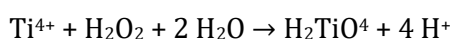
### 2.2. Spectroscopie d'absorption UV-visible : principe physique

La spectroscopie d'absorption est une méthode analytique quantitative qui consiste à mesurer la concentration d'une molécule chimique en solution. Elle repose sur l'absorption du rayonnement par les molécules dans le domaine spectral allant de 190 à 800 nm. Après avoir

préparé une courbe de calibration avec des concentrations connues, la concentration de l'espèce à analyser est déduite selon la loi de Beer-Lambert. Elle correspond à la projection de l'absorbance d'une solution à la concentration de l'analyte présent dans la solution selon une longueur d'onde définie.

### 2.2.1. Mesure du peroxyde d'hydrogène

Le peroxyde d'hydrogène (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) est considéré comme l'une des principales espèces radicalaires de l'oxygène produites par les jets plasma. Du fait de sa longue durée de vie, l'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> peut être mesuré et permet de révéler les propriétés chimiques du liquide traité après exposition au plasma. Le dosage du peroxyde d'hydrogène est réalisé selon la méthode d'Eisenberg (Eisenberg 1943). Cette dernière repose sur la formation des ions de titane H<sub>2</sub>TiO<sub>4</sub><sup>+</sup>. En milieu acide, l'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> réagit avec l'oxysulfate de titane en formant les ions de H<sub>2</sub>TiO<sub>4</sub><sup>+</sup>, un composé de couleur jaune orangé :



Après exposition au plasma, 100 µL de l'échantillon traité sont mélangés avec du sodium azide et de l'oxysulfate de titane. La réaction est incubée pendant 10 minutes à température ambiante. L'absorbance est mesurée à 407 nm avec un lecteur automatique de plaque (Tecan, Infinite 200 Pro). La formation du complexe de couleur jaune est immédiate et reste stable au moins 6 heures. La courbe de calibration est préparée en diluant une solution mère de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> à 30% à différentes concentrations allant de 0 à 1,6 mM.

### 2.2.2. Mesure du nitrite et nitrate

Tout comme le peroxyde d'hydrogène, les ions nitrite et nitrate sont considérés comme les principales espèces réactives d'azote produites par le plasma à pression atmosphérique. Selon le protocole fourni par le kit Enzo (kit de détection de l'oxyde nitrique (NO<sub>2</sub><sup>-</sup>/NO<sub>3</sub><sup>-</sup>), Enzo), la quantification des nitrites et nitrates est réalisée avec une méthode colorimétrique en utilisant deux réactifs de Griess. Le protocole de mesure se déroule en deux étapes. La première permet le dosage direct des ions nitrite, qui réagissent avec l'acide sulfanilique (Griess I) pour former le sel de diazonium. Ce dernier réagit avec l'α-naphtylamine (Griess II) pour former une coloration violette avec une longueur d'onde maximale à 540 nm. La deuxième étape permet la quantification des nitrates. Elle consiste à convertir les nitrates en nitrites en utilisant l'enzyme nitrate

réductase. La concentration des ions nitrate est obtenue en soustrayant les résultats du dosage des nitrites en absence et en présence de l'enzyme nitrate réductase. L'absorbance est mesurée à 540 nm avec un lecteur automatique de plaque (Tecan, Infinite 200 Pro).

### 3. Caractérisation des effets du plasma sur les bactéries

#### 3.1. Souches de bactérie et plasmide

##### a) *E. coli* K-12 MG1655

*E. coli* K-12 MG1655 est une souche non pathogène largement étudiée en laboratoire. Elle nous a été fournie par l'American Type Culture Collection (Manassas, Virginie, États-Unis). Cette souche est utilisée pour évaluer l'influence de la phase de croissance bactérienne sur l'efficacité de la décontamination du liquide par le plasma. Son génotype est le suivant : K-12 F-  $\lambda$ - ilvG- rfb-50 rph-1.

##### b) *E. coli* DH5 $\alpha$

*E. coli* DH5 $\alpha$  est chimiquement compétente (MAX Efficiency® DH5 $\alpha$ ™ Competent Cells, Invitrogen). Elle possède pour génotype : F- endA1 glnV44 thi-1 recA1 relA1 gyrA96 deoR nupG  $\Phi$ 80dlacZ $\Delta$ M15  $\Delta$ (lacZYA-argF) U169, hsdR17(rK- mK+),  $\lambda$ -. Cette souche est utilisée pour la transformation bactérienne avec le plasmide pUC19. Elle a permis d'obtenir la souche *E. coli* DH5 $\alpha$  (*amp*<sup>R</sup>) résistante à l'ampicilline.

##### c) *E. coli* HT-99

*E. coli* HT-99 provient du National Centre for Biotechnology Education (University of Reading, UK). Cette souche est une dérivée de *E. coli* K-12 avec un facteur de fertilité F<sup>+</sup> et une résistance plasmidique au chloramphénicol (*chlo*<sup>R</sup>). *E. coli* HT-99 est utilisée pour les expériences de conjugaison bactérienne comme bactérie donneuse.

### d) *E. coli* J-53R

*E. coli* J-53R provient du National Centre for Biotechnology Education (University of Reading, UK). Cette souche dérivée de *E. coli* K-12 portant une résistance chromosomique à la rifampicine (*rif<sup>R</sup>*). *E. coli* J53-R est utilisée pour les expériences de conjugaison bactérienne comme bactérie réceptrice.

### e) Vecteur pUC19

Le vecteur pUC19 est un plasmide multi-copies. Il permet d'obtenir une grande quantité de plasmides (MAX Efficiency® DH5α™ Competent Cells, Invitrogen). Ce plasmide possède le gène qui code pour la résistance à l'ampicilline (*amp<sup>R</sup>*) permettant la transformation bactérienne de *E. coli* DH5α. Ce plasmide est utilisé pour étudier la sensibilité des bactéries à la décontamination microbiologie des liquides par plasma.

## 3.2. Composition des milieux cultures

Plusieurs milieux de culture ont été utilisés : des milieux non restrictifs de trypticase-soja (TS) et luria-bertani (LB), à l'état solide et liquide, supplémentés par les antibiotiques adéquats ; et des milieux solides restrictifs supplémentés par le chlorure de sodium (NaCl) pour la mise en évidence des effets sous-létaux du plasma sur les bactéries. Avant chaque utilisation, les milieux sont stérilisés pendant 20 minutes à 120°C avant l'ajout des antibiotiques. Ces milieux sont présentés ci-dessous (Table 3):

**Table 3** Liste des milieux de culture et des concentrations d'antibiotique utilisées.

Souche	Milieu de culture	Préparation	Supplément	
<i>E. coli</i> K-12	TSB	Milieu préparé comme recommandé par le fournisseur (Difco)		
	TSA		NaCl 3%	
<i>E. coli</i> DH5α	LB			
	LBA		NaCl 1%	
<i>E. coli</i> DH5α ( <i>amp<sup>R</sup></i> )	LB			Ampicilline à 100 µg.mL <sup>-1</sup>
	LBA			
<i>E. coli</i> HT-99 ( <i>chlo<sup>R</sup></i> )	LB			Chloramphénicol à 25 µg.mL <sup>-1</sup>
	LBA			
<i>E. coli</i> J-53R ( <i>rif<sup>R</sup></i> )	LB			Rifampicine à 100 µg.mL <sup>-1</sup>
	LBA			
<i>E. coli</i> HT-99 x <i>E. coli</i> J53-R	LBA		Chloramphénicol à 25 µg.mL <sup>-1</sup> et Rifampicine à 100 µg.mL <sup>-1</sup>	

### 3.3. Conditions de conservation

Les cultures de souches de référence sont préparées à partir des échantillons lyophilisés. La croissance bactérienne est rétablie en les plaçant dans du TSB ou du LB, puis en les incubant en condition aérobie à 37°C pendant 24 ou 48 heures, en fonction des besoins de croissance spécifiques à la souche bactérienne. Pour la conservation à court terme, les souches sont stockées à 4°C sur des pentes de gélose non supplémentée en antibiotique, afin d'éviter une pression de sélection liée à l'antibiotique. Pour la conservation à long terme, les souches sont stockées à -80°C dans des tubes cryogéniques (Tubes cryogéniques Nalgene™) contenant des billes poreuses.

### 3.4. Etude 1 : Influence de la phase de croissance sur l'efficacité de la décontamination des liquides

#### 3.4.1. Cinétique de croissance de *E. coli* K-12 sur milieu non restrictif

Une étude de la cinétique de croissance d'*E. coli* K-12 a été préalablement réalisée pour déterminer les différentes phases de croissance. La bactérie a été pré-cultivée pendant 16 heures à 37°C sous agitation. Cette pré-culture a ensuite été utilisée pour inoculer le milieu TSB et incubée à 37°C sous agitation. La cinétique de croissance a été suivie pendant 20 heures avec un intervalle d'une heure, en prélevant 1 mL de la suspension en culture. Les échantillons prélevés ont été dilués en cascade dans une solution saline stérile à 0,9%, puis inoculés dans du TSA et incubés à 37°C pendant 24 heures. La Figure 25 présente la cinétique de croissance de *E. coli* K-12 avec ses phases de croissance. Pour chaque étalement de 100 µL, les comptages ont été réalisés pour des dilutions présentant 30 à 300 colonies.

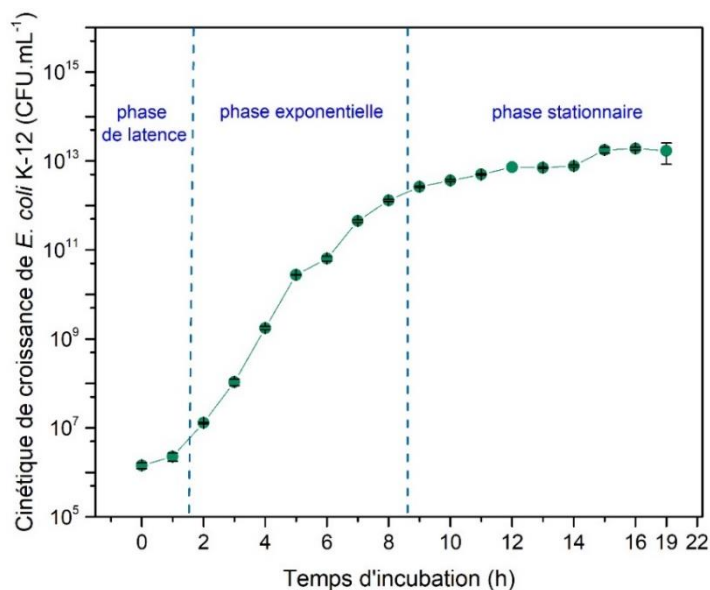


Figure 25 Cinétique de croissance de *E. coli* K-12 sur milieu non restrictif avec les trois phases de croissance distinctes

### 3.4.2. Cinétique de croissance de *E. coli* K-12 sur milieu restrictif

Après un traitement physique ou chimique, les bactéries peuvent être tuées ou se trouver dans un état de survie avec des lésions sous-létales. Ces lésions peuvent être de nature structurelle (comme la réduction de la taille de la cellule ou l'altération de la membrane) ou métabolique (causant des dommages aux composants fonctionnels des cellules). Une des techniques couramment utilisées pour mettre en évidence ces lésions sous-létales consiste à inoculer les bactéries exposées au plasma dans un milieu nutritif contenant du chlorure de sodium (NaCl) (Espina et al. 2016).

Pour cette étude, nous avons tout d'abord déterminé la concentration maximale de NaCl pouvant être ajoutée au milieu nutritif sans affecter le développement des bactéries. *E. coli* K-12 a été cultivée à 37°C en aérobiose sous agitation. Après 16 heures, la culture a été diluée en cascade dans une solution saline à 0,9% et inoculée sur du TSA supplémenté avec différentes concentrations de NaCl, allant de 0 à 5%. Après 24 heures d'incubation à 37°C, le nombre de colonies formées a été calculé. Les colonies présentaient des tailles plus petites sur le milieu TSA contenant du NaCl. Nous avons déterminé que la concentration maximale de NaCl qui n'avait pas affecté la croissance de *E. coli* K-12 était de 3% (Figure 26).

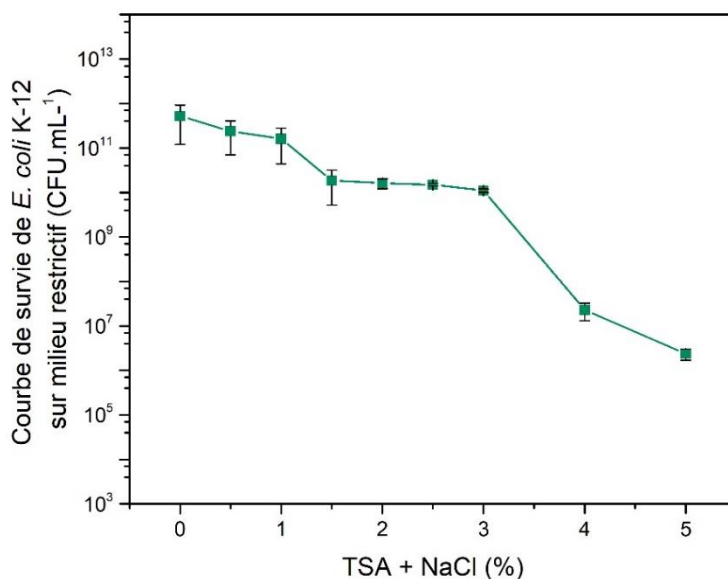


Figure 26 Cinétique de croissance de *E. coli* K-12 sur milieu restrictif.

### 3.4.3. Préparation de la suspension bactérienne

À partir du stock d'*E. coli* K-12 conservé à 4°C, une culture est préparée dans un milieu TSB et incubée à 37°C en conditions d'aérobies pendant 16 heures. Pour les expériences avec les bactéries en phase stationnaire, la suspension est directement lavée et préparée pour le traitement par plasma. Pour les expériences avec des bactéries en phase exponentielle, une deuxième culture est réalisée à partir de la pré-culture de la nuit. Un millilitre est prélevé pour être de nouveau inoculé dans du TSB et incubé à 37°C sous agitation pendant 6 heures jusqu'à atteindre une  $DO_{600nm}$  de 0,6. Les bactéries des deux phases de croissance sont ensuite resuspendues dans une solution saline stérile à 0,9%, atteignant ainsi une concentration finale de  $10^7$  CFU.mL<sup>-1</sup>. Les suspensions sont maintenues à 4°C jusqu'à leur utilisation pour le traitement par plasma.

### 3.4.4. Evaluation de la viabilité bactérienne

#### 3.4.4.1. Viabilité sur milieu de culture solide

Après le traitement par plasma, la suspension traitée est transférée dans un tube contenant du PBS. Les bactéries sont ensuite centrifugées à 12 000 g pendant 10 minutes à 4°C, puis remises en suspension dans une solution saline à 0,9%. Des dilutions au 10<sup>ème</sup> sont réalisées, et 3 gouttes de 10 µL sont déposées sur du TSA simple ou supplémenté avec NaCl à 3% pour mettre en évidence les lésions sous-létales. Les cultures sont incubées à 37°C pendant 24 heures. La réduction bactérienne après l'exposition au plasma a été déterminée en divisant le

nombre de cellules obtenu après exposition au plasma ( $N_{\text{plasma}}$ ) par le nombre de cellules du contrôle ( $N_c$ ) correspondant à la série d'expériences (Équation 3).

$$\text{Log survival ratio} = \text{Log} \left( \frac{N_{\text{plasma}}}{N_c} \right) \quad \text{Equation 3}$$

### 3.4.4.2. Activité métabolique

L'estimation de l'activité métabolique avec le sel de tétrazolium est basée sur la mesure de l'activité enzymatique de la déshydrogénase succinique présente dans la membrane cytoplasmique des bactéries (Joshi et al. 2011). Le tétrazolium est capable de pénétrer à l'intérieur des cellules par l'intermédiaire de la chaîne de transport d'électrons située au niveau de la membrane. Après avoir pénétré dans la cellule et en réponse à l'activité métabolique des cellules en état viable, le tétrazolium est réduit en formazan, un composé de couleur orange hydrosoluble.

L'activité métabolique est déterminée en utilisant le réactif 2,3-Bis-(2-méthoxy-4-Nitro-5-sulfophényl)-2H-tétrazolium-5-carboxanilide, également appelé le XTT (ThermoFisher Scientific). Une solution fraîche de XTT est préparée dans du PBS. Cette solution est ensuite supplémentée avec une solution de ménadione (Sigma-Aldrich). Le mélange est recouvert de papier aluminium et incubé à température ambiante avant son utilisation.

Après le traitement par plasma, la suspension traitée est transférée dans un tube contenant du PBS, puis centrifugée à 12 000 g pendant 10 minutes à 4°C, et remise en suspension dans du PBS. La suspension est mélangée avec la solution de XTT. Après 3 heures d'incubation à 37 °C, à l'obscurité et sous agitation, les échantillons sont lavés. L'absorbance du surnageant est mesurée à 475 nm à l'aide d'un lecteur de plaque spectrophotométrique (BioTek). L'activité métabolique est proportionnelle à l'absorbance de la solution à 475 nm. Elle est calculée en comparant le pourcentage de cellules vivantes exposées à celui des cellules de contrôle non exposées au plasma.



### 3.4.4.3. Intégrité membranaire

La perméabilité membranaire est analysée en utilisant le SYTO. Il s'agit d'un marqueur fluorescent intercalant des acides nucléiques. Dans le cas d'une cellule ayant subi une altération partielle ou totale de la membrane, le SYTO pénètre dans la cellule et se fixe sur l'ADN et/ou l'ARN. Il existe un certain nombre de SYTO dont les plus couramment utilisés sont le SYTO 9 et le SYTO Green-Fluorescent Nucleic Acid Stain. Les critères de sélection du SYTO reposent sur le matériel biologique étudié et la taille de l'ADN.

Dans le cas de notre étude, le SYTO Green-Fluorescent Nucleic Acid Stain à 5 mM (Invitrogen) est utilisé pour la mise en évidence de l'état de la membrane des cellules après exposition au plasma. Une solution fraîche de SYTO est préparée dans du DMSO (Invitrogen). Le mélange est conservé à l'obscurité et incubé à température ambiante avant son utilisation.

Après exposition au plasma, la suspension traitée est diluée dans du PBS pour avoir une concentration finale de bactéries égale à  $10^6$  CFU.mL<sup>-1</sup>. La suspension est ensuite centrifugée à 12000 g pendant 10 minutes à 4°C. Le culot de bactéries est remis en suspension dans la solution du SYTO. Le mélange est incubé à l'obscurité pendant 20 minutes à 37°C. Après incubation, l'intensité de fluorescence est mesurée avec  $\lambda$  excitation = 480 nm et  $\lambda$  émission = 520 nm, par lecture spectrophotométrique (BioTek). La diminution de l'intégrité membranaire des cellules est proportionnelle à l'intensité de la fluorescence émise par les cellules exposées au plasma. Le pourcentage de perte d'intégrité membranaire est calculé en rapportant au pourcentage des cellules vivantes exposées aux cellules de contrôle non exposées au plasma.

### 3.4.4.4. Taux des ROS intracellulaires

La mesure des espèces réactives d'oxygène (ROS) intracellulaire est réalisée à l'aide de la 2',7'-dichlorofluorescein-diacétate (DCFH-DA). En effet, le DCFH-DA est une sonde cellulaire non fluorescente qui se transforme en 2', 7'-dichlorodihydrofluorescéine (DAF) hautement fluorescente lors de son oxydation par les ROS, ce qui est indirectement corrélé à la concentration de ROS.

Une solution stock de DCFH-DA (97% Sigma) est préparée dans du DMSO (Invitrogen). A partir de cette solution stock, une autre solution de travail est préparée dans du PBS. La solution est ensuite conservée dans l'obscurité à température ambiante.

Après exposition au plasma, la suspension traitée est transférée dans un tube contenant du PBS. La suspension est centrifugée à 3000 g pendant 10 minutes à 4°C. Le culot est ensuite remis en suspension dans du PBS. Après une seconde centrifugation à 12 000 g pendant 10 minutes à 4°C, la suspension bactérienne est mélangée avec la solution de DCFH-DA (ratio 1 :1). Le mélange est mis en incubation à 37°C, à l'obscurité sous agitation pendant 20 min. Ensuite, la suspension est centrifugée à nouveau à 12 000 g pendant 10 minutes à 4°C et remise en suspension dans du PBS. L'intensité de fluorescence est mesurée avec  $\lambda_{\text{excitation}} = 480 \text{ nm}$  et  $\lambda_{\text{émission}} = 525 \text{ nm}$  par lecture spectrophotométrique (BioTek). Le pourcentage de la concentration relative des ROS intracellulaires est calculé en fonction de la fluorescence relative.

### 3.4.5. Evaluation de l'intégrité de l'ADN génomique

L'extraction de l'ADN génomique est réalisée à l'aide du kit PureLink Genomic DNA (Invitrogen). Après exposition au plasma, la suspension bactérienne est transférée dans un tube contenant du PBS. Les bactéries sont centrifugées à 3000 rpm pendant 10 minutes à 4°C. L'ADN est extrait en suivant le protocole défini par le fabricant. La concentration en ADN dans les échantillons est déterminée par spectrométrie UV (BioTek). L'intégrité de l'ADN est analysée par électrophorèse sur gel d'agarose à 1% dans un tampon TAE 1X (Biorad) à 100 V pendant 1 h en utilisant des marqueurs de taille (échelle d'ADN de 1 kb, Invitrogen). Les bandes sont visualisées avec du bromure d'éthidium sous lumière UV (VILBER, E-BOX).

## 3.5. Etude 2 : Effet du plasma sur l'inactivation des ARB et l'inhibition des HGT

### 3.5.1. Transformation bactérienne de *E. coli* DH5 $\alpha$

La transformation bactérienne de la souche *E. coli* DH5 $\alpha$  chimiquement compétente par le vecteur pUC19 a été effectuée à l'aide du kit MAX Efficiency® DH5 $\alpha$ ™ Competent Cells (Invitrogen). La transformation a été réalisée selon le protocole du fournisseur avec quelques modifications. En résumé, 100  $\mu\text{L}$  de cellules compétentes sont décongelés, puis mélangés avec 5  $\mu\text{L}$  de pUC19. Après 30 minutes d'incubation sur glace, les cellules sont exposées à un bain-marie à 42°C pendant 45 secondes pour réaliser le choc thermique nécessaire à l'introduction du plasmide dans les bactéries. Pour maximiser l'efficacité de la transformation, les cellules sont incubées dans 900  $\mu\text{L}$  du milieu SOC (Invitrogen) à 37°C pendant 1 heure. Enfin, différentes

dilutions de cette culture sont étalées sur des boîtes de Pétri contenant du milieu LB supplémenté en ampicilline ( $100 \mu\text{g.mL}^{-1}$ ) et incubées à  $37^\circ\text{C}$  pendant 24 à 48 heures.

### 3.5.2. Cinétique de croissance de *E. coli* DH5 $\alpha$ sur milieu restrictif

Tout comme dans l'étude précédente, la cinétique de croissance d'*E. coli* DH5 $\alpha$  à différentes concentrations de NaCl a été évaluée. *E. coli* DH5 $\alpha$  a été cultivée à  $37^\circ\text{C}$  en aérobose sous agitation. Après 16 heures, la culture a été diluée en cascade dans une solution saline à 0,9%, puis inoculée sur du milieu LBA supplémenté de différentes concentrations de NaCl allant de 0 à 3 %. Après 24 heures d'incubation à  $37^\circ\text{C}$ , le nombre de bactéries cultivables a été calculé. La concentration maximale de NaCl qui n'a pas affecté la croissance d'*E. coli* DH5 $\alpha$  est de 1 % (Figure 27).

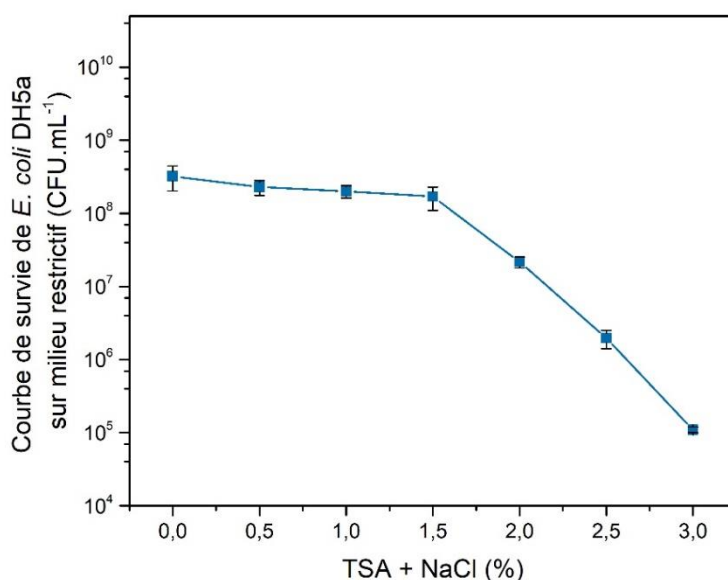


Figure 27 Cinétique de croissance de *E. coli* DH5 $\alpha$  sur milieu restrictif.

### 3.5.3. Préparation des suspensions de DH5 $\alpha$ , DH5 $\alpha$ (amp $R$ ), HT-99 et J-53R

A partir du stock, les quatre souches de *E. coli* sont préparées séparément dans le milieu LB supplémenté avec l'antibiotique approprié. Après 16 h, les suspensions sont lavées et re-suspendues dans la solution de NaCl à 0,9% à une concentration finale de  $10^7$  CFU.mL $^{-1}$ . Les suspensions sont maintenues à  $4^\circ\text{C}$  jusqu'à leur utilisation pour le traitement par plasma.

### 3.5.4. Evaluation de la viabilité bactérienne

L'effet du plasma sur la viabilité bactérienne a été évalué sur les quatre souches (DH5 $\alpha$ , DH5 $\alpha$  (ampR), HT-99 et J-53R) en tenant compte de trois paramètres : la survie sur plaque contenant les antibiotiques appropriés à chaque bactérie ; l'estimation de l'activité métabolique et de l'intégrité membranaire ; et la quantification du taux de ROS intracellulaires. Les protocoles expérimentaux ont été réalisés de la même manière que dans l'étude 1.

### 3.5.5. Evaluation de l'activité enzymatique

#### 3.5.5.1. Extraction des protéines

Le dosage des protéines est effectué en utilisant la méthode de Bradford avec le kit Pierce (Detergent Compatible Bradford Assay Kit, Thermo Scientific). Cette méthode repose sur l'interaction entre les protéines et le colorant de Bradford. Le colorant de Bradford est une solution contenant du bleu de Coomassie, qui a la capacité de se lier aux protéines pour former un complexe coloré. Lorsque le colorant de Bradford est ajouté à un échantillon contenant des protéines, les protéines se lient au colorant, provoquant un changement de couleur de la solution, passant du rouge au bleu, avec une absorbance située entre 650 et 750 nm. La quantité de colorant liée aux protéines est directement proportionnelle à la concentration de protéines dans l'échantillon.

Après le traitement par plasma, la suspension est transférée dans un tube contenant du PBS. Ensuite, la suspension est centrifugée à 3000 rpm pendant 10 minutes à 4°C, et les bactéries sont remises en suspension dans du PBS. Les bactéries sont centrifugées une seconde fois à 12000g pendant 10 minutes à 4°C. L'extraction des protéines est réalisée en suivant le protocole du fournisseur. Parallèlement, une gamme étalon, allant de 0 à 2 mg.mL<sup>-1</sup> d'albumine de sérum bovin (BSA, Thermo Fisher Scientific), est préparée. L'absorbance est mesurée à 750 nm en utilisant une lecture spectrophotométrique (BioTek).

#### 3.5.5.2. Quantification de la SOD

Le kit de dosage de l'activité colorimétrique de la superoxyde dismutase (SOD) (Superoxide Dismutase (SOD) Colorimetric Activity Kit, Invitrogen) est conçu pour mesurer de manière quantitative l'activité de la SOD dans une grande variété d'échantillons. Ce test permet

de mesurer tous les types d'activités de la SOD, y compris les types Cu/Zn, Mn et FeSOD. Il est sensible à la présence de la xanthine oxydase. Cette enzyme génère du superoxyde en présence d'oxygène, ce qui transforme un substrat initialement incolore dans le réactif de détection en un produit de couleur jaune, dont l'absorbance peut être mesurée à 450 nm. L'augmentation des niveaux de SOD dans les échantillons entraîne une réduction de la concentration de superoxyde et, par conséquent, une diminution de l'intensité de la couleur jaune produite.

Après l'exposition au plasma, la suspension est centrifugée pendant 10 minutes à 3000 g et à 4 °C, puis remise en suspension dans 1 mL de solution saline et transférée dans des tubes Eppendorf. Après une seconde centrifugation à 12 000 g pendant 10 minutes, le culot est remis en suspension dans une solution de lyse contenant du lysozyme (500 µL). Le mélange est incubé pendant 15 minutes à température ambiante. Les échantillons sont transférés dans des tubes contenant des microbilles en verre (BioSpec, 0,5 mm diameter glass beads). Les échantillons subissent ensuite cinq passages de 30 secondes à 5 m.s<sup>-1</sup> dans un broyeur à billes (Fisher Scientific, Bead Mill 4), espacés de 20 secondes de repos. Après avoir retiré les billes, les échantillons sont centrifugés à 12 000 g pendant 15 minutes à 4 °C. Dans une plaque multi-puits, les échantillons et les standards sont transférés puis le substrat et le réactif xanthine oxydase sont ajoutés. Le mélange est incubé à température ambiante pendant 20 minutes. La mesure d'absorbance est effectuée à 450 nm (BioTeK).

### 3.5.5.3. Quantification de la CAT

Le kit d'activité de catalase (Catalase (CAT) Colorimetric Activity Kit, Invitrogen) est conçu pour mesurer quantitativement l'activité de la catalase pour plusieurs types d'échantillon. Le kit contient le horseradish peroxidase (HRP) qui réagit avec le substrat en présence du peroxyde d'hydrogène pour convertir le substrat incolore en un produit de couleur rose. Le produit coloré est caractérisé à 560 nm. L'augmentation des taux de catalase dans les échantillons entraîne une diminution de la concentration en peroxyde d'hydrogène et une réduction du produit de couleur rose.

Tout comme le dosage de la SOD, après exposition au plasma, la suspension est centrifugée pendant 10 minutes à 3000 g et à 4 °C puis remise en suspension dans 1 mL de saline et transférée dans des tubes Eppendorf. Après une seconde centrifugation à 12 000 g pendant 10 minutes, le culot est remis en suspension dans une solution de lyse contenant du lysozyme (500µL), le mélange est incubé pendant 15 minutes à température ambiante. Les échantillons sont transférés

dans des tubes contenant des microbilles en verre (BioSpec, 0,5 mm diameter glass beads). Les échantillons subissent cinq passages de 30 secondes à 5 m.s<sup>-1</sup> dans un broyeur à billes (Fisher Scientific, Bead Mill 4), espacés de 20 secondes de repos. Après avoir retiré les billes, les échantillons sont centrifugés à 12 000 g pendant 15 minutes à 4 °C. Dans une plaque multi-puits, les échantillons et les standards sont transférés et du peroxyde d'hydrogène est ajouté à chaque puit. La plaque est incubée à température ambiante pendant 30 minutes. Le substrat et le HRP sont ensuite ajoutés. Le mélange est incubé à température ambiante pendant 15 minutes. La mesure d'absorbance est effectuée à 560 nm (BioTeK).

### 3.5.6. Evaluation de la concentration minimale inhibitrice (CMI)

Après exposition au plasma, nous avons testé la sensibilité de *E. coli* HT-99 à des concentrations de chloramphénicol comprises entre 0 et 130 µg.mL<sup>-1</sup>. Le dosage de la concentration minimale inhibitrice (CMI) a été effectué selon la méthode de microdilution à partir des travaux de Lambert et Pearson (2000). Les bactéries non traitées et traitées par plasma pendant 1, 2 et 5 minutes sont diluées à 1 :1000 dans du bouillon Mueller-Hinton (MH) frais. 50 µL de suspension bactérienne et 250 µL de milieu (MH) contenant les différentes dilutions d'antibiotique sont transférés dans la plaque multi-puits. Pour le contrôle positif, les puits ont été préparés en inoculant des bactéries sans antibiotique. Un puit non inoculé a été utilisé comme contrôle négatif. Les plaques ont été scellées, incubées et mises à la lecture à l'aide d'un lecteur de microplaque, à une absorbance de 600 nm (BioTeK), pendant 20 heures avec un intervalle de lecture de 1 heure. Les valeurs de CMI ont été déterminées comme décrit dans les travaux de Lambert et Pearson 2000.

### 3.5.7. Evaluation de la fréquence de HGT

Afin d'examiner la fréquence de transfert des gènes de résistance aux antibiotiques entre les bactéries après exposition au plasma, un protocole de conjugaison a été établi. Deux cultures de *E. coli* HT-99 et de *E. coli* J-53R ont été préparées séparément dans du LB supplémenté avec les antibiotiques appropriés. Les cultures ont été centrifugées, lavées, et chaque souche a été remise en suspension indépendamment. La souche donneuse, *E. coli* HT-99, a été remise en suspension dans la solution saline pour le traitement au plasma, comme décrit précédemment dans la section "Préparation de la suspension". La souche réceptrice, *E. coli* J-53R, a été remise en suspension dans du milieu LB sans antibiotique à une concentration finale de 10<sup>7</sup> CFU.mL<sup>-1</sup>.

La conjugaison a été réalisée en mettant en contact la souche donneuse (HT-99) exposée au plasma avec la souche réceptrice (J-53R) non exposée au plasma, selon un ratio de 1:1. Les mélanges ont été incubés à 37°C dans des conditions aérobies sous agitation pendant 6, 9, 24 et 48 heures d'incubation. Après chaque période d'incubation, 1 mL de chaque suspension a été prélevé, dilué, et utilisé pour ensemercer des géloses de LBA supplémenté de chloramphénicol, de rifampicine, ou des deux antibiotiques pour mettre en évidence les bactéries transconjugantes. La fréquence de conjugaison ( $F_C$ ) a été déterminée en divisant le nombre moyen de transconjugants par le nombre total de bactéries (donneuses, réceptrices et transconjugantes) ( $\text{CFU.mL}^{-1}$ ) (Équation 4) (Headd et Bradford, 2018).

$$F_C = \left( \frac{C_{CJ}}{C_D + C_{RE} + C_{CJ}} \right) \quad \text{Equation 4}$$

Avec  $C_{CJ}$  correspond aux nombres de cellules transconjugantes,  $C_D$  nombres de cellules donneuses et  $C_{RE}$  nombre de cellules réceptrices en  $\text{CFU.mL}^{-1}$ .

#### 4. Analyse statistique

Toutes les expériences de la partie chimie du liquide et microbiologie ont été réalisées au minimum 3 fois ( $n=3$ ), avec 2 répliques techniques et une moyenne de 3 à 6 répliques biologiques. Les comparaisons de moyenne ont été réalisées au moyen d'un test t de Student et les ANOVA à l'aide du OriginLab pro. Il existe différents degrés de significativité avec :

ns équivalent à un test non significatif ( $P > 0,05$ )

une étoile\* équivalent à un test significatif à 95,0 % ( $P < 0,05$ )

deux étoiles\*\* équivalent à un test plus significatif, à 99,0 % ( $P < 0,01$ )

trois étoiles\*\*\* équivalent à un test encore plus significatif, à 99,9 % ( $P < 0,001$ )





## *Chapitre III : Chimie des Interaction Plasma-Liquide*

Les interactions entre le plasma et le liquide génèrent diverses espèces réactives capables d'induire l'inactivation des microorganismes. Plusieurs études ont montré que les plasmas à pression atmosphérique produisent diverses espèces réactives de l'oxygène (ROS) et de l'azote (RNS). La génération de ces espèces dépend des caractéristiques de la décharge plasma utilisée et de la manière dont elle interagit avec le liquide, que ce soit de manière directe ou indirecte. Dans notre étude, la décharge est produite en phase gazeuse à la surface du liquide par contact indirect. Les espèces sont d'abord générées dans le plasma, puis traversent l'interface plasma-liquide avant de se diffuser dans le liquide. La nature et la quantité des espèces réactives produites dans la phase liquide dépendent fortement des espèces excitées présentes dans la décharge plasma.

Les espèces atomiques et moléculaires d'oxygène et d'azote dans le plasma jouent un rôle essentiel dans le processus d'inactivation bactérienne. Dans ce contexte, il est essentiel d'identifier et d'étudier la génération de ces espèces à l'état fondamental directement dans la décharge plasma avant leur interaction avec la cible liquide. Nous avons utilisé la technique de spectroscopie d'émission optique, qui nous permet à la fois d'identifier ces espèces, de suivre leur distribution le long du jet plasma et d'estimer la température du gaz en mesurant les températures rotationnelle et vibrationnelle de l'azote moléculaire. Comme mentionné dans le chapitre II (partie II), la caractérisation optique a été réalisée sur un seul jet plasma.

La diffusion des espèces réactives de la décharge plasma dans la phase liquide entraîne des réactions chimiques avec les molécules présentes dans le liquide, en particulier les molécules d'eau. Cela conduit à la formation d'espèces réactives d'oxygène et d'azote (RONS) qui se caractérisent par leur fort potentiel oxydant et leur longue durée de vie. Leur production est fortement impliquée dans la modification des propriétés physiques et chimiques du liquide. Pour cela, nous avons d'abord étudié l'influence du plasma sur la modification de la température et du pH du liquide. Ensuite, nous avons quantifié la concentration de certaines RONS produites dans le liquide, notamment le peroxyde d'hydrogène et les ions nitrites et nitrates.

## 1. Etude des espèces réactives émissives en phase gazeuse

### 1.1. Spectre optique des émissions du jet plasma

Le spectre d'émission des espèces issues du jet plasma en interaction avec la surface du liquide est représenté sur la Figure 28. Le spectre (a) correspond aux émissions des bandes moléculaires issues des interactions entre le plasma et l'air ambiant alors que le spectre (b) correspond aux raies atomiques issues du gaz plasmagène (He/0,2 % O<sub>2</sub>). Les espèces excitées sont identifiées à partir des travaux de Pearse et Gaydon pour les transitions des bandes moléculaires (Livre, *The Identification of Molecular Spectra*<sup>2</sup>) et à partir du site du *National Institute of Standards and Technology* (NIST) pour les transitions atomiques<sup>3</sup> (Pearce et Gaydon 1963).

Le spectre d'émission du domaine spectral entre 200 et 400 nm correspond au domaine UV (Figure 28. a). Les bandes moléculaires entre 200 et 300 nm correspondent aux transitions NO $\gamma$  (A<sup>2</sup> $\Sigma^+$ )  $\rightarrow$  NO $\gamma$  (X<sup>2</sup>I) avec un pic à 294,5 nm. Entre 280 à 320 nm, on distingue les bandes

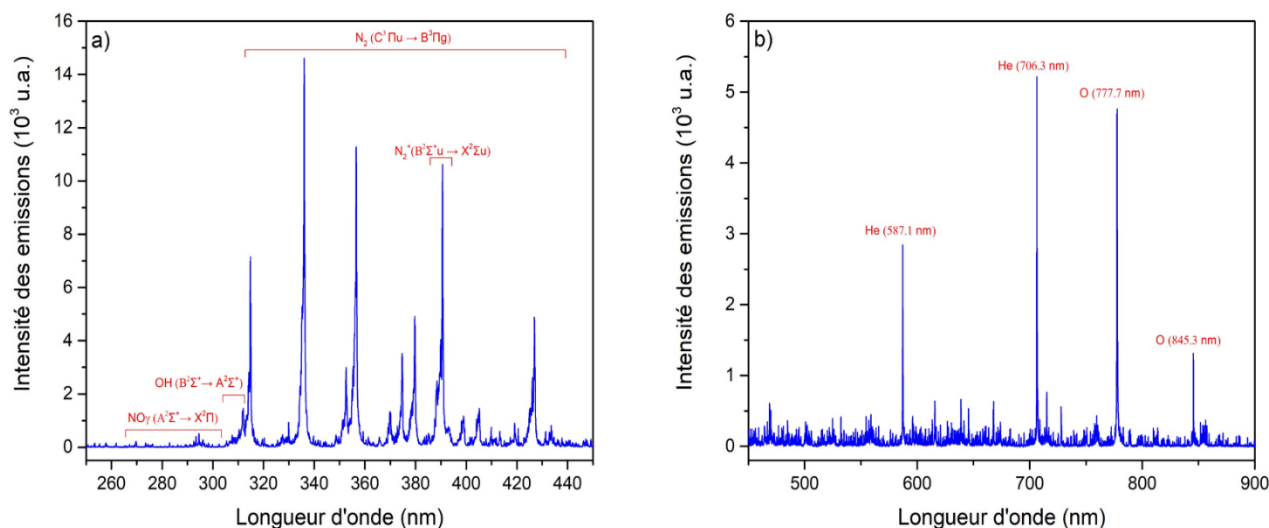
---

<sup>2</sup> ISBN: 978-94-009-5760-2

<sup>3</sup> [https://physics.nist.gov/PhysRefData/ASD/lines\\_form.html](https://physics.nist.gov/PhysRefData/ASD/lines_form.html)

moléculaires de OH correspondant à la transition  $B^2\Sigma^+ \rightarrow A^2\Sigma^+$  avec un pic à 314,2 nm. Les bandes moléculaires dominantes sont celles du second système positif (SSP) de l'azote ( $N_2$ ) correspondant à la transition  $C^3\Pi_u \rightarrow B^3\Pi_g$  avec un pic à 335,02 nm. Nous pouvons distinguer aussi le premier système négatif (PNS) du  $N_2^+$  à 390,6 nm correspondant à la transition  $B^2\Sigma^+u \rightarrow X^2\Sigma_u$ . La présence des espèces excitées de NO, OH,  $N_2^+$  et  $N_2$  est due aux collisions entre les électrons, les particules chargées et l'air ambiant.

Le spectre d'émission du domaine spectral entre 400 et 800 nm correspond au domaine du visible (Figure 28.b). On observe la dominance des raies atomiques de l'hélium à 587,1 et 706,3 nm correspondant respectivement aux transitions  $3^1P \rightarrow 2^1S$  et  $3^3S \rightarrow 2^3P$ . On observe aussi la présence de l'oxygène avec deux raies atomiques à 777,7 et 845,3 nm liées respectivement aux transitions  $3^5P \rightarrow 3^5S$  et  $3^3P \rightarrow 3^3S$ .



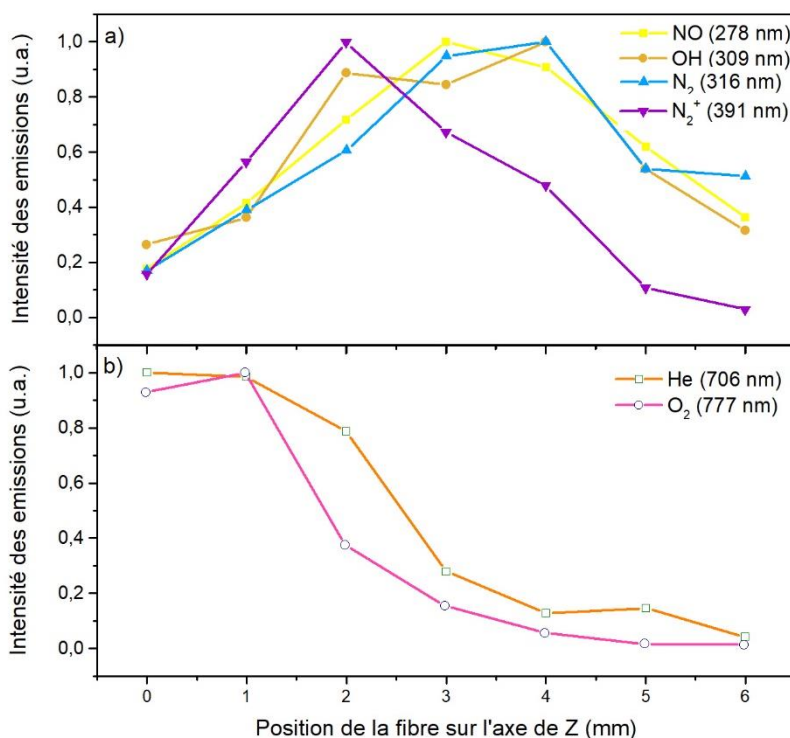
**Figure 28** Spectre d'émission du jet plasma en interaction avec la surface du liquide en position  $Z=Y=0$  mm ; (a) domaine UV, (b) domaine visible. Le plasma est généré à une tension de 6kV, des impulsions de 2,5μs, une fréquence de 20kHz et un débit He/0,2% O<sub>2</sub> de 2 L.min<sup>-1</sup>.

## 1.2. Intensité des espèces réactives le long du jet plasma

La Figure 29 présente l'évolution spatiale des espèces excitées le long du jet plasma. Les mesures ont été réalisées au centre du jet ( $Y=0$  mm) en fonction de l'axe de Z. Dans le cas de notre source plasma, la longueur de la plume plasma est de 6 mm.

Les profils des bandes moléculaires et des raies atomiques des espèces excitées présentent deux comportements différents le long du jet plasma. Sur la Figure 29 a, les émissions des bandes moléculaires issues des interactions entre le plasma et le milieu environnant correspondent aux

émissions de NO, OH, N<sub>2</sub> et N<sub>2</sub><sup>+</sup>. L'intensité de ces bandes moléculaires augmente rapidement entre la sortie du tube (Z = 0 mm) et la position Z = 4 mm du jet de plasma. Au-delà de cette position l'intensité chute lentement. Le deuxième profil d'intensité (Figure 29.b) correspond aux raies atomiques d'hélium et d'oxygène issues principalement du gaz d'alimentation. Les deux espèces présentent une forte intensité à la sortie du tube, puis elle diminue lentement tout au long du jet plasma jusqu'à ce que les émissions ne soient plus visibles.



**Figure 29** Distribution de l'intensité des espèces réactives le long d'un seul jet plasma ; a) espèces de l'air ambiant, b) espèces du gaz. Le plasma est généré à une tension de 6kV, des impulsions de 2,5 $\mu$ s, une fréquence de 20kHz et un débit He/0,2% O<sub>2</sub> de 2 L.min<sup>-1</sup>.

Ces résultats montrent les variations d'intensité des raies moléculaires et atomiques le long du jet plasma. Pour les raies atomiques, la diminution des intensités est relativement rapide, en passant d'une intensité de 1 de la sortie du jet à 0,2 à 4 mm du jet, soit 80 % de réduction. On peut donc en déduire que la décharge perd en énergie en s'éloignant de la sortie du tube, ce qui explique la diminution de l'émission de l'He et de l'O<sub>2</sub>. En revanche, l'intensité des bandes moléculaires de N<sub>2</sub>, par exemple, augmente entre 1 et 4 mm du jet plasma. Le comportement des bandes moléculaires peut quant à lui être expliqué par le mélange entre le gaz plasmagène et l'air ambiant. On retrouve très peu d'air à la sortie du tube, donc une émission plus faible de ces bandes. Puis, en s'éloignant de la sortie, la quantité d'air qui diffuse dans le plasma augmente, augmentant ainsi les émissions car le plasma est encore intense. Enfin, dans la dernière section (5 à 6 mm), la

quantité d'air présent dans le mélange devient trop important pour permettre la propagation du plasma. Toutes les émissions lumineuses diminuent, et on s'approche de la fin du jet plasma.

### 1.3. Température du gaz

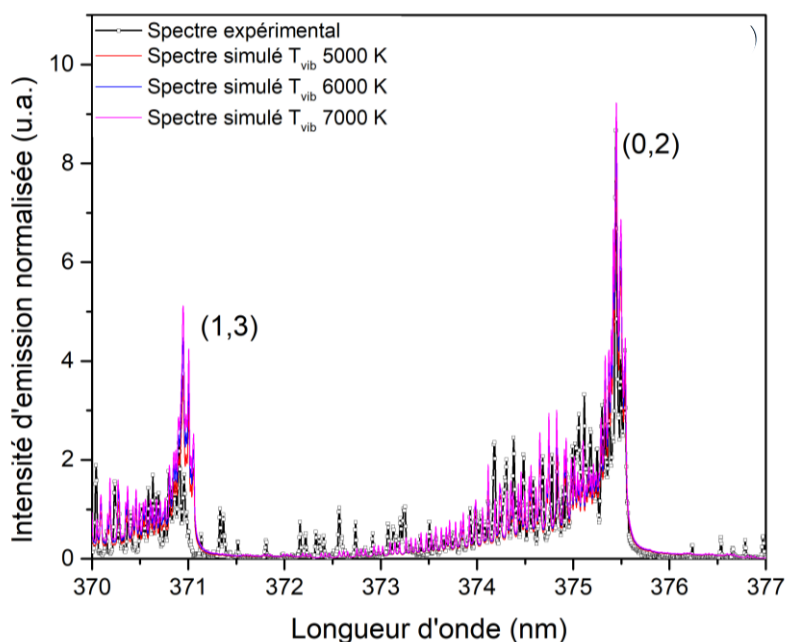
Au sein d'un plasma, l'énergie peut être stockée sous différentes formes. Les particules peuvent tout d'abord emmagasiner de l'énergie grâce à leurs électrons, en les faisant passer à un niveau électronique supérieur. Les molécules, quant à elles, ont d'autres moyens de stocker de l'énergie, sous forme de vibration ou de rotation de la molécule. Lorsque le gaz est à l'équilibre thermodynamique, l'énergie se répartit de manière homogène dans les différentes formes de stockage de l'énergie. Plutôt que de parler d'énergie, on parle dans ce cas de la température du gaz, la température représentant l'énergie d'agitation des particules du gaz. On passe d'une énergie à une température en utilisant la formule  $E = k_B T$ , avec  $k_B = 1,380 \times 10^{-23} \text{ J K}^{-1}$ , la constante de Boltzmann.

Ce même concept de température pour représenter une énergie a été repris pour quantifier l'énergie stockée sous forme de vibration ou de rotation des molécules. On parle ainsi de température vibrationnelle ( $T_{\text{vib}}$ ) et de température rotationnelle ( $T_{\text{rot}}$ ), et on travaille avec plusieurs températures. On retrouve aussi l'énergie stockée dans les électrons, ce qui donne lieu à une température électronique ( $T_e$ ). La température des espèces non ionisées (dans la partie du jet plasma qui n'est pas sous forme de plasma mais qui reste sous forme de gaz) continue à être notée comme "la température du gaz". C'est à cette température que sera sensible une cible biologique si on la place sous le jet plasma. Dans la suite de ce paragraphe, on cherche à mesurer  $T_{\text{vib}}$  et  $T_{\text{rot}}$  de la molécule  $\text{N}_2$  pour évaluer la température du gaz.

Dans le cas de notre étude, la détermination de la température du gaz est effectuée à partir de l'analyse de la distribution vibrationnelle et rotationnelle de la transition  $\text{C}^3 \Pi_u \rightarrow \text{B}^3 \Pi_g$  du second système positif de l'azote (Rusterholtz et al. 2013). La région de 370 à 382 nm a été sélectionnée pour étudier ces deux paramètres de température. L'estimation de  $T_{\text{vib}}$  et  $T_{\text{rot}}$  est basée sur la comparaison entre le spectre expérimental et un spectre simulé à partir de distributions de Boltzmann des niveaux énergétiques électroniques, vibrationnels et rotationnels en utilisant le logiciel SPECAIR (Laux et al. 2003).

Les spectres de la température vibrationnelle sont simulés à une température rotationnelle fixée à 375 K. Trois spectres sont simulés à différentes températures vibrationnelles (5000, 6000 et 7000 K) jusqu'à obtenir un ajustement des maxima d'intensité des bandes

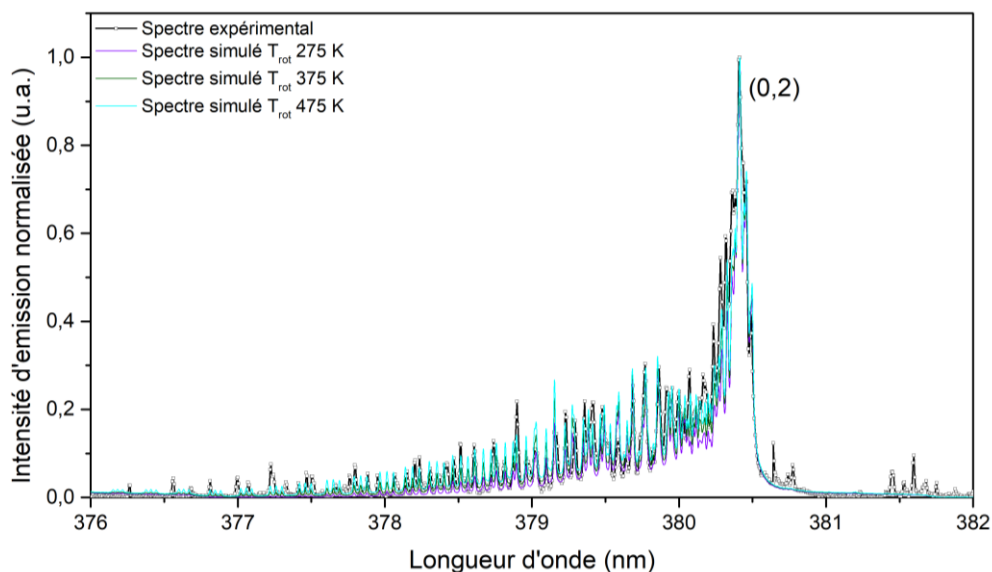
vibrationnelles entre la simulation et l'expérience. La Figure 30 montre les bandes vibrationnelles  $C^3\Pi_u \rightarrow B^3\Pi_g$  ( $v'=1 ; v''=3$ ) et ( $v'=0 ; v''=2$ ). L'intensité des bandes augmente avec l'augmentation de la  $T_{vib}$  simulée. Cela s'explique par une augmentation du peuplement des niveaux vibrationnels élevés avec l'augmentation de la température. La  $T_{vib}$  simulée la plus proche de notre cas d'étude est de 6000 K. Il est cependant difficile de tirer des conclusions de cette température car elle représente un réservoir d'énergie dont il est difficile de prévoir l'utilisation. Cette énergie peut être transformée en chaleur, accélérer des réactions chimiques, participer à l'émission lumineuse ou encore être transférée à d'autres espèces par collision (Rusterholtz et al. 2013).



**Figure 30** Spectres de  $T_{vib}$  simulés avec le logiciel SPECAIR de la transition  $C^3\Pi_u \rightarrow B^3\Pi_g$ , pour une  $T_{rot}$  de 375 K, et des  $T_{vib}$  de 5000, 6000 et 7000 K, entre 370 et 377 nm. Le plasma est généré à une tension de 6kV, des impulsions de 2,5 $\mu$ s, une fréquence de 20kHz et un débit He/0,2% O<sub>2</sub> de 2 L.min<sup>-1</sup>.

La température rotationnelle est estimée après la détermination de la température vibrationnelle avec la bande de transition  $v' = 0 ; v'' = 2$ . De même, trois spectres sont simulés pour la température rotationnelle (275, 375 et 475 K) avec une température vibrationnelle fixée à 6000 K. Les spectres sont normalisés par rapport à la bande à 375,45 nm pour la  $T_{vib}$  et 380,5 nm pour la  $T_{rot}$ .

La Figure 31 montre la bande rotationnelle  $C^3\Pi_u \rightarrow B^3\Pi_g$  ( $v' = 0 ; v'' = 2$ ). L'intensité de la bande augmente avec l'augmentation des  $T_{rot}$  simulées. La  $T_{rot}$  simulée proche de notre cas d'étude est 375K. Cette valeur est représentative de la température des particules lourdes, et est proche de celle de la température ambiante.



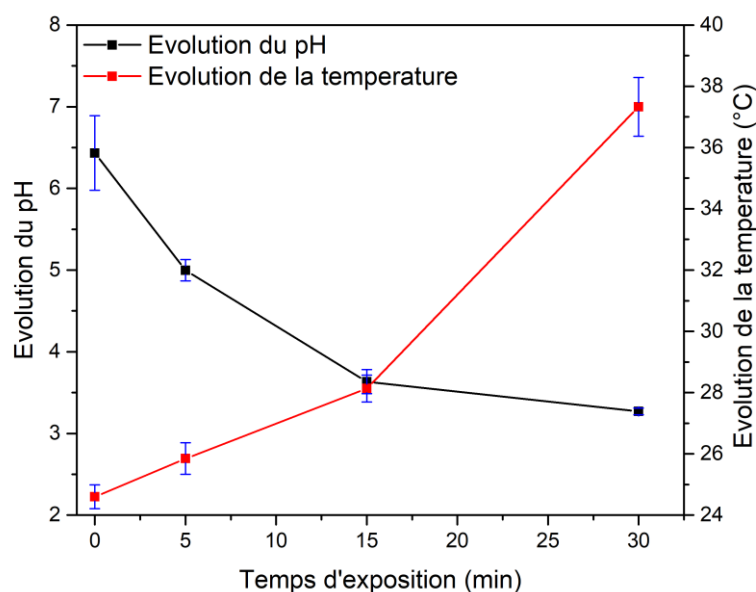
**Figure 31** Spectres de  $T_{rot}$  simulés avec le logiciel SPECAIR de la transition  $C^3\Pi_u \rightarrow B^3\Pi_g$ , pour une  $T_{vit}$  de 6000K, et des  $T_{rot}$  de 275, 375 et 474K, entre 376 et 382 nm. Le plasma est généré à une tension de 6kV, des impulsions de 2,5 $\mu$ s, une fréquence de 20kHz et un débit He/0,2% O<sub>2</sub> de 2 L.min<sup>-1</sup>.

## 2. Etude des espèces réactives en phase liquide

### 2.1. Evaluation de la température et du pH

Avant d'étudier l'influence des espèces réactives de la décharge plasma sur les propriétés chimiques du liquide après exposition au gaz ionisé, nous nous sommes intéressées à l'étude de deux grandeurs physiques de la solution : la température et le pH. Dans le contexte de notre étude, les plasmas non thermiques se caractérisent par une température proche de la température ambiante et une forte production d'espèces réactives d'oxygène et d'azote (RONS), principales causes de l'inactivation microbienne. La diffusion des RONS dans le liquide engendre une succession de réactions d'oxydo-réduction qui provoquent la diminution du pH de la solution. Cette baisse entraîne des perturbations au niveau des fonctions cellulaires (Chapitre IV). Le suivi de ces deux grandeurs apporte plus d'informations sur la chimie du liquide.

La Figure 32 révèle l'évolution de la température et du pH de la solution traitée en fonction du temps d'exposition aux multi-jets plasma. Les mesures ont été réalisées séparément afin d'éviter l'influence de la température sur les résultats du pH. La courbe de température, en rouge, débute à 24 °C et atteint 37 °C après 30 minutes de traitement. Invernizzi et al. (2019) ont rapporté qu'une augmentation du temps de traitement pourrait induire une augmentation de la température jusqu'à atteindre un plateau, traduisant ainsi l'obtention d'un équilibre thermique entre le liquide et le plasma. Dès 5 minutes de traitement, le pH (courbe en noir) de la solution diminue brusquement et commence à se stabiliser autour de 3,5 après 15 minutes de traitement. Ma et al. (2015) ont étudié un jet plasma d'argon-dioxygène pour la production d'eau activée par plasma dans un volume de 80 mL. Après 10 minutes d'exposition, le pH de la solution est passé de 7 à 3, puis a atteint un état de pH stable à 3 après 20 minutes d'exposition au plasma.



**Figure 32** Evolution de la température et du pH de la solution saline en fonction du temps d'exposition aux multi-jets plasma. Cible traitée eau ultra-pure, volume 100 mL. Le plasma est généré à une tension de 6kV, des impulsions de 2,5µs, une fréquence de 20kHz et un débit He/0,2% O<sub>2</sub> de 2 L.min<sup>-1</sup>.

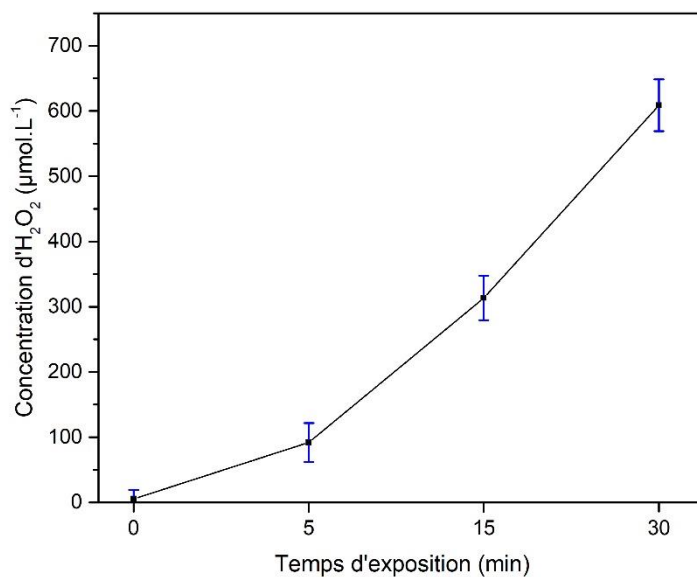
Ikawa et al. (2010) ont étudié l'effet du pH sur l'inactivation bactérienne en suspension après un traitement au plasma à pression atmosphérique. Les expériences ont été réalisées sur deux souches de bactéries, *E. coli* et *Leuconostoc citreum* (*L. citreum*). Les résultats ont révélé qu'il existe un pH critique d'environ 4,7 pour les effets bactéricides. Cette valeur critique semble être la même pour *E. coli* et *L. citreum*. Les auteurs suggèrent que ce seuil est valable pour la plupart des bactéries. L'acidification de la solution traitée est due à la génération des espèces réactives d'oxygène et d'azote, telles que le peroxyde d'hydrogène, le radical hydroxyle et les ions nitrites et nitrates (Lukes et al. 2014).



## 2.2. Quantification du peroxyde d'hydrogène

En tant que précurseur et produit final d'un ensemble de réactions d'oxydo-réduction issues des deux phases gazeuse et liquide, le peroxyde d'hydrogène est considéré comme le principal indicateur de la formation des ROS dans le liquide (Lukes et al. 2014) (Chen et al. 2018).  $H_2O_2$  est un oxydant fort ( $E_0 = 1,8V$ ) et son potentiel oxydant augmente dans des conditions d'acidité. Il fait parti du groupe des ROS à longue durée de vie.

Dans la Figure 33, la concentration d' $H_2O_2$  présente une augmentation progressive en fonction du temps d'exposition en passant de 100 à  $600 \pm 100 \mu\text{mol. L}^{-1}$  après 5 minutes et 30 minutes d'exposition, respectivement. La tendance de la courbe présente une bonne cohérence avec les résultats obtenus par Invernizzi et al. (2019) indiquant une concentration finale de  $750 \mu\text{mol.L}^{-1}$  après 20 minutes d'exposition au plasma en appliquant les mêmes conditions physiques avec un jet plasma et un volume total de 12 mL.



**Figure 33** Evolution de la concentration du peroxyde d'hydrogène de la solution saline en fonction du temps d'exposition aux multi-jets plasma. Cible traitée eau ultra-pure, volume 100 mL. Le plasma est généré à une tension de 6kV, des impulsions de 2,5 $\mu\text{s}$ , une fréquence de 20kHz et un débit He/0,2%  $O_2$  de 2  $L.\text{min}^{-1}$ .

Le peroxyde d'hydrogène est l'une des principales espèces moléculaires de l'oxygène. D'après la littérature, il existe deux principales voies de formation du peroxyde d'hydrogène (Lukes et al. 2014) (Winter et al. 2014) (Chen et al. 2018). La première implique la phase gazeuse. Les trois précurseurs de la formation d' $H_2O_2$  dans la zone plasma sont l'oxygène atomique, le radical hydroxyle et la molécule d'eau.

L'ionisation de l'oxygène atomique dans la zone du plasma par collision électronique produit de l'oxygène atomique dans un état excité. La recombinaison de ce dernier avec l'humidité de l'air ambiant permet de générer du peroxyde d'hydrogène. L'ozone ( $O_3$ ) joue également un rôle indirect dans le processus de formation des espèces d'oxygène dans la phase du plasma et du  $H_2O_2$ , en particulier dans la réaction (18), où M représente des collisions aléatoires. La recombinaison de l'ozone avec la molécule d'eau génère le radical hydroxyle  $OH\cdot$  (19) :



La formation du peroxyde d'hydrogène dans la phase gazeuse est due à la forte densité de  $OH\cdot$  à la surface du liquide sous le jet plasma. Le contact du plasma avec la surface du liquide provoque une importante évaporation de l'eau moléculaire en raison de l'impact des ions sur la surface de l'eau. Cela entraîne une forte densité de  $OH\cdot$  produite par la collision de l'eau ( $H_2O$ ) avec des électrons en phase gazeuse.

La deuxième voie de formation de l' $H_2O_2$  implique la phase liquide. La diffusion du radical hydroxyle dans le liquide permet la formation de  $H_2O_2$ , via l'équation suivante (20):



Chen et al. (2018) ont montré qu'il existe une troisième voie de formation de peroxyde d'hydrogène aqueuse par électrolyse. Lorsqu'un liquide est traité par plasma, les particules chargées se forment à la surface de l'eau qui joue le rôle d'électrode. L' $O_2$  aqueux pourrait réagir avec les électrons pour donner  $O_2\cdot$  selon la réaction (21). Ensuite, le peroxyde d'hydrogène est produit selon les réactions (22) et (23) :

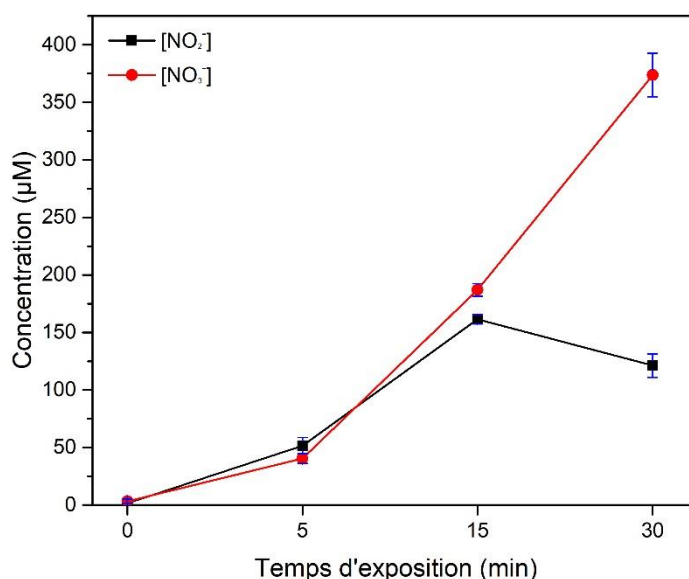


Ces trois voies peuvent se produire individuellement, mais il est plus probable qu'elles fonctionnent ensemble dans l'interaction plasma-liquide. Cependant, leur contribution à la production totale du  $H_2O_2$  est difficile à distinguer.

### 2.3. Quantification des nitrite et nitrate

La formation des espèces réactives d'azote (RNS) dans le liquide est due aux interactions produites à l'interface entre le plasma et l'air ambiant, ce dernier contenant environ 80% d'azote et 20% de dioxygène. Les deux principales RNS détectées dans le liquide sont le nitrite ( $\text{NO}_2^-$ ) et le nitrate ( $\text{NO}_3^-$ ). Ils se caractérisent par un fort potentiel oxydant, induisant des changements dans les propriétés chimiques du liquide après exposition au plasma et entraînant une forte diminution du pH de la solution. Leur longue durée de vie présente un avantage pour la décontamination microbiologique du liquide.

La Figure 34 présente l'évolution de la concentration des  $\text{NO}_2^-$  et  $\text{NO}_3^-$  dans la solution NaCl 0.9% traitée en fonction de différents temps d'exposition. La concentration de  $\text{NO}_3^-$  augmente progressivement en fonction du temps pour tous les temps de traitement. En revanche, la concentration de  $\text{NO}_2^-$  augmente progressivement jusqu'à 15 minutes de traitement, puis diminue au-delà de 15 minutes. Invernizzi et al. (2019) ont obtenu des concentrations similaires lors des essais avec un seul jet plasma hélium-dioxygène et un volume de liquide 12 mL.

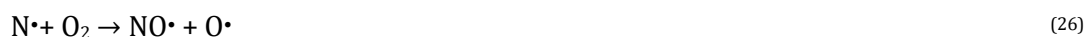
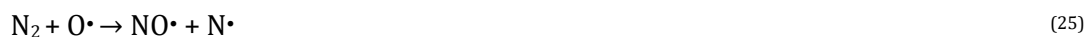


**Figure 34** Evolution de la concentration des nitrites et nitrates de la solution saline en fonction du temps d'exposition aux multi-jets plasma. Cible traitée eau ultra-pure, volume 100 mL. Le plasma est généré à une tension de 6kV, des impulsions de 2,5 $\mu\text{s}$ , une fréquence de 20kHz et un débit He/0,2%  $\text{O}_2$  de 2  $\text{L}\cdot\text{min}^{-1}$ .

La présence des ions de nitrite et de nitrate dans le liquide après traitement par plasma est principalement due à l'azote moléculaire de la phase gazeuse. L'ionisation de N<sub>2</sub> de l'air ambiant entraîne la formation de l'azote à l'état excité, par exemple, selon (24) :



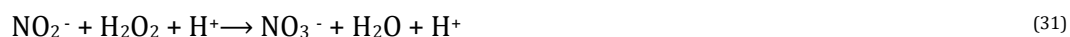
La combinaison de l'azote avec l'oxygène atomique génère l'oxyde d'azote (NO•) selon les voies 25 et 27. Ce dernier est l'un des précurseurs de la formation des RONS dans la phase liquide.



Une fois dans le liquide, la dissociation de l'azote et sa recombinaison avec l'oxygène atomique génèrent de l'oxyde d'azote qui se dissout en contact avec les molécules d'eau selon les réactions suivantes (28 – 30):



La formation de NO<sub>3</sub><sup>-</sup> est également favorisée par la réaction (30), ce qui entraîne une diminution de la concentration de NO<sub>2</sub><sup>-</sup> (31):



Lukes et al. (2014) ont démontré que la formation des ions de nitrite et de nitrate s'accompagne par la formation des ions H<sup>+</sup> (diminution du pH de la solution traitée). Comme les ions de nitrite sont instables à pH acide, ils se convertissent en acide peroxy-nitrique. La formation de l'acide peroxy-nitrique sous les deux formes anioniques (O=NOO<sup>-</sup>, anion peroxy-nitrite) et protonées (O=NOOH, acide peroxy-nitrique) entraîne d'autres oxydations différentes. Le peroxy-nitrite peut réagir soit directement, soit le plus souvent indirectement par le biais des réactions avec OH• et NO<sub>2</sub><sup>-</sup>, et produit des radicaux d'oxyde nitrique et l'anion superoxyde.

## Conclusion

De nombreuses études ont confirmé le rôle des espèces réactives dans l'inactivation bactérienne. Les plasmas non thermiques à pression atmosphérique offrent un large potentiel de transfert d'énergie et de génération d'espèces hautement réactives. Les phénomènes d'ionisation, d'excitation et de dissociation de la zone plasma sont à l'origine de la formation des RONS.

Nous avons étudié les modifications physico-chimiques induites dans le liquide exposé aux multi-jets plasma à pression atmosphérique. Pour cela, nous avons effectué, dans un premier temps, une caractérisation optique de la phase plasma afin d'identifier les espèces émissives dans leur état excité au niveau d'un seul jet plasma en utilisant la spectroscopie d'émission optique. Nous avons observé une dominance des raies moléculaires par rapport aux raies atomiques, notamment les deux systèmes positifs et négatifs de l'azote, en comparaison avec les raies d'hélium et d'oxygène. Cette étude a été complétée par un suivi de la distribution de l'intensité des espèces émises le long du jet plasma. Les émissions des raies atomiques étaient plus intenses à la sortie du jet, puis diminuaient à environ 3 mm du jet. À l'inverse, celles des bandes moléculaires étaient très faibles à la sortie du jet, puis augmentaient à 3 mm du jet pour diminuer ensuite. Enfin, nous nous sommes intéressés à l'évaluation de la température du plasma en analysant le second système positif de l'azote. La température rotationnelle de cette molécule donne une approximation de la température moyenne de la décharge plasma. L'étude de la température rotationnelle du second système positif d'azote était proche de la température ambiante (375K). Les longs temps d'exposition peuvent donc entraîner une augmentation de la température de la cible, un phénomène qui peut être dû au milieu réactionnel du plasma, et qui doit être pris en compte pour certaines applications.

Ensuite, nous avons évalué l'effet des espèces réactives sur les propriétés physico-chimiques du liquide en quantifiant le peroxyde d'hydrogène, le nitrite et le nitrate. L'exposition du liquide aux multi-jets plasma a entraîné des changements des propriétés physico-chimiques du liquide par la formation des espèces réactives d'oxygène et d'azote. Il s'agit du peroxyde d'hydrogène ( $H_2O_2$ ) et des ions nitrite ( $NO_2^-$ ) et nitrate ( $NO_3^-$ ). Les résultats révèlent une augmentation progressive des concentrations de ces espèces en fonction du temps d'exposition, à l'exception des ions nitrate dont la concentration baisse pour les longs temps d'exposition. Les espèces réactives d'oxygène et d'azote sont solubles dans l'environnement aqueux et favorisent la formation d'autres espèces réactives, telles que l'acide peroxonitrique, qui est l'une des principales RONS générées lors des interactions plasma-liquide. De plus, la diffusion des particules chargées du plasma à la surface du liquide entraîne une diminution du pH du liquide

par la formation d'ions  $H^+$ . Cette diminution contribue à la formation du peroxyde d'hydrogène, du nitrate à partir du nitrite, ainsi qu'à la formation du peroxonitrique. Néanmoins, la plupart des réactions sont produites de manière simultanée, ce qui rend difficile de distinguer individuellement les voies de formation de chaque espèce.



## *Chapitre IV : Influence de la Phase de Croissance Bactérienne sur la Décontamination Microbiologique des Liquides par Plasma*

L'optimisation d'un procédé de décontamination ne dépend pas seulement de ses caractéristiques physico-chimiques, mais aussi des caractéristiques microbiologiques de l'échantillon à traiter. Lors des opérations de décontamination, divers paramètres microbiologiques peuvent influencer l'efficacité de l'inactivation bactérienne, tels que la densité bactérienne, les caractéristiques structurales de la paroi (Gram positif ou négatif), ou la présence de matière organique. En plus de ces paramètres, il existe d'autres caractéristiques qui doivent être investiguées afin de mieux comprendre le comportement des bactéries face aux procédés de décontamination, notamment les caractéristiques liées à la phase de croissance bactérienne. Comme discuté précédemment dans le chapitre I, le passage des bactéries de la phase exponentielle à la phase stationnaire de la croissance implique un ensemble de changements morphologiques, physiologiques et transcriptomiques. Ces changements confèrent aux cellules



bactériennes des caractéristiques qui leur permettent de limiter leur échange avec le milieu extérieur, de réduire leur activité métabolique et d'augmenter leur potentiel de survie. Pour les procédés de décontamination, ces changements peuvent influencer l'efficacité de l'inactivation bactérienne.

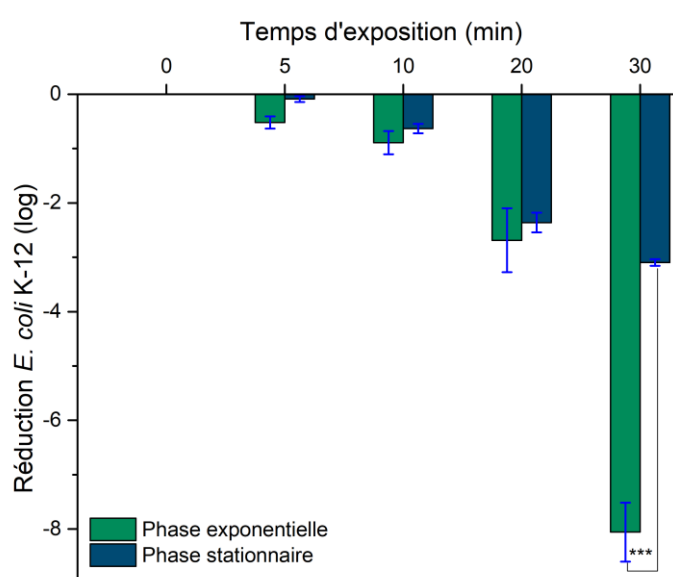
Le but de ce travail est d'étudier l'impact de la phase de croissance bactérienne sur l'efficacité de la décontamination des liquides par plasma. Pour cela, nous avons réalisé une étude préliminaire afin de définir les différentes phases de croissance de la souche bactérienne étudiée, *E. coli* K-12. À partir des résultats obtenus, nous avons déterminé le temps d'incubation nécessaire pour obtenir des cellules bactériennes en phase exponentielle et en phase stationnaire de croissance. Les essais de décontamination ont été réalisés indépendamment sur les cellules bactériennes issues des deux phases de croissance. Après le traitement par plasma, un ensemble de paramètres microbiologiques et moléculaires a été analysé. Nous avons d'abord examiné la viabilité bactérienne et la présence de lésions sous-létales. Ensuite, nous avons étudié l'influence des changements physiologiques en estimant l'activité métabolique intracellulaire et en déterminant la présence des bactéries à l'état viable mais non cultivable (VBNC). Comme mentionné dans le chapitre I, les bactéries en phase exponentielle présentent une membrane plus fine que les bactéries en phase stationnaire, une caractéristique qui pourrait influencer le comportement des bactéries face au plasma. Par conséquent, nous avons examiné l'intégrité membranaire des bactéries des deux phases de croissance après exposition au plasma. Les radicaux libres (ROS) peuvent interagir avec les constituants de la cellule, notamment les protéines, les lipides et l'ADN. Nous nous sommes également intéressés à la mesure du taux de ROS intracellulaires dans les cellules issues des deux phases de croissance. Enfin, nous avons évalué l'effet des ROS intracellulaires sur l'intégrité de l'ADN.

## 1. Etude de la viabilité bactérienne

### 1.1. Influence de la phase de croissance bactérienne sur la réduction bactérienne

La diffusion des espèces réactives de la décharge plasma dans le liquide a entraîné des changements des propriétés physico-chimiques du liquide. Ces changements se traduisent principalement par la formation des espèces réactives d'oxygène et d'azote responsables de l'inactivation bactérienne. La Figure 35 représente la réduction de la viabilité des bactéries des phases exponentielle et stationnaire en fonction du temps d'exposition au plasma. Les courbes de survie présentent des profils d'inactivation similaires, notamment entre 5 et 20 minutes

d'exposition, avec une réduction de 3 log. En revanche, pour des temps d'exposition supérieurs à 20 minutes, la sensibilité des bactéries en phase exponentielle est nettement supérieure à celle des bactéries en phase stationnaire, avec une réduction de 7 et 3 log, respectivement. Nos résultats indiquent que le comportement des bactéries face au plasma diffère selon leur stade de croissance. Ce comportement est dû aux caractéristiques cellulaires des bactéries liées à la phase de croissance. Par ailleurs, dans certaines conditions de traitement par plasma, les bactéries en phase exponentielle peuvent présenter une résistance similaire à celle des bactéries en phase stationnaire. Yu et al. (2006) ont rapporté que l'exposition de bactéries en phase mi-exponentielle, exponentielle et stationnaire à un JPPA d'hélium n'influe pas sur l'efficacité du traitement. Toutes les trois ont présenté la même sensibilité au plasma.



**Figure 35** Réduction de la survie de *E. coli* K-12 en phase exponentielle et stationnaire après exposition au plasma. Cible traitée solution saline à 0,9 %, volume 100 mL. Le plasma est généré à une tension de 6kV, des impulsions de 2,5 $\mu$ s, une fréquence de 20kHz et un débit He/0,2% O<sub>2</sub> de 2 L.min<sup>-1</sup>.

D'autres techniques couramment employées pour la décontamination des liquides, telles que le traitement à haute pression, le chlore et les ultrasons, ont démontré que la phase de croissance des bactéries influence l'efficacité de la décontamination. Mañas et Mackey (2004) ont montré la forte sensibilité des bactéries en phase exponentielle par rapport à celles en phase stationnaire après un traitement à haute pression. Après 8 minutes de traitement à 300 MPa, plus de 70 % (-0,3 log) des cellules en phase stationnaire sont restées viables, contre 0,01 % (-2 log) pour les cellules en phase exponentielle.

Cherchi et Gu (2011) ont examiné l'impact de la phase de croissance de deux souches de *E. coli* (K12 et O157:H7) en suspension sur l'efficacité de la décontamination au chlore. Les auteurs se sont intéressés aux trois premières phases de la croissance bactérienne : la phase de latence, la

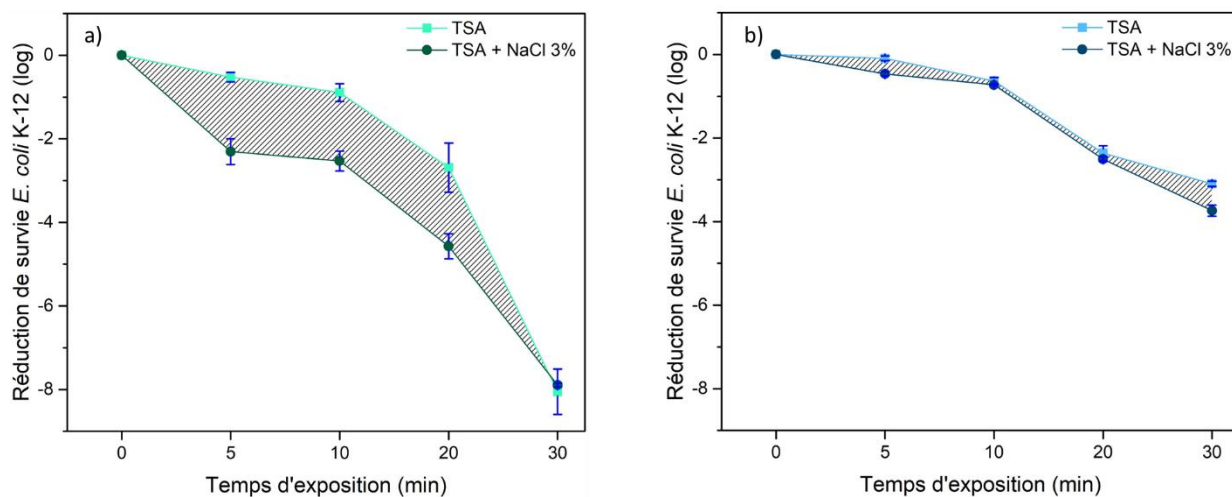
phase exponentielle et la phase stationnaire. Les résultats ont montré qu'il existe une différence significative dans la réduction bactérienne entre les phases de croissance. Pour les deux souches de *E. coli*, le taux d'inactivation était plus faible pour les bactéries en phase stationnaire que pour celles des phases de latence et exponentielle. De la même manière, Gao et al. (2014) ont étudié l'effet d'un traitement par ultrasons sur la viabilité de *Enterobacter aerogenes*, *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus epidermidis*, *Staphylococcus epidermidis* et *Staphylococcus pseudintermedius*. Ces souches ont été choisies pour cette étude en raison de leurs propriétés physiques et biologiques variables. Les résultats ont montré que les bactéries en phase exponentielle sont plus sensibles aux ultrasons par rapport à celles en phase stationnaire.

## 1.2. Influence de la phase de croissance sur l'apparition des lésions sous létale

Lors de l'exposition à des procédés chimiques ou physiques, les bactéries peuvent mourir ou survivre, mais avec des lésions sous-létales. Ces lésions réversibles sont de nature structurelle, comme la réduction de la taille de la cellule, et métabolique, comme l'oxydation des protéines. Les bactéries peuvent réparer leurs dommages et reprendre leur croissance si des conditions environnementales appropriées se présentent (Espina et al. 2016), (Schottroff et al. 2018). Bien que de nouvelles méthodes soient en cours de développement pour la détection des bactéries ayant subi des lésions sous-létales, la stratégie la plus utilisée par les microbiologistes reste le dénombrement différentiel sur des milieux de culture sélectifs et non sélectifs. Un des agents sélectifs possibles est le chlorure de sodium en exposant les bactéries à des concentrations sub-inhibitrices. Espina et al. (2016) suggèrent que l'augmentation de la pression osmotique provoquée par l'ajout de chlorure de sodium entraîne un effet sélectif de croissance pour les cellules dont la membrane cytoplasmique est restée intacte. Le but de cette étude est de mettre en évidence les lésions sous-létales chez les bactéries des deux phases de croissance en utilisant un milieu de culture gélatinifié en l'absence ou en présence de chlorure de sodium à 3%. L'écart entre la population obtenue sur la gélose sélective et non sélective correspond au nombre de bactéries ayant subi des lésions sous-létales (Figure 36).

Pour les bactéries de la phase exponentielle, une différence de 2 log est observée entre la population cultivée sur le milieu sélectif et celle sur le milieu non sélectif, notamment pour les courtes périodes d'exposition. Cette différence indique que cette fraction de la population a subi des lésions sous-létales réversibles. Toutefois, pour des périodes d'exposition supérieures à 20 minutes, il n'existe pas de différence entre les deux populations. Les lésions induites par le plasma

sont, dans ce cas, létales. En revanche, les bactéries en phase stationnaire ne présentent pas de différence entre les populations cultivées sur les deux milieux (sélectif et non sélectif). Les cellules ne subissent donc pas de lésions sous-létales.



**Figure 36** Réduction de la survie *E. coli* K-12 en (a) phase exponentielle et (b) stationnaire sur TSA et TSA supplémenté par NaCl à 3%, après exposition au plasma. La zone rayée correspond à la population de bactéries avec des lésions sous-létales. Cible traitée solution saline à 0,9 %, volume 100 mL. Le plasma est généré à une tension de 6kV, des impulsions de 2,5 $\mu$ s, une fréquence de 20kHz et un débit He/0,2% O<sub>2</sub> de 2 L.min<sup>-1</sup>.

Plusieurs travaux ont montré que le traitement des bactéries par plasma induit des lésions sous-létales. Pan et al. (2019) ont montré que pour des cellules de *Listeria monocytogenes*, l'augmentation du temps d'exposition au plasma à 8 minutes a entraîné une augmentation de la proportion de la population ayant des dommages sous-létaux, passant de 9,62 % à 45 %. De la même manière, Liao et al. (2017) ont montré que le traitement de *Staphylococcus aureus* par une source DBD peut induire à la fois des lésions sous-létales et une inactivation des cellules en fonction de la dose énergétique du plasma et du temps d'exposition. Dans des conditions de plasma à faible puissance (40 W), la proportion de cellules à l'état sous-létal est passée de 3,4 à 8,9 % après 45 s d'exposition. Tandis que dans le cas d'un traitement par plasma à une puissance de 60 W, la proportion de cellules ayant des dommages sous-létales est passée de 3,4 à 96,7 % au cours des 30 premières secondes d'exposition, puis a diminué à 62,3 % après 45 secondes. Les auteurs rapportent cette diminution du pourcentage des dommages sous-létales à une réduction bactérienne.

Cette différence de comportement peut être due aux changements de la composition de la membrane entre les bactéries des deux phases de croissance. Lors de l'entrée des bactéries en phase stationnaire, la composition des phospholipides membranaires et la longueur de leur chaîne changent, affectant la fluidité de la membrane. Ces changements entraînent une augmentation de la rigidité membranaire, ce qui permet aux bactéries de résister aux conditions

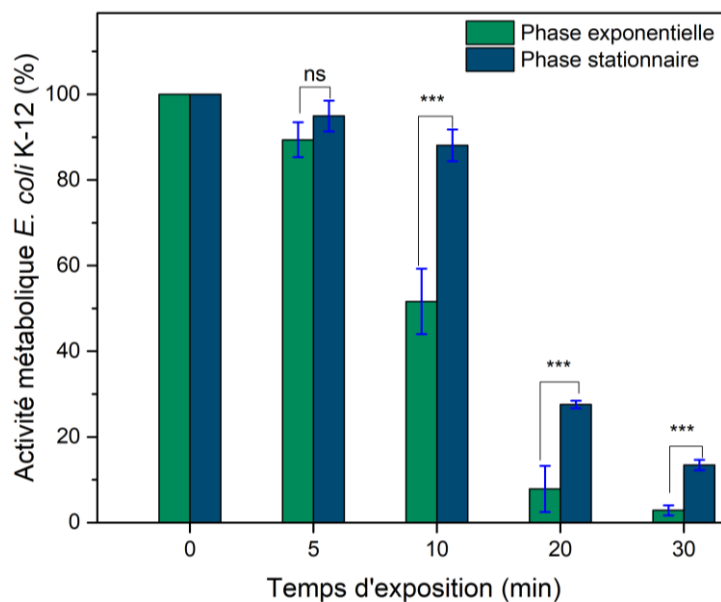
de stress et d'accepter des temps de traitement plus longs (Shokri et Larsson 2004), (Scherber et al. 2009).

## 2. Etude des caractéristiques physiologiques

### 2.1. Influence de la phase de croissance sur l'activité métabolique

L'activité métabolique correspond à l'ensemble des réactions chimiques impliquées dans le maintien de l'état viable des cellules, et elle est étroitement liée aux conditions du milieu environnant. L'activité métabolique se divise en deux types de réactions : des réactions anaboliques conduisant à la synthèse des composés nécessaires à la survie des cellules, et des réactions cataboliques conduisant à la décomposition des molécules pour obtenir de l'énergie. Une exposition prolongée à un facteur de stress entraîne un ensemble de modifications sub-cellulaires. L'une des principales modifications associées à un stress prolongé est la diminution de l'activité métabolique. Le passage des bactéries de la phase exponentielle à la phase stationnaire s'accompagne d'un changement de l'activité métabolique des cellules (Navarro et al. 2010). Cela comprend la répression de la respiration cellulaire, la diminution de la synthèse des protéines, l'augmentation de la synthèse des peptidases/protéases ainsi que la production des facteurs de modulation des ribosomes (RMF) (Yoshida et al. 2009).

Au regard de ces caractéristiques, le but de cette étude est d'évaluer le comportement des bactéries des deux phases de croissance face à l'exposition au plasma en estimant leur activité métabolique (Figure 37). L'activité métabolique des bactéries des deux phases de croissance présente une diminution avec une tendance biphasique. En effet, pour 5 et 10 minutes de traitement, les cellules en phase exponentielle et stationnaire subissent une réduction progressive de leur activité métabolique, passant de 90 % à 50 % et de 95 % à 90 %, respectivement. Au-delà de 20 minutes d'exposition, le pourcentage des cellules en phase exponentielle et stationnaire ayant une activité métabolique chute à 10 % et 30 %, respectivement. Les bactéries en phase exponentielle présentent une sensibilité plus accrue que celles en phase stationnaire. Ces résultats d'activité métabolique montrent également qu'en fonction de la durée de traitement, les bactéries peuvent présenter deux comportements différents. Les courts temps d'exposition provoquent une réduction partielle de l'activité métabolique, tandis que les longs temps d'exposition entraînent une forte diminution de l'activité métabolique pour les bactéries en phase stationnaire, semblant devenir inexistante pour celles en phase exponentielle.



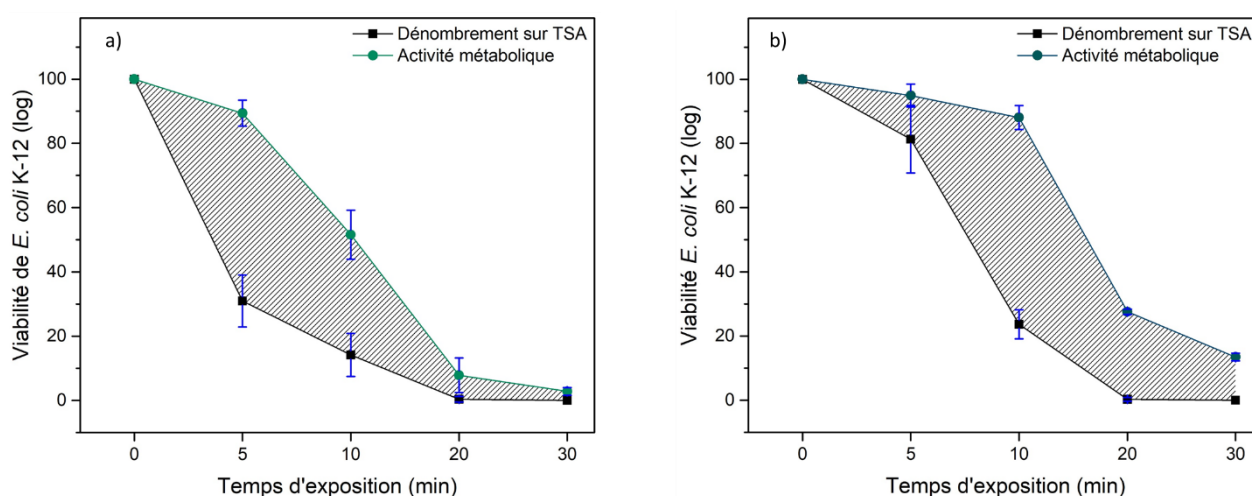
**Figure 37** Réduction de l'activité métabolique des bactéries en phase exponentielle et stationnaire après exposition au plasma. Cible traitée solution saline à 0,9 %, volume 100 mL. Le plasma est généré à une tension de 6kV, des impulsions de 2,5 $\mu$ s, une fréquence de 20kHz et un débit He/0,2% O<sub>2</sub> de 2 L.min<sup>-1</sup>.

Ces résultats concordent avec l'apparition de dommages sous-létaux. Après 10 minutes d'exposition, les bactéries en phase exponentielle présentent des dommages sous-létaux et maintiennent une activité métabolique supérieure ou égale à 50%. En revanche, une exposition au plasma supérieure à 30 minutes produit une forte réduction de l'activité métabolique, avec une faible proportion de bactéries présentant des lésions sous-létales. Cela pourrait s'expliquer par une perte des mécanismes d'adaptation. Cependant, l'évaluation de l'activité métabolique des bactéries en phase stationnaire a montré, une fois de plus, leur plus grande résistance à l'exposition au plasma. Après 30 minutes, 20 % de la population maintient son activité métabolique. L'estimation de l'activité métabolique est donc un moyen permettant de déterminer les cellules ayant une activité intracellulaire après l'exposition au plasma. De plus, ces résultats peuvent mettre en évidence le passage des bactéries à l'état de bactéries viables mais non cultivables (VBNC).

## 2.2. Influence de la phase de croissance sur l'entrée des bactéries à l'état VBNC

Afin de survivre dans des conditions de stress, les bactéries ont développé des stratégies d'adaptation qui leur permettent de maintenir un état de viabilité. Parmi ces stratégies, il existe l'adaptation physiologique, qui se traduit par la réduction de l'activité métabolique ou la répression de certains gènes fonctionnels, tels que ceux impliqués dans la division cellulaire. Cette

stratégie correspond au passage des bactéries à l'état viable mais non cultivable (VBNC). L'état VBNC est un état cellulaire dans lequel les cellules sont viables mais ne sont cependant pas détectables par la méthode conventionnelle de culture sur milieu gélosé. Cet état cellulaire apparaît en réponse à différents types de stress environnementaux. Le but de cette étude est de mettre en évidence l'état VBNC chez les bactéries des deux phases de croissance en utilisant les résultats de viabilité bactérienne obtenus par dénombrement sur le milieu gélosé (TSA) (Figure 35) et ceux obtenus par estimation de l'activité métabolique (Figure 37). L'écart entre la population obtenue sur le milieu de culture gélosé et celle présentant une activité métabolique correspond au nombre de bactéries à l'état viable mais non cultivable (Figure 38).



**Figure 38** Comparaison de la viabilité bactérienne estimée par dénombrement sur TSA et celle estimée l'activité métabolique, pour les bactéries des deux phases de croissances (a) exponentielle et (b) stationnaire. La zone rayée correspond à la population de bactéries à l'état VBNC. Cible traitée solution saline à 0,9 %, volume 100 mL. Le plasma est généré à une tension de 6kV, des impulsions de 2,5 $\mu$ s, une fréquence de 20kHz et un débit He/0,2% O<sub>2</sub> de 2 L.min<sup>-1</sup>.

L'estimation de l'activité métabolique fournit, pour les deux phases de croissance, une valeur de viabilité plus élevée par rapport à celle obtenue par le dénombrement sur le milieu gélosé. Une constatation qui s'applique pour tous les temps d'exposition. Pour les bactéries de la phase exponentielle, après 5 minutes de traitement, une différence de 60 % est observée entre la population cultivée et celle révélée par l'étude de l'activité métabolique. Cette proportion diminue à 30 % après 10 minutes d'exposition et devient nulle au-delà de 20 minutes d'exposition au plasma. La régression de l'écart entre les résultats de l'activité métabolique et le dénombrement sur le milieu gélosé présente une tendance biphasique, comme celle observée pour les dommages sous-létaux, qui dépendent du temps d'exposition. Concernant le cas des bactéries en phase stationnaire, l'écart entre les deux résultats est faible, de l'ordre de ceux sur l'estimation. L'augmentation du temps d'exposition à 10 minutes entraîne une augmentation d'environ 60 %

de la population à l'état VBNC. Néanmoins, même pour les temps de traitement supérieurs à 20 minutes, l'écart reste relativement important, d'environ 20 %.

Plusieurs travaux ont montré que le traitement des bactéries par plasma induit l'état physiologique de VBNC. Alkawareek et al. (2014) ont rapporté que, pour les courtes durées d'exposition, le plasma fournit une dose sous-létale pour une fraction des cellules qui n'est pas suffisante pour leur inactivation, mais qui provoque des dommages cellulaires significatifs, tels que le passage à l'état VBNC. En revanche, les durées d'exposition plus longues entraînent une inactivation complète des cellules. Dolezalova et Lukes (2015) ont montré que le résultat du dénombrement sur gélose a révélé une réduction bactérienne de 7 log, tandis que l'estimation de l'activité métabolique a révélé que seulement 1 log de la population bactérienne était complètement inactivé, soit 6 log à l'état VBNC.

Bien qu'il y ait peu d'études abordant l'influence de la phase de croissance bactérienne sur l'entrée des cellules à l'état VBNC, ces résultats confirment d'une part que le plasma induit l'entrée des bactéries dans l'état VBNC, et d'autre part que le comportement des bactéries face au plasma dépend de la phase de croissance bactérienne et de la durée d'exposition. Les mécanismes d'adaptation caractéristiques des bactéries en phase stationnaire (voir chapitre I) impliquent un certain nombre de régulateurs transcriptomiques permettant aux bactéries de ralentir leur activité métabolique et de maintenir un état de viabilité. À l'heure actuelle, il a été démontré que plusieurs protéines ou systèmes connus jouent un rôle important dans le passage des bactéries en phase stationnaire (Navarro et al. 2010), (Jaishankar et Srivastava 2017). On peut citer, par exemple, le facteur sigma (RpoS), les systèmes (OxyR) et (SoxRS), les catalases (KatE et KatG) et la superoxyde dismutase (SodA). L'induction ou la répression de ces systèmes confèrent aux bactéries en phase stationnaire une résistance au stress du milieu environnant, notamment lié au plasma. De nombreuses études ont rapporté une forte expression de ces systèmes pendant la phase stationnaire de croissance, ce qui explique dans notre cas que les bactéries de cette phase résistent plus longtemps au plasma et entrent plus tardivement à l'état VBNC par rapport aux bactéries de la phase exponentielle.

Par ailleurs, la capacité d'entrer dans l'état VBNC peut être avantageuse pour les bactéries, mais elle présente un risque pour la santé humaine. Si des cellules VBNC sont présentes, le nombre total de bactéries viables dans un échantillon sera sous-estimé par la méthode conventionnelle de comptage sur milieu gélosé en raison de la "non-cultivabilité" inhérente aux cellules VBNC. Pire encore, si toutes les bactéries de l'échantillon sont à l'état VBNC, l'échantillon peut être considéré comme exempt de germes en raison de la non-détection. Pour les procédés de décontamination,



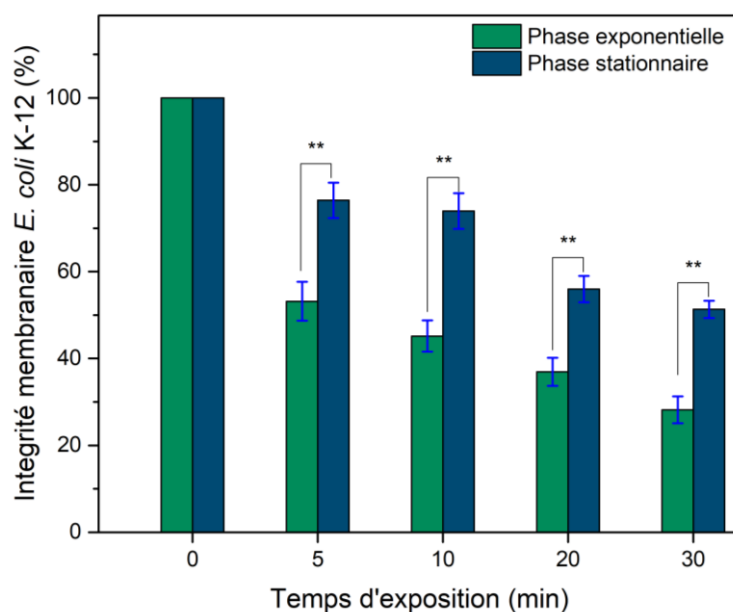
la sous-estimation ou la non-détection de cellules viables dans les échantillons de contrôle de la qualité peut présenter des risques graves pour le public. Par conséquent, il est nécessaire d'optimiser les méthodes de détection et de quantification des cellules VBNC, en privilégiant des techniques de plus en plus précises basées sur des mesures de l'activité métabolique, ou encore la quantification de l'expression de certains gènes impliqués dans le passage des bactéries à l'état VBNC.

### 3. Etude des caractéristiques morphologiques et moléculaires

#### 3.1. Influence de la phase de croissance sur l'intégrité membranaire

Un autre aspect caractéristique de l'entrée des bactéries en phase stationnaire est l'adaptation morphologique, comprenant à la fois des changements de structures cellulaires tels que ceux de la paroi et de la membrane, ainsi que des changements de structures sub-cellulaires tels que l'agrégation des protéines et la condensation de l'ADN. En ce qui concerne les changements de la paroi, cette adaptation induit effectivement une augmentation de l'épaisseur de la paroi et de la proportion d'acides gras insaturés dans les phospholipides membranaires (Navarro et al. 2010), (Jaishankar et Srivastava 2017). Ce changement de composition membranaire engendre une diminution de la fluidité et de la perméabilité de la membrane, réduisant ainsi la sensibilité des cellules aux perturbations environnementales.

Dans ce contexte, nous avons étudié l'influence des caractéristiques membranaires des phases exponentielle et stationnaire sur le comportement des bactéries par rapport au plasma. Cette étude est basée sur l'estimation de la proportion des bactéries ayant perdu leur intégrité membranaire. La Figure 39 représente le pourcentage de bactéries possédant une membrane intacte en fonction du temps d'exposition au plasma. Les bactéries des deux phases de croissance présentent une intégrité membranaire qui diminue en fonction de l'augmentation du temps d'exposition. Après 5 minutes de traitement, 50 % des cellules en phase exponentielle ont subi des dommages membranaires, contre 25 % pour celles en phase stationnaire. Cet écart persiste, mais le taux de perte s'accroît avec la durée d'exposition au plasma. À 30 minutes, il atteint 70% et 50 % pour les bactéries en phase exponentielle et stationnaire, respectivement. Ces résultats concluent à une plus grande sensibilité des cellules en phase exponentielle au plasma.



**Figure 39** Comparaison de l'intégrité membranaire des bactéries des deux phases de croissance exponentielle et stationnaire. Cible traitée solution saline à 0,9 %, volume 100 mL. Le plasma est généré à une tension de 6kV, des impulsions de 2,5 $\mu$ s, une fréquence de 20kHz et un débit He/0,2% O<sub>2</sub> de 2 L.min<sup>-1</sup>.

Ce constat peut s'expliquer par les différences dans les caractéristiques membranaires des cellules en phase exponentielle. Elles présentent une paroi fine et un potentiel de fluidité membranaire élevé qui leur permettent d'interagir plus facilement avec l'environnement. Cela conduit à une pénétration plus importante des espèces réactives et, par conséquent, à une altération plus importante de la membrane. Lors de la phase exponentielle de croissance, la paroi cellulaire est moins préparée aux attaques oxydatives induites par les espèces réactives du plasma. En revanche, lors de l'entrée des bactéries en phase stationnaire, les changements membranaires réduisent le contact avec le milieu extérieur. Mañas et Mackey (2004) ont étudié la différence dans la perte d'intégrité membranaire pour des cellules en phases exponentielle et stationnaire après un traitement à haute pression. À la suite du traitement, des perturbations ont été observées sur la membrane des cellules en phase exponentielle, telles que l'accumulation de protéines et de lipides du côté cytoplasmique de la membrane, l'épaississement membranaire et la formation d'invagination cytoplasmique. Cependant, pour les cellules en phase stationnaire, aucun changement structurel de la membrane n'a été détecté. De plus, Pagán et Mackey (2000) ont montré qu'il existe un lien entre la perte de viabilité et l'intégrité membranaire chez des cellules d'E. coli dans les deux phases de croissance après une exposition à haute pression. Pour les cellules en phase exponentielle, la perte de viabilité a été corrélée à la perte d'intégrité de la membrane, tandis qu'en phase stationnaire, les membranes cellulaires sont devenues semi-perméables et ont acquis la capacité à se réparer. Les auteurs suggèrent que la perte d'intégrité de la paroi pour les cellules en phase stationnaire soit le résultat d'une diminution des

fonctionnalités membranaires. Cette baisse serait combinée à une altération physique de la paroi dans le cas des bactéries en phase exponentielle. Cette étude soutient l'idée que les dommages membranaires sont un événement important dans l'inactivation des bactéries, mais que leur origine et leur relation avec la mort cellulaire peuvent différer selon les phases de croissance.

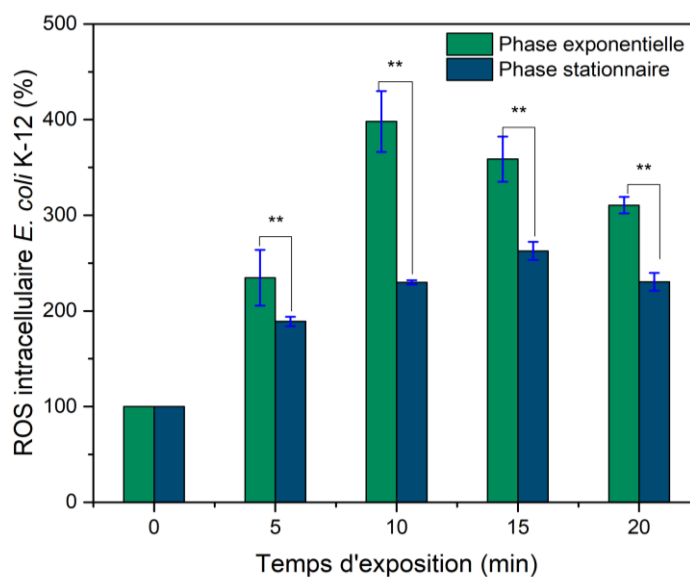
D'après nos résultats, la perte de viabilité ne signifie pas nécessairement une perte d'intégrité membranaire, notamment pour les longs temps d'exposition. Dans le cas des cellules en phase exponentielle, après 30 minutes d'exposition, les résultats de la viabilité montrent une inactivation complète des cellules et une réduction sévère de l'activité métabolique. De plus, la population ayant présenté un état VBNC est nulle. En revanche, l'intégrité membranaire indique que 30 % de la population des cellules présentent une membrane intacte. Cela suggère que dans le cas de l'exposition au plasma, d'autres mécanismes antibactériens sont mis en jeu. En particulier, les ROS intracellulaires qui, dans certaines conditions du milieu, telle que la baisse de pH, peut traverser la membrane et induire des modifications biochimiques des structures sub-cellulaires (ce point sera abordé dans la partie suivante).

Par ailleurs, les caractéristiques membranaires des cellules en phase stationnaire sont liées aux mécanismes de régulation transcriptomique. Chez *E. coli*, l'adaptation au stress extra-cytoplasmique est contrôlée par l'activation d'un facteur alternatif, noté  $\sigma E$ . Il régit l'expression des gènes codant pour les protéines membranaires, les protéines impliquées dans les phospholipides, la biosynthèse des lipopolysaccharides et de la membrane externe. L'activité de  $\sigma E$  augmente de manière dépendante avec la phase de croissance. Costanzo et Ades (2006) ont montré que l'activité du  $\sigma E$  est maximale lors de l'entrée des bactéries en phase stationnaire de croissance. Ces caractéristiques rendent la membrane cellulaire plus adaptée et résistante aux stress oxydatifs induits par le plasma.

### 3.2. Influence de la phase de croissance sur l'accumulation des ROS intracellulaires

Plusieurs études ont rapporté que l'effet du plasma sur les bactéries est principalement dû à la génération d'espèces réactives telles que les ROS et les RNS. Ces espèces réagissent avec les constituants cellulaires tels que la membrane, les protéines et les acides nucléiques. Par ailleurs, les caractéristiques morphologiques, physiologiques et transcriptomiques des bactéries en lien avec leurs phases de croissance peuvent induire une réponse cellulaire différente. Le but de cette étude est d'appréhender l'influence des caractéristiques cellulaires des phases de

croissance sur l'accumulation des ROS intracellulaires. La Figure 40 représente le taux de ROS intracellulaires des bactéries en phases exponentielle et stationnaire. Le taux de ROS intracellulaires augmente progressivement jusqu'à 10 minutes dans les deux cas étudiés, puis diminue pour les bactéries en phase exponentielle et tend vers un plateau pour les cellules en phase stationnaire. De plus, la proportion de ROS intracellulaires est significativement supérieure dans les bactéries en phase exponentielle, étant jusqu'à deux fois plus importante que celle des cellules en phase stationnaire à 10 minutes de traitement.



**Figure 40** Taux de ROS intracellulaire des bactéries des deux phases de croissance, exponentielle et stationnaire, après exposition au plasma. Cible traitée solution saline à 0,9 %, volume 100 mL. Le plasma est généré à une tension de 6kV, des impulsions de 2,5 $\mu$ s, une fréquence de 20kHz et un débit He/0,2% O<sub>2</sub> de 2 L.min<sup>-1</sup>.

L'accumulation des ROS intracellulaires entraîne des perturbations biochimiques se traduisant par des réactions d'oxydation avec les constituants cellulaires. Il a été rapporté que les ROS peuvent interagir avec le peptidoglycane de la paroi cellulaire, les lipopolysaccharides et les phospholipides présents dans les membranes cellulaires (externes) (Han et al. 2016). Les lipides peuvent être oxydés, et les liaisons C-C, C-O et C-N au sein de la structure du peptidoglycane peuvent être détruites en raison de la présence du radical hydroxyle (OH $\cdot$ ). La baisse du pH extracellulaire facilite la pénétration des ROS dans l'espace intracellulaire. Ikawa et al. (2010) ont rapporté que, même si les radicaux anioniques superoxydes sont raisonnablement réactifs, ils sont considérés comme incapables de pénétrer la membrane cellulaire en raison de leurs charges, et donc peu susceptibles de causer des dommages à l'intérieur des cellules. Cependant, si le pH de la solution est suffisamment faible, les radicaux anioniques superoxydes sont convertis en radicaux hydroperoxydes (HOO), qui peuvent alors pénétrer la membrane cellulaire et endommager les composants intercellulaires.

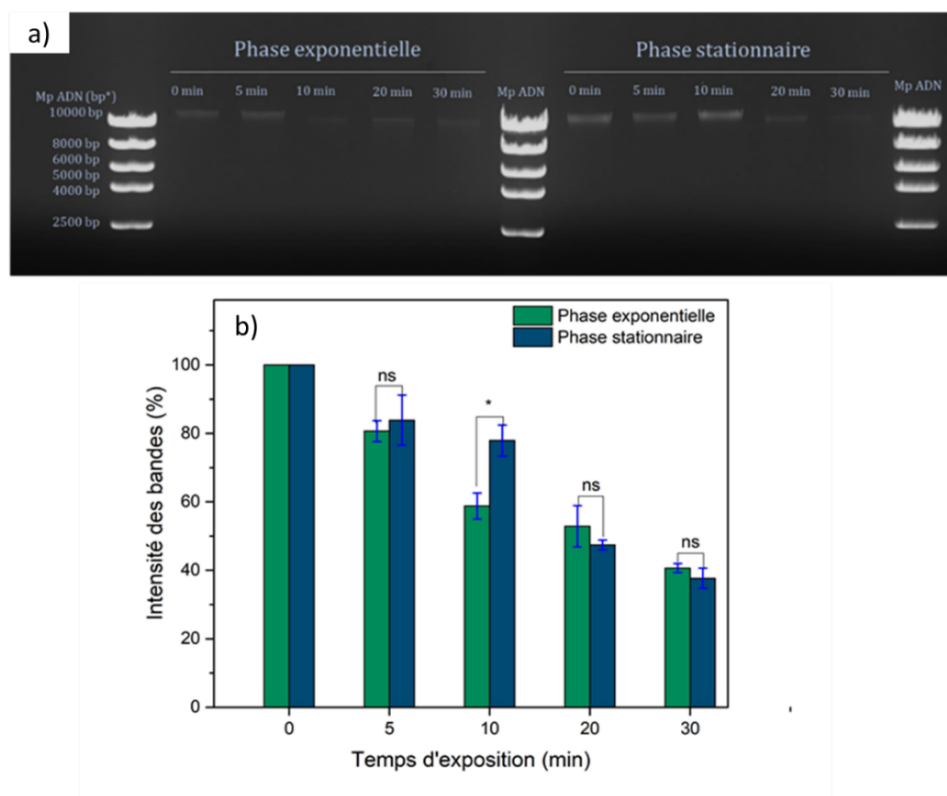
Aucune étude similaire ne permet de comparer la différence du taux des ROS intracellulaires entre les cellules des deux phases de croissance. Par ailleurs, comme nous l'avons abordé dans le chapitre I, les bactéries se caractérisent par des mécanismes de défense qui leur permettent de maintenir des faibles taux de ROS intracellulaires. Lors d'un stress oxydant, les voies de réponse au stress cellulaire s'activent, notamment la voie enzymatique en recrutant des pièges endogènes capables de dismuter les ROS, tels que la SOD et la CAT, ou la voie transcriptomique en impliquant des systèmes de régulons et des gènes de régulation, tels que le système OxyR et le régulon SoxRS. Plusieurs études ont rapporté une forte activation de ces voies au passage des bactéries en phase stationnaire. Cela explique la différence du taux des ROS intracellulaires entre les cellules des deux phases de croissance. Étant donné qu'elles sont adaptées au stress, les bactéries en phase stationnaire présentent un arsenal défensif qui leur permet de maintenir un état d'équilibre des ROS intracellulaires, ce qui explique le plateau de concentration maintenu pour tous les temps d'exposition (Figure 40). En revanche, les bactéries en phase exponentielle présentent un taux qui augmente en fonction du temps d'exposition. L'inactivation des mécanismes de défense a entraîné une accumulation des ROS qui semble être maximale après 10 minutes d'exposition. La diminution du taux des ROS pourrait être en lien avec la perte de l'intégrité membranaire et la fuite des composantes sub-cellulaires.

Z. Xu et al. (2018) ont étudié l'accumulation des ROS intracellulaires chez des cellules d'*Escherichia coli* et de *Staphylococcus aureus* en suspension exposées au plasma. Après avoir atteint une valeur maximale, la quantité totale de ROS intracellulaires a été observée en baisse pour les deux espèces bactériennes pour des durées d'exposition plus longues. Les auteurs suggèrent que cette baisse est due à la perte des structures membranaires d'un grand nombre de bactéries et que les sondes de fluorescence ne peuvent pas être bien encastrées, mais fuient, ce qui entraîne la diminution de l'intensité de l'émission fluorescence globale.

### 3.3. Influence de la phase de croissance sur l'intégrité de l'ADN

L'oxydation du matériel génétique est l'une des principales causes de la perte de viabilité cellulaire. Les ROS attaquent les acides nucléiques en oxydant leurs constituants majeurs, les bases et les sucres. Cette oxydation entraîne un blocage de la progression de la fourche de réplication ou un blocage de l'activation des ARN polymérases. De plus, des études ont rapporté que lors du passage des bactéries en phase stationnaire, une condensation de nucléotides se produit pour protéger l'ADN. Un exemple de protéine impliquée dans la protection de l'ADN est la protéine Dps, "protéine non spécifique de liaison à l'ADN". Elle est activée lors de la destruction de l'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> et fournit une protection physique en se liant à l'ADN (Nair et Finkel 2004).

Au regard de ces caractéristiques, le but de cette étude est d'évaluer l'impact du plasma sur l'intégrité de l'ADN issu des cellules de deux phases de croissance. La Figure 41.a représente les produits d'ADN extraits des bactéries en phases exponentielle et stationnaire après exposition au plasma. Une échelle contenant les poids moléculaires connus est ajoutée de part et d'autre des échantillons. L'analyse des profils d'électrophorèse des deux phases de croissance montre une diminution progressive de l'intensité des bandes d'ADN en fonction du temps d'exposition, ce qui indique que le plasma conduit à la perte d'intégrité de l'ADN. La Figure 41.b révèle le pourcentage des intensités des bandes d'ADN des deux phases de croissance en fonction du temps d'exposition à l'aide du logiciel ImageJ. Aucune différence significative de la perte d'intégrité de l'ADN n'a été observée entre les deux phases de croissance. Par conséquent, cette dernière n'influence pas l'effet du plasma sur l'ADN.



**Figure 41** Suivi de la dégradation de l'ADN génomique pour les bactéries en phase exponentielle et stationnaire après exposition au plasma, a) image du gel d'agarose, b) intensité des bandes calculé à partir du gel avec le logiciel ImageJ. Cible traitée solution saline à 0,9 %, volume 100 mL. Le plasma est généré à une tension de 6kV, des impulsions de 2,5 $\mu$ s, une fréquence de 20kHz et un débit He/0,2% O<sub>2</sub> de 2 L.min<sup>-1</sup>.

Inversément à nos résultats, Mañas et Mackey (2004) ont étudié l'effet d'un traitement à la pression hydrostatique sur des cellules d'E. coli. Les résultats ont révélé que l'ADN des cellules en phase exponentielle subit un changement plus sévère par rapport à l'ADN des cellules en phase stationnaire. Les auteurs suggèrent que cette différence est due à l'absence de protéines de liaison

à l'ADN. Il peut s'agir de la Dps qui est synthétisée à la fois en réponse au stress oxydatif mais aussi pendant la phase stationnaire sous le contrôle complexe des régulateurs transcriptomiques. La différence d'apparence de l'ADN a également été expliquée par la conformation relâchée de l'ADN des cellules en phase exponentielle. Cette caractéristique permet aux cellules de garder une transcription et une traduction permanentes, assurant le processus de la réplication cellulaire. En revanche, le processus de réplication est réprimé et l'ADN est plus condensé en phase stationnaire. Ainsi, ces résultats montrent que la phase de croissance bactérienne influence la dégradation de l'ADN. Cependant, dans le cas du traitement par plasma, aucune différence significative de la dégradation de l'ADN n'a été observée entre les deux phases de croissance.

Il est connu que l'effet du plasma sur la dégradation de l'ADN dépend essentiellement de l'accumulation des ROS dans l'espace intracellulaire. En effet, les espèces réactives de l'oxygène générées par le plasma peuvent exercer une action néfaste sur l'ADN en provoquant des dommages tels que la réticulation des bases nucléotidiques pyrimidiques. Ces réticulations altèrent la structure de l'ADN et peuvent avoir des répercussions significatives sur les processus de transcription et de réplication de l'ADN. Certains ROS interagissent spécifiquement avec les bases azotées. L'oxygène singulet peut, par exemple, oxyder la guanine. Plusieurs groupes de recherche se sont intéressés à l'effet du plasma sur l'ADN. Joshi et al. (2011) ont étudié les dommages oxydatifs chez *E. coli* après l'exposition à un plasma d'air. Les effets du plasma sur l'ADN ont été démontrés par deux méthodes : par électrophorèse pour la mise en évidence de la perte d'intégrité de l'ADN et par dosage immuno-enzymatique (ELISA) en quantifiant la formation de la 8-hydroxydésoxyguanosine (8-OHdG). Après quelques secondes d'exposition, le plasma a entraîné une désintégration structurelle de l'ADN et une formation de 8-OHdG. De la même manière, H. Xu et al. (2020) ont étudié les dommages oxydatifs chez *Saccharomyces cerevisiae* après exposition à un JPPA He/O<sub>2</sub>. Les mesures des intensités des bandes d'ADN, extraites du gel d'agarose en fonction du temps d'exposition au plasma, ont montré une diminution progressive en fonction du temps d'exposition.

Dans l'ensemble, notre analyse de l'ADN fournit la preuve que les ROS générés par le plasma causent des dommages létaux à l'ADN pour les deux phases de croissance. Nous avons donc conclu que les ROS sont des facteurs clés dans la dégradation de l'ADN, quel que soit l'arsenal de défense de la bactérie (physiologique, morphologique ou transcriptomique).

## *Conclusion*

Les caractéristiques cellulaires des deux phases de croissance influencent la sensibilité des bactéries à l'exposition au plasma. L'étude de la réduction bactérienne a montré que les cellules de la phase exponentielle sont plus sensibles au plasma, et que cette réponse dépend du temps d'exposition. On a observé que, pour les courts temps de traitement, les cellules subissent des dommages sous-létaux, tandis que la prolongation du temps d'exposition entraîne une perte de la capacité à former des colonies et une inactivation complète des cellules. L'étude de l'état physiologique des cellules a révélé une réduction de l'activité métabolique et un passage plus précoce des cellules à l'état VBNC. À l'inverse, les cellules de la phase stationnaire sont moins sensibles au traitement par plasma. L'exposition au plasma n'a provoqué ni dommage sous-létal, ni inactivation complète des cellules. De plus, l'étude des caractéristiques physiologiques a révélé que les cellules maintiennent une activité métabolique même après un long traitement, avec un passage tardif à l'état VBNC. Dans l'ensemble, selon le temps d'exposition, les bactéries de chaque phase de croissance présentent un scénario d'inactivation différent. Pour la phase exponentielle, les bactéries subissent d'abord des dommages sous-létaux, puis une diminution de l'activité métabolique, avant une inactivation complète. En phase stationnaire, les bactéries baissent leurs activités métaboliques, présentant ainsi une adaptation physiologique tardive et prolongée avec le temps d'exposition. L'étude des caractéristiques morphologiques a montré une perte progressive de l'intégrité membranaire des cellules des deux phases de croissance en fonction de l'exposition au plasma. Néanmoins, les résultats montrent aussi que le pourcentage des cellules ayant une membrane intacte reste relativement élevé, même après un long temps d'exposition, pour les deux phases de croissance. Cela révèle que dans le cas des traitements par plasma, la perte de la viabilité bactérienne n'est pas uniquement liée aux dommages membranaires, mais qu'il existe d'autres mécanismes antibactériens pour le traitement par plasma. Nous avons évalué la différence des caractéristiques structurales de l'ADN des deux phases face à l'accumulation des ROS intracellulaires induits par le plasma. Les résultats ont montré une désintégration de l'ADN pour les deux phases de croissance. L'effet des ROS sur l'ADN semble être identique sur les deux types de bactéries, confirmant ainsi que les principaux facteurs pour l'inactivation bactérienne restent la production de ROS.





## *Chapitre V : Effets du plasma sur l'inactivation des bactéries résistantes aux antibiotiques et sur l'inhibition des mécanismes de transfert horizontal de gènes*

Avec la surconsommation d'antibiotiques, l'antibiorésistance est devenue un problème environnemental mondial. Récemment, les bactéries résistantes aux antibiotiques (ARB) et les gènes de résistance aux antibiotiques (ARGs) ont été classés comme des contaminants émergents dans l'environnement. Différentes espèces d'entérobactéries sont détectées dans l'environnement aquatique, telles qu'*E. coli*, *Klebsiella spp*, *Aeromonas spp* et *Enterococcus spp*. La plupart de ces espèces présentent des résistances aux antibiotiques. Un nombre important d'études a montré une forte présence de ARGs dans l'environnement aquatique, parmi lesquels les plus courants sont les résistances aux  $\beta$ -lactamines, aux quinolones, aux tétracyclines et aux macrolides. Ces données rapportent également la présence d'éléments génétiques mobiles (EGM), tels que des plasmides et des intégrons. Ces derniers sont considérés comme les principaux moteurs de la dissémination de l'antibiorésistance dans la communauté bactérienne. La libération

Des ARGs et des EGM dans l'environnement augmente le potentiel de leur acquisition par des bactéries initialement sensibles aux antibiotiques par des mécanismes de transfert horizontal de gènes (HGT). Le transfert par conjugaison est le mécanisme de HGT le plus fréquent dans les conditions environnementales. Il semble être particulièrement impliqué dans la dissémination des GRA dans la communauté bactérienne.

Par ailleurs, les plasmides jouent un rôle crucial dans l'évolution et l'adaptation des bactéries. Les gènes plasmidiques peuvent être divisés en deux catégories : ceux qui codent pour des fonctions de squelette et ceux qui codent pour des fonctions accessoires. Les gènes du squelette codent pour des fonctions plasmidiques de réplication et de maintenance, alors que les gènes accessoires codent pour des fonctions non plasmidiques potentiellement utiles à la cellule hôte. Ils peuvent notamment augmenter l'aptitude des bactéries dans certaines conditions environnementales, telles que la résistance aux antibiotiques et aux métaux lourds ou la capacité de coloniser de nouvelles niches. Contrairement à l'ADN chromosomique bactérien qui n'est transmis que verticalement de la cellule mère aux cellules filles, l'ADN plasmidique peut être aussi transmis horizontalement entre des bactéries, même si elles sont phylogénétiquement éloignées. Les plasmides fournissent donc aux bactéries un accès potentiel à un vaste réservoir de gènes accessoires qui contribuent de manière significative à la diversification génomique et écologique des taxons bactériens, et dont les principaux moteurs dynamiques sont les mécanismes de transfert horizontal de gènes (HGT). Malgré les avantages potentiels conférés par les plasmides, ils présentent également un inconvénient : celui du "coût d'adaptation" pour l'hôte. Dans des conditions affectant la réplication bactérienne, les plasmides entraînent une diminution du taux de croissance, et donc un affaiblissement de la cellule hôte, avant d'être libérés dans l'environnement extracellulaire par la cellule hôte (Arkhangelsky et al. 2011), (Billane et al. 2022), (Palma et al. 2022).

Les procédés de décontamination tels que l'irradiation UV, la chloration et l'ozonation sont des procédés de décontamination largement appliqués pour garantir la sécurité sanitaire de l'environnement aquatique. Au cours des dernières décennies, le traitement UV est l'une des technologies les plus utilisées dans le traitement des eaux, car l'inactivation des microorganismes est réalisée sans la production de sous-produits génotoxiques (Guo et al. 2013), (Lee et al. 2015). La chloration est un autre exemple de procédé de décontamination. Elle a été introduite dans les stations de traitement des eaux au début du 19e siècle pour éliminer les agents pathogènes d'origine hydrique en raison de son efficacité, de sa facilité d'utilisation et de son faible coût. La chloration peut détruire l'intégrité structurelle de la surface cellulaire en réagissant avec les composants situés sur la membrane cellulaire. Elle peut aussi altérer la perméabilité de la paroi

cellulaire, entraînant la fuite des constituants cellulaires, tels que l'ATP, l'ADN et les protéines. Toutefois, la destruction de la membrane et la libération du contenu cellulaire dans l'environnement peuvent entraîner la libération des gènes de résistance aux antibiotiques dans l'environnement. Dans ce cas, les ARGs intracellulaires hébergés par les ARB deviennent ainsi des GRA extracellulaires. Bien que ces procédés soient toujours appliqués dans les stations de traitement des eaux, il est nécessaire de rechercher des procédés de dégradation alternatifs plus efficaces afin de prendre en compte cette problématique sanitaire.

Ce chapitre est composé de deux parties. La première concerne l'effet du plasma sur les ARB et l'influence de la présence de plasmides sur la sensibilité des ARB au traitement de décontamination par plasma. L'étude a été réalisée sur quatre souches d'*E. coli* : DH5  $\alpha$ , DH5 $\alpha$  + puC19, HT-99 et J-53R. Les essais de décontamination ont été réalisés sur des cellules obtenues en phase stationnaire de croissance. Après le traitement par plasma, un ensemble de paramètres microbiologiques et moléculaires a été analysé, notamment le taux de réduction bactérienne, la présence de lésions sous-létales, l'activité métabolique, la capacité à former des cellules à l'état VBNC, l'intégrité membranaire et le taux de ROS intracellulaires. En parallèle, un dosage enzymatique de la superoxyde dismutase (SOD) et de la catalase (CAT) a été réalisé sur HT-99 et J-53R pour mettre en évidence la réponse au stress oxydatif induit par le plasma. La deuxième partie étudie l'effet du plasma sur le transfert horizontal de gènes (HGT) à partir d'un système modèle conjugatif que nous avons mis au point dans des conditions de laboratoire. Cette étude a été réalisée avec les souches HT-99 en tant que souche donneuse (F+) et J-53R en tant que souche réceptrice (F-). Après exposition au plasma, la souche donneuse HT-99 a été mise en contact avec la souche réceptrice J-53R non exposée au plasma selon différents temps d'incubation (6, 9, 24 et 48 h), puis inoculée sur un milieu nutritif gélosé contenant le chloramphénicol, la rifampicine ou les deux antibiotiques. En parallèle, nous avons également évalué l'effet du plasma sur la concentration minimale inhibitrice (CMI) de la souche HT-99 au chloramphénicol après exposition au plasma.

## 1. Effet du plasma sur les ARB

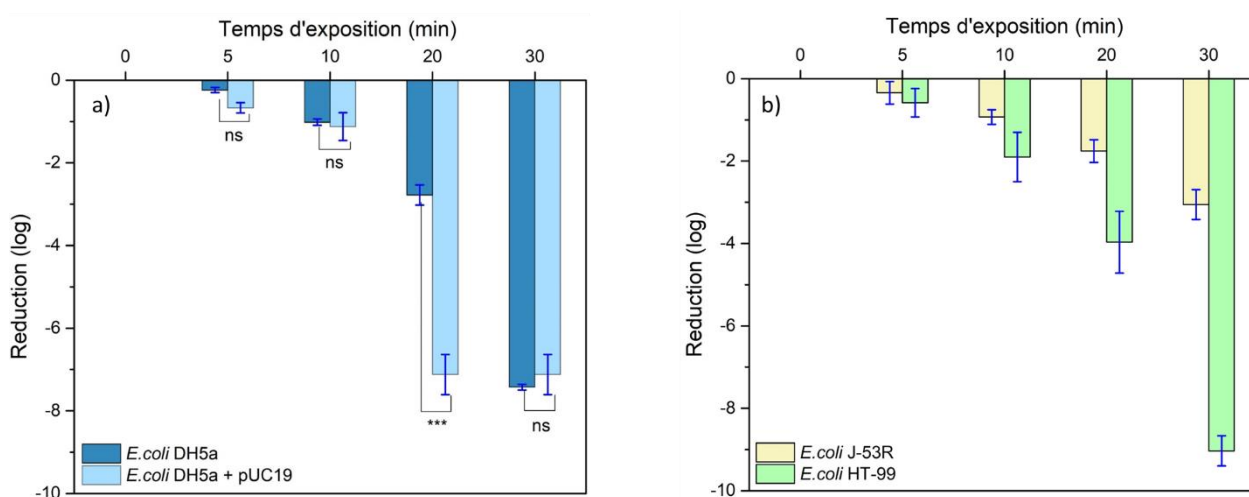
### 1.1. Influence de la présence de plasmide sur la viabilité bactérienne

Comme nous l'avons discuté dans le chapitre IV, le facteur de l'inactivation bactérienne par plasma est la production de ROS. Ces derniers entraînent des dommages intracellulaires. Néanmoins, dans certaines conditions, la présence de plasmides permet aux bactéries de répondre différemment aux conditions de stress. La Figure 42 représente les taux de réduction

des quatre souches d'*E. coli*. Afin de mettre en évidence l'influence de la présence du plasmide sur la sensibilité des bactéries au plasma, nous avons choisi de représenter les résultats en dissociant ceux de DH5 $\alpha$  avec et sans plasmide, et ceux pour HT-99 et J-53R.

La Figure 42.a correspond aux taux de réduction de DH5 $\alpha$  en absence et en présence de plasmide après exposition au plasma. Les deux bactéries présentent une décroissance progressive de la survie en fonction du temps d'exposition au plasma. L'augmentation du temps d'exposition à 20 minutes a révélé une forte sensibilité de DH5 $\alpha$  transformée avec 7 logs de réduction contre 3 logs de réduction pour DH5 $\alpha$  non transformée. Toutefois, la prolongation de la durée du traitement a provoqué une inactivation des deux bactéries avec 7 logs de réduction.

De la même manière, les résultats pour HT-99 et J-53R de la Figure 42.b montrent une diminution progressive de la viabilité des deux souches en fonction du temps d'exposition au plasma. Toutefois, la prolongation du temps d'exposition à 30 minutes a entraîné une inactivation complète de HT-99 avec une réduction de 8 logs et de 3 logs pour la souche J-53R.



**Figure 42** Réduction de *E. coli* après exposition au plasma : a) DH5 $\alpha$  et DH5 $\alpha$  + pUC19, b) HT-99 et J-53R. Cible traitée solution saline à 0,9 %, volume 100 mL. Le plasma est généré à une tension de 6kV, des impulsions de 2,5 $\mu$ s, une fréquence de 20kHz et un débit He/0,2% O<sub>2</sub> de 2 L.min<sup>-1</sup>.

Ces premiers résultats de viabilité de DH5 $\alpha$  + pUC19 et HT-99 montrent que la présence de plasmide augmente la sensibilité des bactéries au traitement au plasma. Des études antérieures ont montré que les plasmides peuvent être des éléments avantageux pour les bactéries. Ils sont notamment des facteurs d'évolution permettant aux bactéries de s'adapter à leur environnement, comme la présence d'antibiotiques. Cependant, des études ont également rapporté que l'acquisition d'un gène extra-chromosomique impose à la cellule hôte un coût d'adaptation

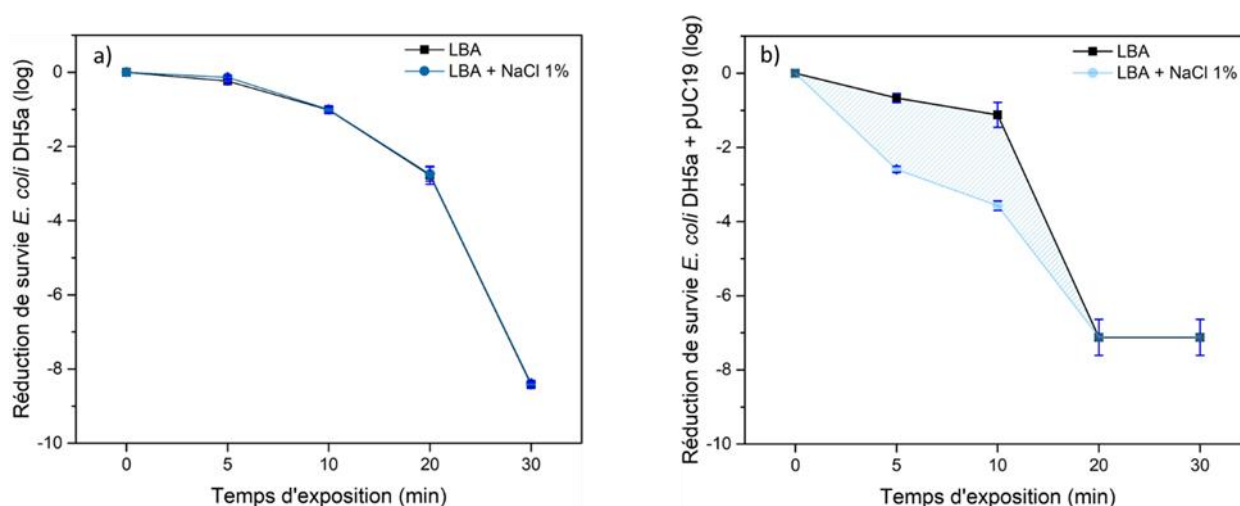
affectant ses fonctionnalités cellulaires, telles que le potentiel de survie dans des conditions de stress ou le potentiel de virulence (Park et Zhang 2012), (Baltrus 2013), (Billane et al. 2022). Récemment, différentes études soutiennent l'hypothèse que l'acquisition d'un plasmide requiert la mise en œuvre de la machinerie métabolique de la cellule hôte, ce qui se traduit par un affaiblissement de la cellule (Zarzecka et al. 2022). Ce dernier cas correspond à nos résultats. En effet, après exposition au plasma, la pression sélective induite par la présence de plasmides chez les bactéries les a rendues plus vulnérables que celles dépourvues de plasmide.

Toutefois, dans certaines conditions, les bactéries en absence et en présence de plasmide peuvent présenter une sensibilité similaire. Sakudo et Misawa (2020) ont examiné si les bactéries résistantes et non résistantes aux antibiotiques présentaient une sensibilité différente au traitement au plasma. La souche *E. coli* DH5 $\alpha$  a été transformée avec un plasmide (pPRO) qui code pour un gène de résistance à l'ampicilline et au chloramphénicol. Elle a ensuite été traitée avec une torche plasma d'air à une tension de 10 kV et une fréquence de 10 kHz. Le volume de la suspension traitée était de 20  $\mu$ L. Les résultats de l'inactivation bactérienne ont montré que la présence de plasmides ne modifiait pas la sensibilité des cellules.

## 1.2. Influence de la présence de plasmide sur l'apparition des lésions sous létales

Nous avons montré dans le chapitre IV que l'exposition au plasma induit des lésions sublétales aux bactéries. Comme ces lésions sont réversibles, les bactéries peuvent reprendre leur cultivabilité lorsque les conditions sont favorables. Le but de cet essai est d'analyser l'influence de la présence d'une résistance plasmidique sur l'apparition des lésions sublétales en utilisant un milieu de culture gélifié en l'absence et en présence de chlorure de sodium à 1%. L'écart entre les populations obtenues sur les deux milieux correspond au nombre de bactéries ayant subi des lésions sublétales. Pour DH5 $\alpha$  non transformée, les populations cultivées sur le milieu sélectif ou non présentent la même tendance de décroissance en fonction du temps d'exposition au plasma. Aucune différence n'est observée entre les populations cultivées sur les deux milieux, sélectif et non sélectif, avec une inactivation complète après 30 minutes d'exposition (Figure 43.a). En revanche, pour DH5 $\alpha$  + pUC19, une différence de 2 log est observée entre la population cultivée sur milieu sélectif et non sélectif, notamment entre les temps 5 et 10 minutes d'exposition. La prolongation du temps de traitement par plasma à 20 minutes entraîne une inactivation complète de DH5 $\alpha$  + pUC19 (Figure 43.b).

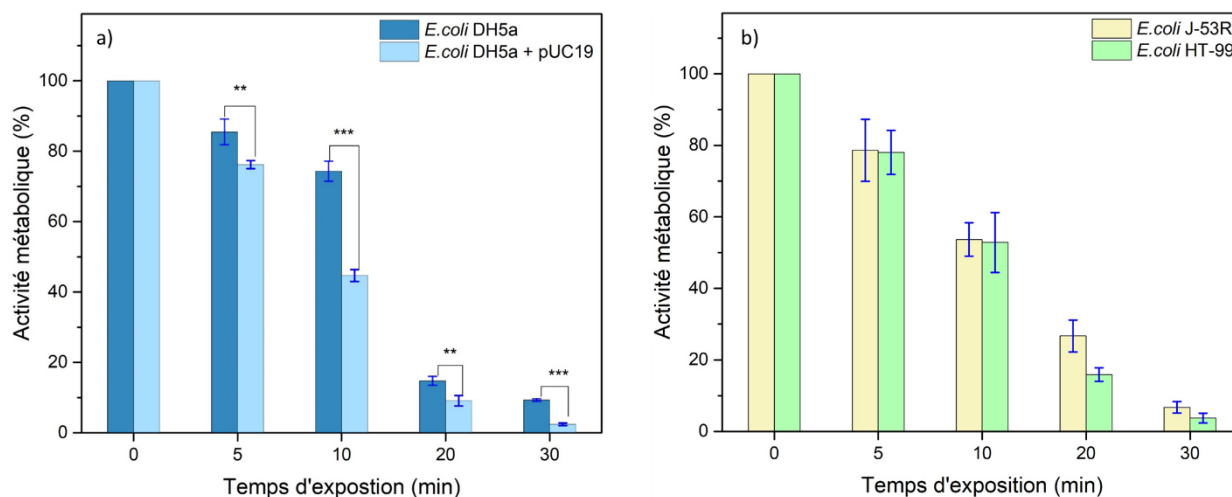
Ces résultats confirment que la présence du plasmide rend la cellule hôte plus sensible au plasma. Nous pouvons observer que les cellules DH5 $\alpha$  + pUC19 présentent deux tendances qui dépendent du temps d'exposition. Pour les courts temps de traitement, les cellules ont subi des lésions sublétales affectant leur croissance. Cependant, la prolongation de l'exposition au plasma a induit une inactivation complète des cellules. Ces observations nécessitent d'être approfondies par des méthodes protéomiques et transcriptomiques afin d'identifier les mécanismes mis en jeu.



**Figure 43** Réduction de la survie de DH5 $\alpha$  et DH5 $\alpha$  + pUC19 LBA et LBA supplémentée par NaCl à 1%, après exposition au plasma. La zone rayée correspond à la population de bactéries avec des lésions sous-létales. Cible traitée solution saline à 0,9 %, volume 100 mL. Le plasma est généré à une tension de 6kV, des impulsions de 2,5 $\mu$ s, une fréquence de 20kHz et un débit He/0,2% O<sub>2</sub> de 2 L.min<sup>-1</sup>.

### 1.3. Influence de la présence de plasmide sur la physiologie bactérienne

Des études récentes ont montré que l'expression d'un grand nombre de gènes a été réprimée dans une souche portant des plasmides, provoquant une diminution de l'énergie requise par la machinerie traductionnelle (Lang et Johnson 2015), (Buckner et al. 2018), (Billane et al. 2022). Dans cette partie de l'étude, nous avons examiné l'impact de la présence du plasmide sur la réponse métabolique à l'exposition au plasma. Nous avons d'abord examiné l'effet sur la même souche DH5 $\alpha$  sans et avec pUC19, puis sur les deux souches HT-99 et J-35R. Le pourcentage des cellules ayant une activité métabolique, pour toutes les souches, présente une diminution progressive en fonction du temps d'exposition (Figure 44). DH5 $\alpha$  présente des valeurs d'activité métabolique supérieures à celles des cellules DH5 $\alpha$  + pUC19. De la même manière, J-53R présente une activité métabolique intense par rapport à celle de HT-99, notamment pour 20 minutes d'exposition. Dans l'ensemble, ces résultats confirment notre hypothèse selon laquelle la présence de plasmides rend les bactéries plus sensibles au plasma.



**Figure 44** Réduction de l'activité métabolique après exposition au plasma : a) DH5α et DH5α + pUC19, b) HT-99 et J-53R. Cible traitée solution saline à 0,9 %, volume 100 mL. Le plasma est généré à une tension de 6kV, des impulsions de 2,5μs, une fréquence de 20kHz et un débit He/0,2% O<sub>2</sub> de 2 L.min<sup>-1</sup>.

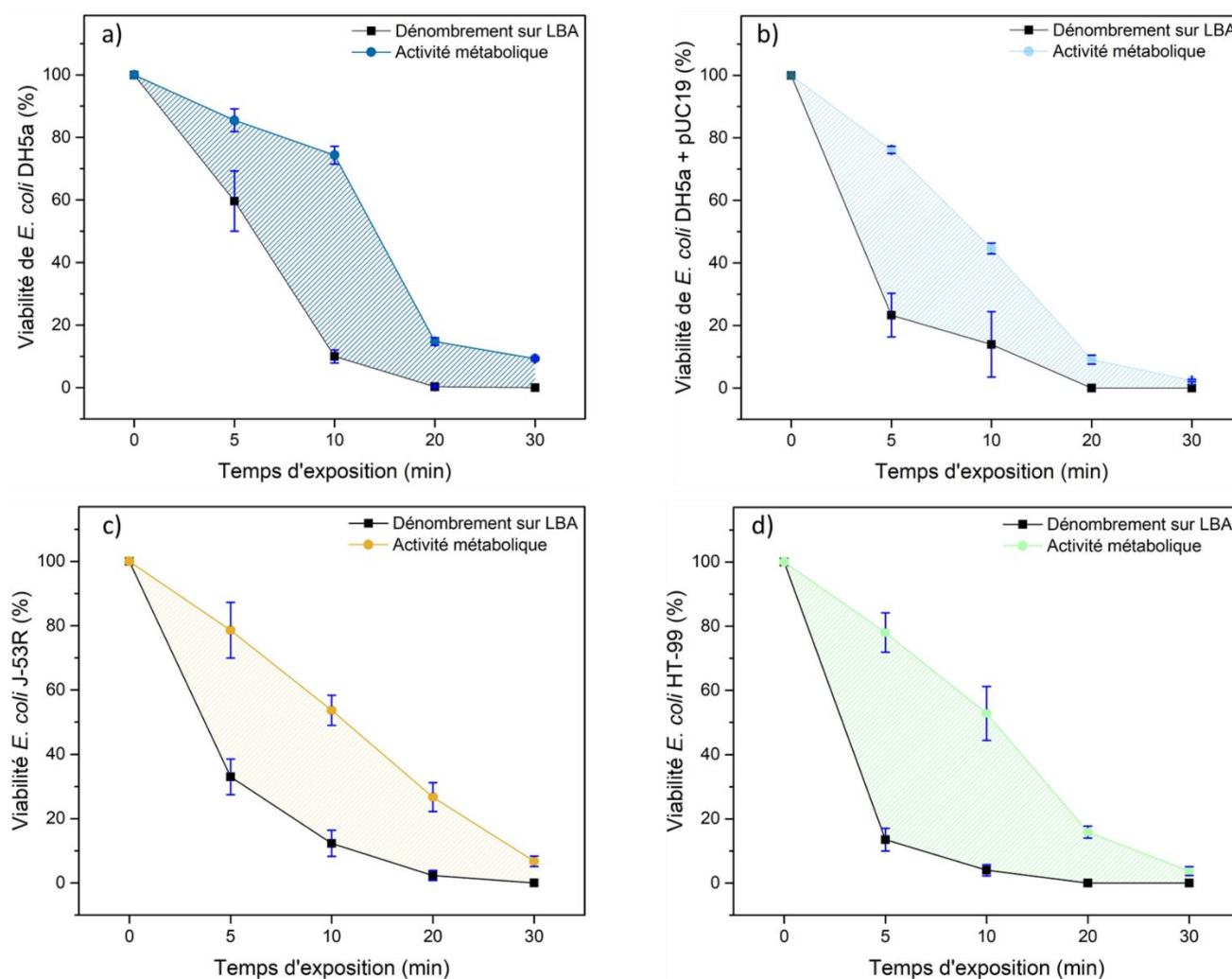
La présence de plasmides intracellulaires induit un ensemble de changements chez la cellule hôte, incluant l'altération de l'expression de la sous-unité 16S, la perturbation des facteurs transcriptomiques, et des perturbations dans les mécanismes de transfert et de biosynthèse des métabolites cellulaires tels que les acides aminés et les glucides (Lang et Johnson 2015), (Buckner et al. 2018). Dans le cas d'un stress oxydatif induit par plasma, le phénomène cellulaire le plus remarquable est l'entrée des bactéries à l'état VBNC.

Afin de mettre en évidence l'influence de la présence du plasmide sur les mécanismes métaboliques cellulaires, nous avons comparé les résultats de viabilité bactérienne obtenus par dénombrement sur milieu gélosé (LBA) avec ceux de l'estimation de l'activité métabolique. L'écart entre la population obtenue sur milieu de culture gélosé et celle présentant une activité métabolique correspond au nombre de bactéries à l'état viable mais non cultivable (Figure 45). L'estimation de l'activité métabolique donne une valeur de viabilité plus élevée que celle obtenue par le dénombrement sur milieu gélosé, pour les quatre souches et pour tous les temps d'exposition.

Dans le cas de DH5α, après 5 minutes d'exposition, une différence de 26 % est observée entre la population cultivée et celle révélée par l'estimation de l'activité métabolique. Une proportion qui augmente à 64 % après 10 minutes d'exposition puis qui diminue à 13 % et 10 %, après 20 et 30 minutes d'exposition, respectivement (Figure 45.a). Dans le cas de DH5α + pUC19, après 5 min d'exposition au plasma, une différence de 50 % est observée entre la population cultivée et celle ayant une activité métabolique. La prolongation du temps d'exposition a entraîné une diminution de cette fraction de la population qui devient nulle après 30 minutes d'exposition.



(Figure 45.b). De manière semblable, dans le cas de J-53R après 5 minutes de traitement, une différence de 50% est observée entre la population cultivée et celle révélée par l'estimation de l'activité métabolique. Une proportion qui reste stable après 10 minutes d'exposition à environ 45 % puis qui diminue à 13 % et devient nulle après 20 et 30 minutes d'exposition, respectivement (Figure 45.c). Dans le cas de HT-99, après 5 minutes d'exposition au plasma, une différence de 70 % est observée entre la population cultivée et celle ayant une activité métabolique. A 30 minutes, la HT-99 perd complètement son activité métabolique (Figure 45.d).



**Figure 45** Comparaison de la viabilité bactérienne estimée par dénombrement sur milieux gélose et celle estimée par l'activité métabolique après exposition au plasma : a) DH5α, b) DH5α + pUC19, c) J-53R et d) HT-99. La zone rayée correspond à la population de bactéries à l'état VBNC. Cible traitée solution saline à 0,9 %, volume 100 mL. Le plasma est généré à une tension de 6kV, des impulsions de 2,5μs, une fréquence de 20kHz et un débit He/0,2% O<sub>2</sub> de 2 L.min<sup>-1</sup>.

L'écart déterminé entre l'activité métabolique et le dénombrement sur gélose correspond aux bactéries à l'état VBNC. Ces résultats montrent que la présence d'un ADN plasmidique change le comportement des cellules par rapport à l'entrée à l'état VBNC. La présence du plasmide a induit une entrée précoce des cellules à l'état VBNC après 5 minutes d'exposition, tandis que les cellules

dépourvues de plasmides passent dans cet état à partir de 10 minutes d'exposition. Cette différence pourrait être expliquée par le coût d'adaptation.

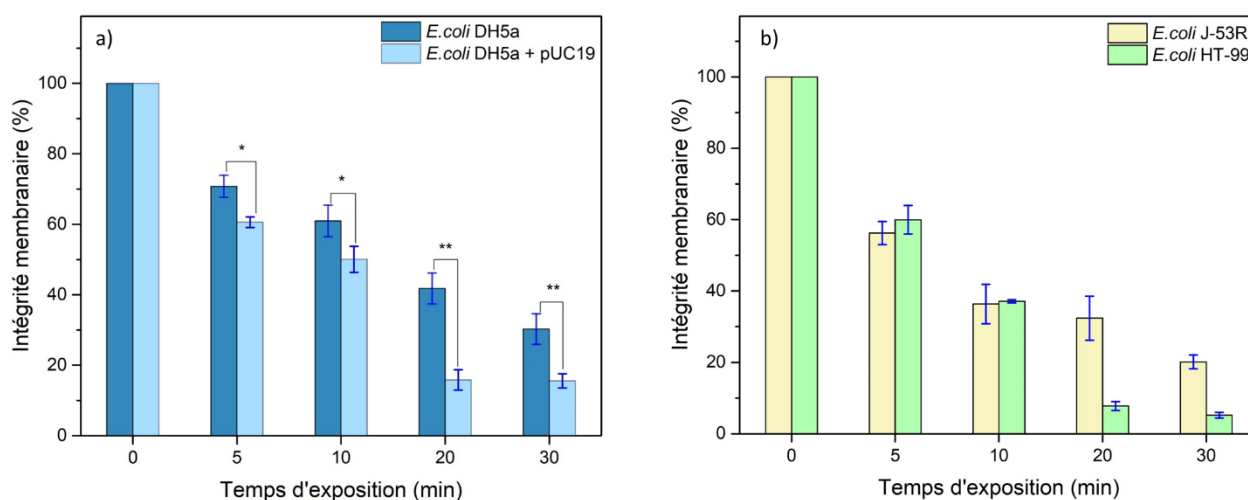
Pour déterminer les mécanismes expliquant la variation des effets de la présence de l'ADN plasmidique chez les bactéries, Buckner et al. (2018) ont étudié les changements adaptatifs chez *Klebsiella pneumoniae*. L'introduction du plasmide pKpQIL, portant une résistance aux  $\beta$ -lactamase *bla*<sub>TEM-1</sub> et *bla*<sub>KPC-3</sub>, a induit une altération de l'expression de la sous unité 16S. L'analyse transcriptomique a révélé la perturbation d'un ensemble de processus, tels que le transport et le métabolisme des acides aminés et des glucides, la biogenèse de la paroi cellulaire/membrane/enveloppe, la production et la conversion d'énergie, la transduction du signal et la transcription. De la même manière, Lang et Johnson (2015) ont montré que l'acquisition du plasmide A/C2 par *E. coli* et *Salmonella enterica* a entraîné des changements dans l'expression de gènes chromosomiques impliqués dans le métabolisme et la production d'énergie. Les auteurs suggèrent également que ces changements adaptatifs dépendent en partie du contenu en chromosome de l'hôte et des facteurs environnementaux. Ainsi, ces exemples montrent clairement que les plasmides affectent l'expression des gènes chromosomiques impliqués dans le métabolisme et la production d'énergie.

#### 1.4. Influence de la présence de plasmide sur l'intégrité membranaire

L'acquisition d'un ADN exogène par une bactérie implique des caractéristiques physiologiques spécifiques qui lui permettent de transloquer l'ADN exogène du milieu extérieur vers l'espace intracellulaire. Dans le chapitre I, nous avons vu que la transformation bactérienne exige un état physiologique cellulaire appelé "compétence". Au moins 40 espèces bactériennes, réparties dans tous les groupes taxonomiques, sont connues pour être naturellement compétentes. Chez la plupart de ces espèces, la compétence génétique est un état physiologique transitoire dont le développement est étroitement contrôlé par des processus propres à l'organisme, notamment la détection des perturbateurs environnementaux. L'état de compétence bactérienne peut également être induit artificiellement en laboratoire. Plusieurs approches existent. Elles impliquent généralement le traitement des cellules dans la phase de croissance exponentielle avec des produits chimiques (bactéries chimiquement compétentes), un choc thermique (bactéries compétentes par choc thermique), des impulsions électriques (bactéries électro-compétentes) ou des combinaisons des trois. Dans notre cas, la souche DH5 $\alpha$  étudiée est chimiquement compétente (Invitrogen). Ces traitements créent essentiellement des nanopores dans la membrane cellulaire bactérienne suffisamment grands pour que le plasmide passe à travers sans détruire la membrane (Arkhangelsky et al. 2011). Toutefois, les mécanismes par

lesquels l'ADN pénètre à travers la membrane ne sont toujours pas clairs. Le but de cette étude est d'examiner si l'acquisition d'un plasmide influence la sensibilité membranaire au traitement par plasma.

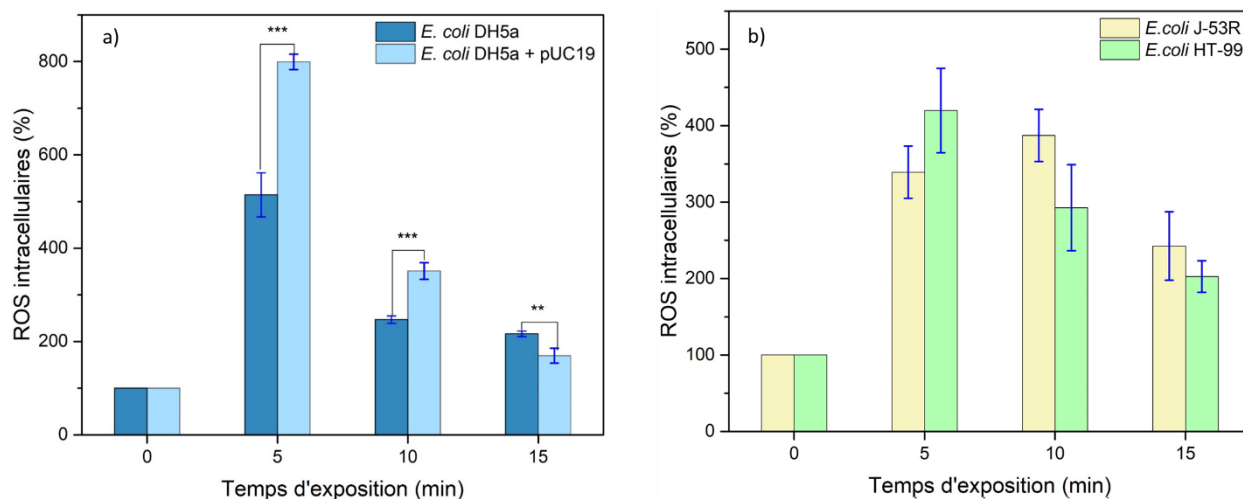
La Figure 46.a représente le pourcentage de bactéries ayant subi des dommages membranaires après l'exposition au plasma. La souche DH5 $\alpha$ , sans et avec plasmide, présente une intégrité membranaire qui diminue avec l'augmentation du temps d'exposition. On observe une différence significative pour les longs temps de traitement pour les deux couples de bactéries. Les valeurs montrent qu'après 30 minutes d'exposition, 70 % et 85 % des cellules, associées respectivement à DH5 $\alpha$  et DH5 $\alpha$  + pUC19, perdent leur intégrité membranaire. Les résultats de cette étude indiquent une forte perte d'intégrité membranaire, notamment chez les cellules ayant subi la transformation bactérienne. Ces résultats ont été confirmés pour les deux souches HT-99 et J-53R (Figure 46.b). Des différences significatives dans les dommages membranaires ont été obtenues entre HT-99 et J-53R à partir de 20 minutes d'exposition, où l'on observe une perte de l'intégrité membranaire de 95 % et 80 %, respectivement. Ces résultats suggèrent que l'acquisition d'un ADN exogène par la bactérie implique des changements membranaires qui, en cas de présence d'un facteur de stress tel que le plasma, affectent l'inactivation bactérienne.



**Figure 46** Comparaison de l'intégrité membranaire après exposition au plasma : a) DH5 $\alpha$  et DH5 $\alpha$  + pUC19, b) HT-99 et J-53R. Cible traitée solution saline à 0,9 %, volume 100 mL. Le plasma est généré à une tension de 6kV, des impulsions de 2,5 $\mu$ s, une fréquence de 20kHz et un débit He/0,2% O<sub>2</sub> de 2 L.min<sup>-1</sup>.

Les résultats concernant la perte d'intégrité membranaire nous ont conduit à mesurer le taux de ROS intracellulaires. Toutes les souches présentent des valeurs de ROS qui augmentent en fonction du temps d'exposition au plasma. Toutefois dans le cas de la souche DH5 $\alpha$ , les cellules avec le plasmide présentent des taux de ROS intracellulaires supérieurs à celles dépourvues du plasmide (Figure 47.a). Malheureusement nous n'avons pas pu observer cette différence sur les

souches HT-99 et J-53R (Figure 47.b). A partir de ces résultats, nous suggérons que les cellules ayant subies une transformation bactérienne présentent une forte accumulation de ROS intracellulaires et une plus grande sensibilité au plasma.



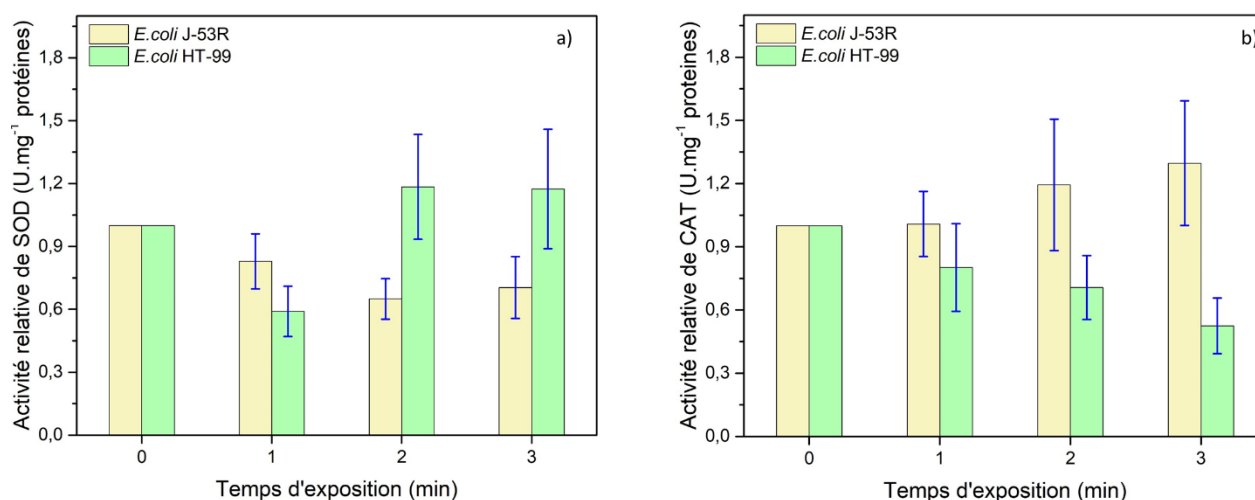
**Figure 47** Taux de ROS intracellulaire après exposition au plasma : a) DH5 $\alpha$  et DH5 $\alpha$  + pUC19, b) HT-99 et J-53R. Cible traitée solution saline à 0,9 %, volume 100 mL. Le plasma est généré à une tension de 6kV, des impulsions de 2,5 $\mu$ s, une fréquence de 20kHz et un débit He/0,2% O<sub>2</sub> de 2 L.min<sup>-1</sup>.

De nombreux facteurs importants influencent la translocation de l'ADN plasmidique à travers les nanopores de la membrane cellulaire. Ager et al. (2009) ont découvert que l'augmentation de la charge ionique de part et d'autre de la membrane favorise la transition des plasmides. Ces facteurs entraînent des changements dans les caractéristiques membranaires, augmentant ainsi la sensibilité des bactéries aux facteurs de stress environnementaux. Le manque de littérature sur ce sujet ne nous a pas permis d'approfondir l'impact de ces phénomènes sur la sensibilité de la membrane aux traitements de décontamination, y compris le plasma. Des études transcriptomiques pourraient apporter de nouvelles informations sur les phénomènes physiques régissant la translocation plasmidique.

### 1.5. Effet du plasma sur la réponse au stress oxydatif

Pour approfondir l'analyse de l'effet oxydatif du plasma sur les bactéries, nous nous sommes intéressés à l'évaluation de l'activité enzymatique de la superoxyde dismutase (SOD) et de la catalase (CAT). La Figure 48 représente l'activité enzymatique de la SOD et la CAT des souches HT-99 et J-53R après exposition au plasma. Lors de ces expériences, nous avons choisi de travailler avec des temps courts d'exposition pour garantir une activité transcriptomique intense. On observe une augmentation de l'activité de la SOD et la CAT pour les deux souches. Toutefois, la

faible reproductibilité des résultats ne nous a pas permis d'évaluer si les deux souches présentent une différence significative de l'activité pour les deux enzymes.



**Figure 48** Evaluation de l'activité de (a) SOD et (b) CAT de J-53R et HT-99 après exposition au plasma. Cible traitée solution saline à 0,9 %, volume 100 mL. Le plasma est généré à une tension de 6kV, des impulsions de 2,5 $\mu$ s, une fréquence de 20kHz et un débit He/0,2% O<sub>2</sub> de 2 L.min<sup>-1</sup>.

Par ailleurs, plusieurs travaux ont mis en évidence la présence d'une tendance biphasique de l'activité enzymatique après une exposition au plasma. Song et al. (2021) ont étudié le stress oxydatif induit par le plasma chez *E. coli*. Les résultats ont montré que l'activité de la SOD augmente pendant les premières minutes du traitement par plasma, puis atteint une valeur maximale à 8 minutes et diminue par la suite. Une tendance similaire a également été observée pour l'activité de la CAT. Ces résultats indiquent que la prolongation du temps d'exposition au plasma induit une baisse de l'activité de la SOD et de la CAT. Hu Li et al. (2021) ont étudié l'effet du plasma sur l'expression des gènes impliqués dans les mécanismes enzymatiques. L'activité des gènes (*sodB*, *sodC*, *katE* et *katG*) codant pour les activités de la SOD et de la CAT a été réprimée après 10 minutes de traitement par plasma. Nous rappelons que la CAT et la SOD, en tant qu'enzymes antioxydantes, peuvent éliminer les ROS intracellulaires, et que cette action est liée à la durée du traitement par plasma. Sous un faible temps d'exposition, les ROS intracellulaires peuvent déclencher des réponses de stress oxydatif bactérien. L'activité des deux enzymes augmente pour atténuer les dommages causés par les ROS. Dans le cas d'un temps d'exposition au plasma relativement long, elles sont inactivées par l'oxydation des ROS produits par le plasma, ce qui entraîne leur diminution et une perte de la viabilité bactérienne.

## 2. Effet du plasma sur les mécanismes de HGT

### 2.1. Effet du plasma sur la concentration minimale inhibitrice de HT-99

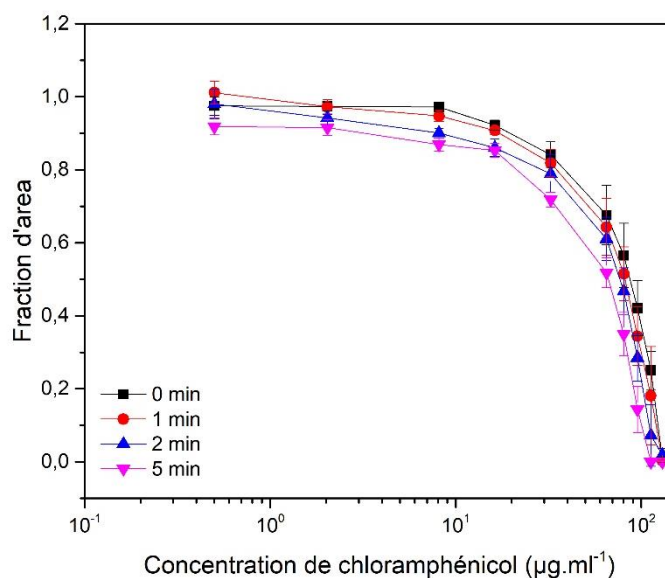
La concentration minimale inhibitrice (CMI) est la plus faible concentration d'un agent antibactérien exprimée en mg. L<sup>-1</sup> ou µg. mL<sup>-1</sup> qui, dans des conditions in vitro contrôlées, empêche complètement la croissance visible de la souche étudiée (Lambert et Pearson 2000). Cette valeur est déterminée soit par des méthodes de microdilution dans un milieu solide ou liquide supplémenté par l'antibiotique en question, soit par des méthodes de dégradé basées sur des bandelettes imprégnées d'un gradient prédéfini de concentration d'antibiotique. Dans le cas de notre étude, la méthode utilisée est celle de la microdilution dans un milieu liquide. Le but de cette étude est d'examiner si l'exposition au plasma modifie la valeur du CMI. Après exposition au plasma, la souche HT-99 a été mise en contact avec différentes concentrations de chloramphénicol puis inoculée dans le lecteur de plaque. Selon la méthode décrite par Lambert et Pearson (2000), le calcul du CMI est basé sur la fonction de Gompertz. Les données sous forme de concentration logarithmique sont rapportées à la surface fractionnaire « fraction area ». La fonction de Gompertz altérée, dans ce cas, relie la surface fractionnaire (y) au logarithme de la concentration antimicrobienne (x) (Equation 4) :

$$y = A + Ce^{(x-M)} \quad \text{Equation 4}$$

Où (A) est l'asymptote inférieure de y (approximativement zéro), B un paramètre de pente, (C) la distance entre l'asymptote supérieure et inférieure (approximativement 1) et M la concentration logarithmique du point d'inflexion. Les valeurs du CMI sont définies comme l'intersection des lignes  $y = A + C$  et  $y = A$ , avec l'équation de la ligne tangentielle au point (M, (A + Ce - 1)), respectivement (Equation 5):

$$CMI = 10^{(M - \frac{1}{B})} \quad \text{Equation 5}$$

Les résultats de la Figure 49 représentent les concentrations du CMI de HT-99 après exposition au plasma. Par rapport au contrôle, le traitement par plasma entraîne une légère décroissance du CMI mais qui reste statistiquement non significative. Ainsi, le plasma ne change pas la valeur du CMI et par conséquent ne modifie pas la sensibilité des bactéries aux antibiotiques.



**Figure 49** Concentration de CMI de HT-99 au chloramphénicol après exposition au plasma. Cible traitée solution saline à 0,9 %, volume 100 mL. Le plasma est généré à une tension de 6kV, des impulsions de 2,5µs, une fréquence de 20kHz et un débit He/0,2% O<sub>2</sub> de 2 L.min<sup>-1</sup>.

Song et al. (2021) ont étudié l'effet d'une décharge plasma sur la sensibilité de *E. coli* résistante à trois antibiotiques. Ils ont montré qu'après 10 minutes d'exposition au plasma le CMI représentant les profils de résistance aux antibiotiques diminuait de 96,9 %, 96,9 % et 98,4% pour la tétracycline, l'amoxicilline et la gentamicine, respectivement. Ces résultats indiquent ainsi que le plasma entraîne une augmentation de la sensibilité des bactéries aux antibiotiques. Hai-bei Li et al. (2021) ont examiné l'effet d'un traitement UV sur la sensibilité de *Pseudomonas aeruginosa* à la tétracycline, la ciprofloxacine et la polymyxine B. Ils ont montré que les CMI des trois antibiotiques augmentaient significativement avec la dose d'irradiation reçue.

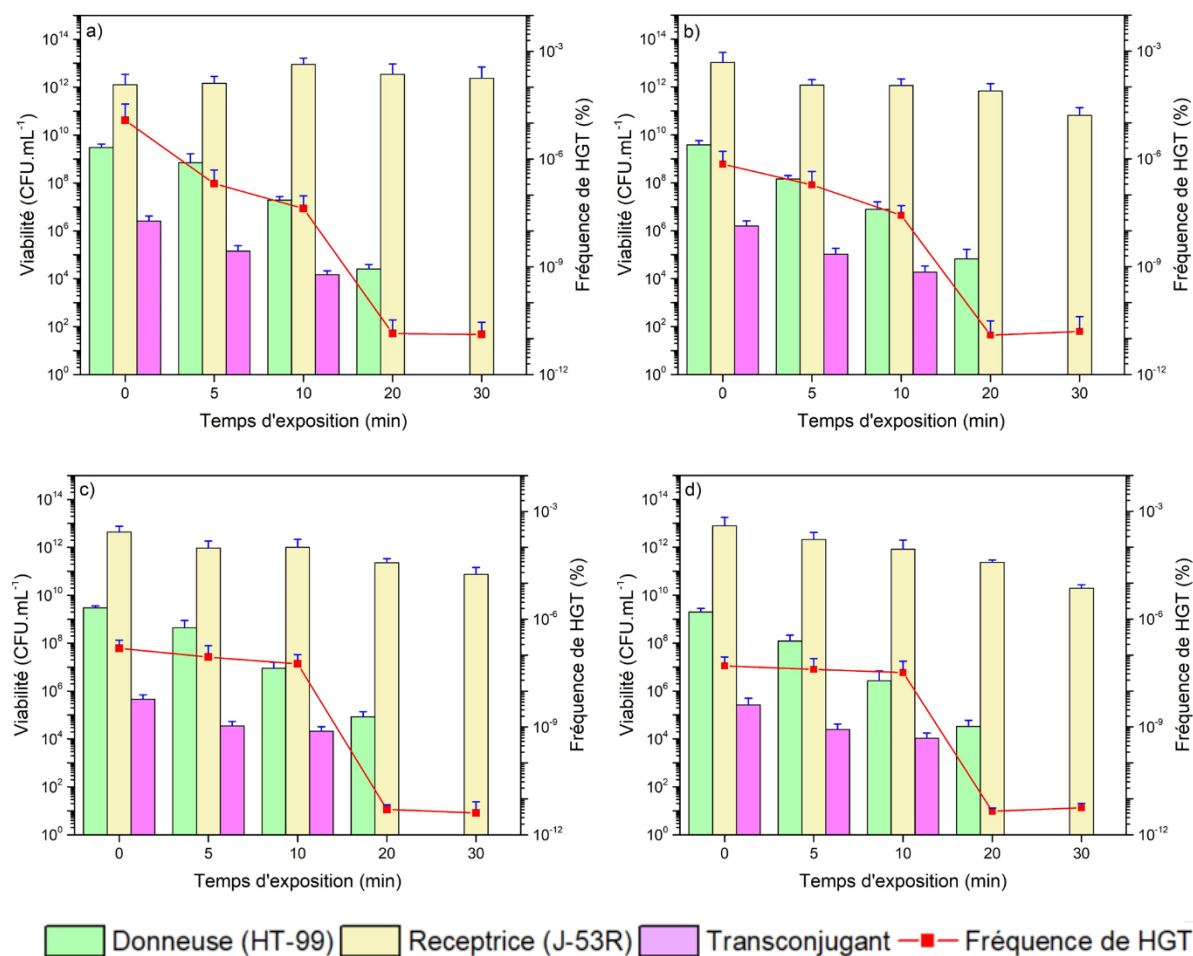
## 2.2.Effet du plasma sur le transfert conjugatif de HT-99

Plus récemment, certaines méthodes ont été envisagées pour inactiver les ARB et éliminer les ARGs, notamment l'oxydation photocatalytique (Chen et al. 2019), la chloration (J. Lu et al. 2018) et les nanomatériaux (Qiu et al. 2012). Bien que ces méthodes aient permis de réduire les ARB et les ARGs, elles n'ont pas pu inhiber efficacement la fréquence de transfert conjugatif des ARGs, et ont même favorisé le transfert conjugatif entre les bactéries (Qiu et al. 2012), (J. Lu et al. 2018). Une étude précédente a révélé qu'après un traitement par oxydation photocatalytique, les cellules subissaient un stress oxydatif et une augmentation du pouvoir conjugatif (Chen et al. 2019). J. Lu et al. (2020) ont également signalé que les nanoparticules d'argent favorisaient l'augmentation des ROS intracellulaires et la réponse induite par les dommages à l'ADN,

augmentant ainsi le transfert horizontal des gènes. Par conséquent, il est important de développer de nouvelles approches pour réduire le risque de transfert d'ARGs.

Le but de cette étude est d'évaluer la capacité du plasma à inhiber le transfert conjugatif de HT-99. La souche HT-99 donneuse exposée au plasma a été mise en contact avec la souche J-53R réceptrice non exposée au plasma. La Figure 50 représente la viabilité de HT-99 (colonne en vert), de J-53R (colonne en jaune), du transconjugant (colonne en rose), et la fréquence de HGT (courbe en rouge). Les transconjugants correspondent aux bactéries qui ont une double résistance au chloramphénicol et à la rifampicine. Chaque graphique représente le suivi de la viabilité en fonction du temps d'exposition au plasma et du temps de contact entre les deux souches (6, 9, 24, et 48 heures). Après 6 et 9 heures de contact (Figure 50.a et 50.b), on observe une diminution de 1 log du nombre de HT-99, conséquence d'une diminution du nombre de bactéries transconjugantes, notamment pour les courts temps d'exposition au plasma (5 et 10 minutes). Cependant, l'augmentation de l'exposition au plasma (30 minutes) a induit une inactivation complète de HT-99 et une inhibition du HGT. Pour les temps de contact de 24 et 48 heures (Figure 50.c et 50.d), la fréquence d'inhibition de HGT présente une très faible décroissance après 5 et 10 minutes de traitement, mais une inhibition totale du transfert au-delà de 20 minutes d'exposition. Dans l'ensemble, l'augmentation du temps d'exposition au plasma diminue la capacité de HT-99 à transférer son plasmide à la souche réceptrice. La prolongation du temps de contact entre les deux souches a montré que l'effet du plasma sur les mécanismes de transfert horizontal de gènes de résistance aux antibiotiques est irréversible.





**Figure 50** Effet du plasma sur la fréquence de transfert conjugatif de *E. coli* HT-99 après un contact avec *E. coli* J-53R : a) 6 heures de croisement, b) 9 heures de croisement, c) 24 heures de croisement et d) 48 heures de croisement. Cible traitée solution saline à 0,9 %, volume 100 mL. Le plasma est généré à une tension de 6kV, des impulsions de 2,5µs, une fréquence de 20kHz et un débit He/0,2% O<sub>2</sub> de 2 L.min<sup>-1</sup>.

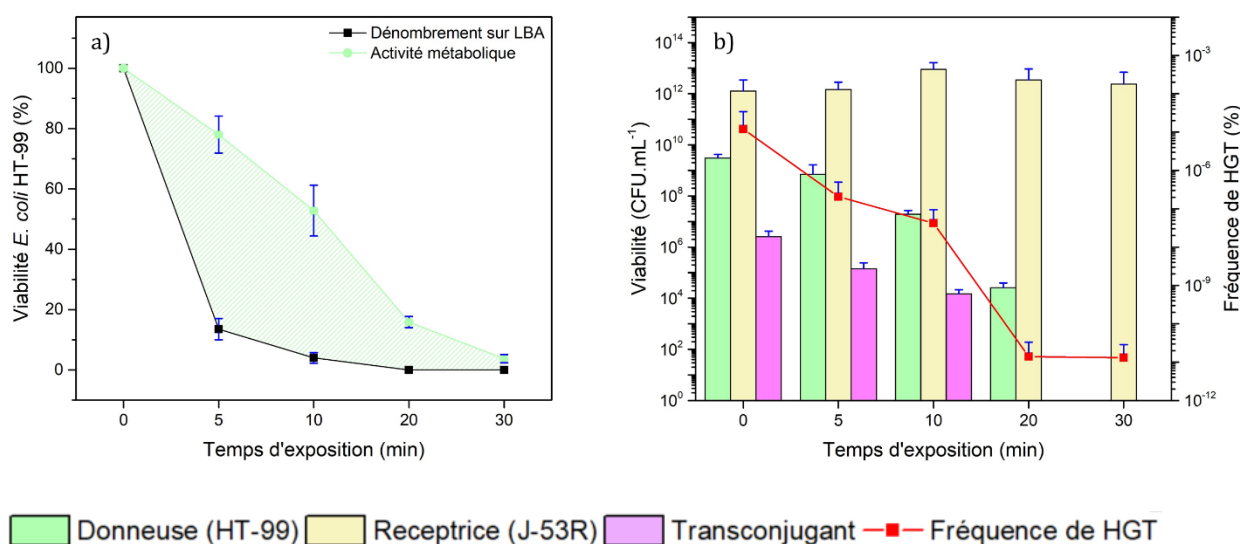
En outre, on observe également que le taux de cellules J-53R diminue de 1 log pour 30 minutes d'exposition pour les temps de croisement de 9, 24 et 48h. Cette diminution pourrait être rapportée à l'effet de cytotoxicité dû à la présence de ROS résiduelles dans la suspension (i.e l'eau activée par plasma). En effet, le croisement entre HT-99 et J-53R a été réalisé dans une solution avec un ratio 1:1 entre la solution exposée au plasma et le milieu LB contenant les cellules de J-53R. Nous supposons que pour 30 minutes, la suspension exposée au plasma a entraîné un état de stress chez J-53R et une perte de viabilité.

Hu Li et al. (2021) ont étudié l'effet du plasma sur le pouvoir conjugatif de la souche Bio-*E. coli* AR hébergeant un plasmide transférable (*Incl1*) contenant le *Tet<sub>G</sub>*, *Tet<sub>W</sub>*, *bla<sub>TEM-1</sub>* et *aac(3)-II*, codant pour des résistances à trois antibiotiques (gentamicine, tétracycline et amoxicilline). Les résultats ont démontré que le transfert conjugatif de *E. coli* AR a été inhibé à la suite du traitement par plasma. Par rapport à l'échantillon non traité, le nombre de transconjugant a été

significativement réduit de 67,2 % après 10 minutes d'exposition au plasma. Ces résultats montrent que le traitement au plasma pourrait inhiber le HGT des ARGs en réduisant le nombre de bactéries donneuses et la fréquence de transfert conjugatif.

### 2.3.Relation entre les bactéries VBNC et les mécanismes de HGT

L'étude de la viabilité de HT-99 a montré qu'après 5 minutes d'exposition au plasma 70% des cellules entrent à l'état VBNC, puis à 40% après 10 minutes d'exposition (Figure 51.a). En se basant sur les résultats du transfert conjugatif, pour les mêmes temps d'exposition, la fréquence de HGT de HT-99 diminue progressivement après 6 h et 9 h de croisement puis reste stable après 24 et 48 heures de croisement (Figure 51.b). Toutefois, la baisse de la population de VBNC s'est accompagnée par une inhibition du l'HGT. Ces observations montrent qu'à l'état VBNC les bactéries gardent la capacité de transfert conjugatif.



**Figure 51** Relation entre les VBNC et le transfert conjugatif de HT-99 : a) l'estimation de bactéries VBNC, b) fréquence de transfert conjugatif après 6h de contact entre HT-99 et J-53R. Cible traitée solution saline à 0,9 %, volume 100 mL. Le plasma est généré à une tension de 6kV, des impulsions de 2,5µs, une fréquence de 20kHz et un débit He/0,2% O<sub>2</sub> de 2 L.min<sup>-1</sup>.

Jusqu'à présent, il existe très peu d'études visant à déterminer si les bactéries VBNC favorisent ou inhibent le processus HGT. Bien qu'il n'y ait aucune preuve directe, certaines études semblent apporter des réponses indirectes. Arana et al. (1997) ont signalé que les cellules VBNC peuvent transférer et recevoir des plasmides par conjugaison, formant ainsi des cellules transconjugantes VBNC. De plus, de nombreuses études ont démontré le transfert conjugatif des bactéries VBNC après un traitement aux UVC. Par exemple, X. Chen et al. (2019) ont étudié l'effet de trois sources lumineuses différentes (lumière visible (VL), lumière solaire simulée (SS) et la

lumière ultraviolette (UVC)) sur le transfert conjugatif de *E. coli* DH5 $\alpha$ . Les résultats ont montré que les UVC peuvent induire un transfert conjugué même quand les bactéries sont à l'état VBNC. De même, une étude de McGrath et al. (2005) a mis en évidence que les UVC augmentent la fréquence de transfert du transposon conjugué de type IncJ chez les VBNC. Ces études montrent que l'induction de bactéries VBNC par les UV favorise les mécanismes de HGT. Cependant, nous suggérons que les paramètres physiques, chimiques et le temps d'exposition aux irradiations UV influencent ces résultats. Dans le cas de notre étude, nous avons pu montrer que les courts temps de traitement ont induit un passage des bactéries à l'état VBNC, mais ces dernières ont conservé leur capacité d'HGT. Toutefois, l'augmentation du temps d'exposition au plasma a induit le double effet d'inactiver les bactéries et d'inhiber les mécanismes de HGT.

## *Conclusion*

Dans ce chapitre, nous avons démontré que la présence de plasmides modifie le comportement des bactéries dans un processus de décontamination par plasma. Les cellules avec des plasmides étaient plus sensibles au traitement par plasma. De nombreuses études antérieures ont rapporté que les plasmides peuvent avoir des effets sur les phénotypes bactériens qui vont au-delà de la résistance aux antibiotiques, en modifiant l'expression des gènes du chromosome bactérien. Il existe deux voies par lesquelles la présence de plasmides pourrait affecter la capacité des bactéries à s'adapter dans leur environnement. Premièrement, en conférant aux bactéries des traits d'adaptation au stress qui leur permettent de survivre aux conditions de stress. Deuxièmement, en modifiant cette adaptation et en rendant les bactéries plus sensibles aux conditions de stress. Cet effet inverse a modifié le phénotype des cellules bactériennes de façon à augmenter leur sensibilité au plasma. Nous avons également démontré que la présence de plasmides affecte les caractéristiques de la membrane des bactéries. La translocation d'un ADN exogène dans le cytoplasme nécessite un état de compétence chez la bactérie, comme l'augmentation de la fluidité membranaire, un état qui en contrepartie permet la pénétration de davantage de ROS et ainsi une augmentation de la sensibilité au plasma. Nos résultats confirment l'hypothèse que les plasmides influencent le comportement des bactéries soumises à un plasma en les rendant plus sensibles. L'étude du transfert conjugatif a montré que le plasma réduit le nombre de cellules donneuses, et par conséquent diminue la fréquence de transfert conjugatif. De plus, nous avons déduit que le transfert de plasmide pouvait également se produire chez les bactéries VBNC, en formant des cellules transconjugantes VBNC. Néanmoins, d'autres recherches sont nécessaires pour vérifier cette hypothèse. Dans l'ensemble, le plasma peut être utilisé comme une alternative pour contrôler l'émergence des ARB et ARGs dans l'environnement aquatique.



## *Conclusion & Perspectives*

Le travail mené dans cette thèse a porté sur l'étude d'une source plasma multi-jets à la pression atmosphérique pour la réduction de la charge bactérienne et la dégradation des gènes de résistance aux antibiotiques dans les liquides. Trois axes de recherche ont guidé cette étude : l'effet du plasma sur les caractéristiques physico-chimiques des interactions plasma-liquide ; l'effet de la phase de croissance bactérienne sur l'efficacité de la décontamination ; et l'effet du plasma sur l'inactivation des ARB et l'inhibition des mécanismes de HGT.

## Chimie des interactions plasma-liquide

La première partie de ce travail a été consacrée à l'étude de la production des espèces réactives dans la phase de génération du plasma et de leur influence sur les caractéristiques physico-chimiques du liquide. La caractérisation optique de la décharge nous a permis d'identifier les principales espèces excitées produites dans le jet plasma ( $\text{OH}^*$ ,  $\text{N}_2^*$ ,  $\text{N}_2^+$ ,  $\text{He}^*$  et  $\text{O}^*$ ), associées aux bandes d'émissions moléculaires et aux raies d'émissions atomiques, avec une dominance des bandes d'émissions moléculaires. Nous avons également pu suivre l'évolution de ces espèces dans le jet plasma sur une longueur de 6 mm et avons remarqué deux profils d'intensité différents : une forte intensité des espèces atomiques de 0 à 2 mm puis une diminution progressive de 2 à 6 mm. À l'inverse, l'intensité des espèces moléculaires est faible à la sortie du jet puis augmente à 2 mm du jet. Les données optiques nous ont fourni des informations relatives à la température du gaz en se basant sur la température rotationnelle du second système positif de l'azote. Ainsi, la température de la décharge est proche de la température ambiante ( $375 \text{ K} \pm 100 \text{ K}$ ). Après avoir caractérisé le jet plasma, notamment lors de l'interaction avec une surface du liquide, nous nous sommes intéressés à l'évolution des concentrations d'espèces réactives à longue durée de vie générées dans le liquide après traitement par plasma. Les résultats ont montré une diminution progressive du pH du liquide traité. Les concentrations des espèces réactives à longue durée de vie telles que  $\text{H}_2\text{O}_2$ ,  $\text{NO}_2^-$  et  $\text{NO}_3^-$  augmentent avec le temps de traitement.

## Influence de la phase de croissance bactérienne sur la décontamination microbiologie des liquides par plasma

Dans cette étude, nous nous sommes intéressés à l'influence des caractéristiques bactériennes en lien avec leur phase de croissance sur l'efficacité de décontamination. Les bactéries étudiées sont issues des phases exponentielle et stationnaire de croissance. Après l'exposition au plasma, nous avons pu mettre en évidence des différences de comportement entre les cellules issues des deux phases de croissance. Concernant la viabilité, les bactéries de la phase exponentielle ont présenté plus de sensibilité au traitement par plasma que celles en phase stationnaire. De plus, l'étude des effets sous-létaux a montré qu'une partie des deux populations des bactéries subissaient des lésions sous-létales, et qu'elles étaient plus intenses pour les cellules en phase exponentielle. Ce constat est le même concernant l'activité métabolique. Elle diminue quel que soit la phase de croissance bactérienne mais est plus grande pour les bactéries en phase exponentielle. En se basant sur les résultats de la viabilité bactérienne et ceux de l'estimation de l'activité métabolique, nous avons pu constater que les bactéries de la phase exponentielle

passaient plus rapidement à l'état VBNC que celles de la phase stationnaire qui acceptent une exposition au plasma plus longue avant de passer dans cet état. Nos résultats ont permis de mettre en évidence l'influence des caractéristiques membranaires des bactéries des deux phases de croissance sur la perte d'intégrité de la membrane. Les bactéries de la phase exponentielle ayant une membrane fine ont été plus sensibles au plasma à l'instar de celles de la phase stationnaire. Ces résultats ont été confirmés par les valeurs de ROS intercellulaires. Les bactéries de la phase exponentielle ont montré des valeurs de ROS supérieures à celles en phase stationnaire. Pour finir, l'effet du plasma sur l'ADN génomique des bactéries a été évalué. Les résultats ont montré que le plasma provoque une dégradation de l'ADN dans les deux phases de croissance.

## Effets du plasma sur l'inactivation des bactéries résistantes aux antibiotiques et sur l'inhibition des mécanismes de transfert horizontal de gènes

Cette partie concerne l'influence de la présence de l'ADN plasmidique sur la sensibilité des bactéries au plasma. Qu'elles aient un plasmide ou non, le traitement plasma induit une réduction de la charge bactérienne. Par contre, le temps nécessaire pour obtenir une inactivation bactérienne de 7 log est plus court dans le cas des cellules avec plasmide. L'évaluation des effets sous-létaux a montré que seules les bactéries avec plasmide ont subi des lésions sous-létales, notamment pour les courts temps de traitement. La présence de plasmide entraîne donc une réduction du potentiel de croissance bactérienne en cas de présence d'un facteur de stress. Néanmoins, l'estimation de l'activité métabolique a montré des différences entre les bactéries avec et sans plasmide. En nous basant sur les résultats de la viabilité bactérienne et ceux de l'estimation de l'activité métabolique, nous avons pu constater que les bactéries avec plasmide passent rapidement à l'état VBNC alors que celles sans plasmide acceptent un temps d'exposition plus long au plasma avant de passer à cet état.

Ensuite, nous avons souhaité évaluer l'impact de la transformation bactérienne sur l'intégrité de la membrane après l'exposition au plasma. Il s'est avéré que les bactéries ayant subies une transformation bactérienne présentent une perte d'intégrité membranaire plus importante que celles n'en ayant pas subies. Cette perte a été confirmée par l'évaluation du taux de ROS intracellulaires où les valeurs étaient supérieures pour les bactéries transformées en comparaison à celles non transformées. Ces résultats confirment l'hypothèse que les mécanismes de transfert horizontal de gènes changent la sensibilité des bactéries au traitement par plasma.

En dernier lieu, nous avons évalué le potentiel du plasma pour l'inhibition des mécanismes de transfert horizontal des gènes. L'étude a été réalisée sur deux souches de bactéries ; une souche donneuse portant une résistance plasmidique et une souche réceptrice portant une résistance chromosomique. Tout d'abord, nos expériences ont montré que le plasma ne modifie pas la sensibilité des bactéries aux antibiotiques. L'étude du transfert conjugatif a montré que le plasma réduit le nombre de cellules donneuses et, par conséquent, diminue la fréquence de transfert conjugatif. De plus, nous avons montré que le transfert de plasmide pouvait également se produire avec les bactéries VBNC. Pour conclure, le plasma peut être utilisé comme une alternative pour la réduction de l'antibiorésistance dans l'environnement aquatique.

## Perspectives

Les résultats présentés dans ce mémoire démontrent la faisabilité de l'utilisation du procédé plasma pour la décontamination microbiologique des liquides. Habituellement, les études portant sur la décontamination par plasma se concentrent principalement sur sa capacité à réduire la charge bactérienne. Cependant, il est possible d'explorer d'autres aspects afin de mieux comprendre le comportement des bactéries face aux espèces réactives induites par le plasma. De nombreuses perspectives peuvent donc être envisagées pour compléter ce travail.

Une comparaison technique et une étude chimique des trois configurations de décharge plasma - jet à la surface du liquide, jet immergé dans le liquide et génération de bulles plasma dans le liquide - pourraient fournir davantage d'informations sur la formation des espèces réactives, notamment pour une application à grande échelle. L'évaluation d'autres gaz de décharge pourrait également fournir des informations sur les principales espèces réactives impliquées dans l'inactivation bactérienne.

Les caractéristiques cellulaires liées à la phase de croissance semblent être l'un des facteurs contribuant à la différence de sensibilité des bactéries au plasma. Une étude protéomique et transcriptomique serait intéressante pour identifier les voies métaboliques cellulaires impliquées dans cette différence. Par exemple, il serait possible d'examiner l'expression des gènes impliqués dans la réponse au stress oxydatif et quantifier les enzymes de stress oxydatif, telles que la SOD et la CAT.

Un des points forts de cette thèse réside dans l'étude de l'effet du plasma sur la dégradation des gènes de résistance aux antibiotiques. Dans un premier temps, il a été démontré que l'acquisition d'ADN plasmidique entraîne une augmentation de la sensibilité des bactéries au



traitement par plasma. Cette étude pourrait être continuée dans des conditions environnementales plus proches de la réalité, en particulier en utilisant des matrices de liquide plus complexes. Dans un autre contexte, il serait intéressant d'étudier l'effet du plasma sur l'ADN plasmidique intra et extracellulaire. Cela pourrait être réalisé en évaluant l'effet sur l'intégrité structurelle de l'ADN, sur la dégradation des amplicons codant pour la résistance aux antibiotiques et sur la capacité de l'ADN plasmidique à transférer la résistance à d'autres bactéries après exposition au plasma.

En ce qui concerne le potentiel du plasma pour inhiber les mécanismes de transfert horizontal des gènes de résistance aux antibiotiques, il a été démontré que le plasma peut réduire la fréquence du transfert horizontal des gènes en fonction du temps d'exposition. De plus, cet effet s'est avéré irréversible, même dans des conditions de croisement et de culture optimales. Toutefois, cette étude doit être confirmée en utilisant des bactéries provenant de l'environnement aquatique et présentant un risque pour la santé publique, ainsi qu'en utilisant des matrices de liquide correspondant aux conditions environnementales.

Enfin, une grande partie de la discussion a porté sur la transition des bactéries vers l'état de bactéries viables mais non cultivables (VBNC). Nos résultats ont montré que, d'une part, les bactéries VBNC conservent leurs mécanismes de transfert horizontal de gènes même après un traitement plasma de courte durée, et d'autre part, une exposition prolongée au plasma permet d'inactiver les cellules VBNC et donc d'inhiber les transferts horizontaux de gènes. Ce constat soulève des questions concernant les études de la littérature qui se concentrent sur les mécanismes de transfert horizontal des gènes. La plupart de ces études utilisent des bactéries viables, avec peu ou pas de recherche menée sur les bactéries VBNC. Il serait intéressant de multiplier ce type d'étude afin de mieux comprendre les transferts horizontaux de gènes, en tenant compte des différences de caractéristiques morphologiques et physiologiques entre les bactéries VBNC et les cellules normales.

En conclusion, une meilleure compréhension des mécanismes d'action du traitement par plasma, en mettant l'accent sur les réservoirs bactériens et les gènes de résistance aux antibiotiques, nécessiterait une approche interdisciplinaire combinant des connaissances en microbiologie et en physique des plasmas, ainsi qu'une exploration des applications environnementales et une analyse des contraintes liées au transfert de technologie.



## *Références Bibliographiques*

- Ager, K., Kimberly, David R. Latulippe, et Andrew L. Zydney. 2009. « Plasmid DNA Transmission through Charged Ultrafiltration Membranes ». *Journal of Membrane Science*, novembre, 123-28.
- Alexander, J., Bollmann, A., Seitz, W., et Schwartz, T. 2015. Microbiological characterization of aquatic microbiomes targeting taxonomical marker genes and antibiotic resistance genes of opportunistic bacteria. *The Science of the total environment*, 512-513, 316–325. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2015.01.046>.
- Alkawareek, M. Y., Gorman, S. P., Graham, W. G., et Gilmore, B. F. 2014. Potential cellular targets and antibacterial efficacy of atmospheric pressure non-thermal plasma. *International journal of antimicrobial agents*, 43(2), 154–160. <https://doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2013.08.022>.
- Alvear-Daza, J. J., García-Barco, A., Osorio-Vargas, P., Gutiérrez-Zapata, H. M., Sanabria, J., et Rengifo-Herrera, J. A. 2021. Resistance and induction of viable but non culturable states (VBNC) during inactivation of *E. coli* and *Klebsiella pneumoniae* by addition of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> to natural well water under simulated solar irradiation. *Water research*, 188, 116499. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2020.116499>.
- Amador, P. P., Fernandes, R. M., Prudêncio, M. C., Barreto, M. P., et Duarte, I. M. 2015. Antibiotic resistance in wastewater: occurrence and fate of Enterobacteriaceae producers of class A and class C  $\beta$ -lactamases. *Journal of environmental science and health. Part A, Toxic/hazardous substances & environmental engineering*, 50(1), 26–39. <https://doi.org/10.1080/10934529.2015.964602>.
- Arana, I., Pocino, M., Muela, A., Fernández-Astorga, A., et Barcina, I. 1997. Detection and enumeration of viable but non-culturable transconjugants of *Escherichia coli* during the survival of recipient cells in river water. *Journal of applied microbiology*, 83(3), 340–346. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2672.1997.00244.x>.
- Arkhangelsky, E., Yossi S., Barak H. Gadi R., et Vitaly G. 2011. « Kinetics and Mechanism of Plasmid DNA Penetration through Nanopores ». *Journal of Membrane Science* 371 (1-2): 45-51. <https://doi.org/10.1016/j.memsci.2011.01.014>.
- Attri, P., Kim, Y. H., Park, D. H., Park, J. H., Hong, Y. J., Uhm, H. S., Kim, K. N., Fridman, A., et Choi, E. H. 2015. Generation mechanism of hydroxyl radical species and its lifetime prediction during the plasma-initiated ultraviolet (UV) photolysis. *Scientific reports*, 5, 9332. <https://doi.org/10.1038/srep09332>.
- Bain, R., Cronk, R., Hossain, R., Bonjour, S., Onda, K., Wright, J., Yang, H., Slaymaker, T., Hunter, P., Prüss-Ustün, A., et Bartram, J. 2014. Global assessment of exposure to faecal contamination through drinking water based on a systematic review. *Tropical medicine & international health : TM & IH*, 19(8), 917–927.
- Balière, C., Rincé, A., Blanco, J., Dahbi, G., Harel, J., Vogeleeer, P., Giard, J.C., Mariani-Kurkdjian, P. et Gourmelon, M. 2015. Prevalence and Characterization of Shiga Toxin-Producing and Enteropathogenic *Escherichia coli* in Shellfish-Harvesting Areas and Their Watersheds. *Front Microbiol.* doi: 10.3389/fmicb.2015.01356. PMID: 26648928; PMCID: PMC4664706.
- Baltrus D. A. 2013. Exploring the costs of horizontal gene transfer. *Trends in ecology & evolution*, 28(8), 489–495. <https://doi.org/10.1016/j.tree.2013.04.002>.
- Barjasteh, A., Dehghani, Z., Lamichhane, P., Kaushik, N., Choi, E. H., et Kaushik, N. K. 2021. Recent Progress in Applications of Non-Thermal Plasma for Water Purification, Bio-Sterilization, and Decontamination. *Applied Sciences*, 11(8), 3372. <https://doi.org/10.3390/app11083372>.
- Bergmann, M.E. Henry, et Johanna Rollin. 2007. « Product and By-Product Formation in Laboratory Studies on Disinfection Electrolysis of Water Using Boron-Doped Diamond Anodes ». *Catalysis Today* 124 (3-4): 198-203. <https://doi.org/10.1016/j.cattod.2007.03.038>.

- Berthe, T., M. Ratajczak, O. Clermont, E. Denamur, et F. Petit. 2013. « Evidence for Coexistence of Distinct Escherichia Coli Populations in Various Aquatic Environments and Their Survival in Estuary Water ». *Applied and Environmental Microbiology* 79 (15): 4684-93. <https://doi.org/10.1128/AEM.00698-13>.
- Bertrand, J.C., Caumette, P., Lebaron, P., Matheron, R., Normand, P., et Sime-Ngando, T., éd. 2015. *Environmental Microbiology: Fundamentals and Applications: Microbial Ecology*. Dordrecht: Springer Netherlands. <https://doi.org/10.1007/978-94-017-9118-2>.
- Billane, K., Harrison, E., Cameron, D., et Brockhurst, M. A. 2022. Why do plasmids manipulate the expression of bacterial phenotypes?. *Philosophical transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological sciences*, 377(1842), 20200461. <https://doi.org/10.1098/rstb.2020.0461>.
- Biswal, B. K., Mazza, A., Masson, L., Gehr, R., et Frigon, D. 2014. Impact of wastewater treatment processes on antimicrobial resistance genes and their co-occurrence with virulence genes in Escherichia coli. *Water research*, 50, 245–253. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2013.11.047>.
- Bodor, A., Bounedjoum, N., Vincze, G.E., Kis, A.E., Laczi, K., Bende, G., Szilagyi, A., Kovacs, T., Perei, K. et Rakhely, G. 2020. Challenges of unculturable bacteria: environmental perspectives. *Rev Environ Sci Biotechnol* 19, 1–22. <https://doi.org/10.1007/s11157-020-09522-4>.
- Bruggeman, P.J., Kushner, M.J., Locke, B.R., Gardeniers, J.G.E., Graham, W.G., Graves, D.B., Hofman-Caris, R.C.H.M., Maric, D., Reid, J.P., Ceriani, E., Fernandez Rivas, D., Foster, J.E., Garrick, S.C., Gorbanev, Y., Hamaguchi, S., Iza, F., Jablonowski, H., Klimova, E., Kolb, J., Krcma, F., Lukes, P., Machala, Z., Marinov, I., Mariotti, D., Mededovic Thagard, S., Minakata, D., Neyts, E.C., Pawlat, J., Petrovic, Z. Lj, Pflieger, R., Reuter, S., Schram, D.C., Schröter, S., Shiraiwa, M., Tarabová, B., Tsai, P.A., Verlet, J.R.R., von Woedtke, T., Wilson, K.R., Yasui, K., Zvereva, G. 2016., "Plasma-liquid interactions: a review and roadmap", *Plasma Sources Science and Technology*. IOP Publishing. <https://doi.org/10.1088/0963-0252/25/5/053002>.
- Bruggeman, P.J., et Christophe, L. 2009. « Non-Thermal Plasmas in and in Contact with Liquids ». *Journal of Physics D: Applied Physics* 42 (5): 053001. <https://doi.org/10.1088/0022-3727/42/5/053001>.
- Buckner, M. M. C., Saw, H. T. H., Osagie, R. N., McNally, A., Ricci, V., Wand, M. E., Woodford, N., Ivens, A., Webber, M. A., & Piddock, L. J. V. (2018). Clinically Relevant Plasmid-Host Interactions Indicate that Transcriptional and Not Genomic Modifications Ameliorate Fitness Costs of Klebsiella pneumoniae Carbapenemase-Carrying Plasmids. *mBio*, 9(2), e02303-17. <https://doi.org/10.1128/mBio.02303-17>.
- Reygaert W. C. 2018. An overview of the antimicrobial resistance mechanisms of bacteria. *AIMS microbiology*, 4(3), 482–501. <https://doi.org/10.3934/microbiol.2018.3.482>.
- Chandran, A., et Mazumder, A. 2015. Pathogenic potential, genetic diversity, and population structure of Escherichia coli strains isolated from a forest-dominated watershed (Comox Lake) in British Columbia, Canada. *Applied and environmental microbiology*, 81(5), 1788–1798. <https://doi.org/10.1128/AEM.03738-14>.
- Chaplin, B.P., David K.H., et James F. 2013. « Understanding Anodic Wear at Boron Doped Diamond Film Electrodes ». *Electrochimica Acta* 89 (février): 122-31. <https://doi.org/10.1016/j.electacta.2012.10.166>.
- Chen, X., Yin, H., Li, G., Wang, W., Wong, P. K., Zhao, H., & An, T. (2019). Antibiotic-resistance gene transfer in antibiotic-resistance bacteria under different light irradiation: Implications from oxidative stress and gene expression. *Water research*, 149, 282–291. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2018.11.019>.
- Chen, Z., Liu, D., Chen, C., Xu, D., Liu, Z., Xia, W., Rong, M., & Kong, M.G. 2018. « Analysis of the production mechanism of H2O2 in water treated by helium DC plasma jets ». *Journal of Physics D: Applied Physics* 51 (32). <https://doi.org/10.1088/1361-6463/aad0eb>.
- Cherchi, C., et Gu, A. Z. 2011. Effect of bacterial growth stage on resistance to chlorine disinfection. *Water science and technology : a journal of the International Association on Water Pollution Research*, 64(1), 7–13. <https://doi.org/10.2166/wst.2011.536>.

- Cho, B. K., Kim, D., Knight, E. M., Zengler, K., et Palsson, B. O. 2014. Genome-scale reconstruction of the sigma factor network in *Escherichia coli*: topology and functional states. *BMC biology*, 12, 4. <https://doi.org/10.1186/1741-7007-12-4>.
- Chow, L., Waldron, L., et Gillings, M. R. 2015. Potential impacts of aquatic pollutants: sub-clinical antibiotic concentrations induce genome changes and promote antibiotic resistance. *Frontiers in microbiology*, 6, 803. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2015.00803>.
- Chung, H.J., W. Bang, et M.A. Drake. 2006. « Stress Response of *Escherichia coli* ». *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety* 5 (3): 52-64. <https://doi.org/10.1111/j.1541-4337.2006.00002.x>.
- Clasen, T., Pruss-Ustun, A., Mathers, C. D., Cumming, O., Cairncross, S., et Colford, J. M., Jr 2014. Estimating the impact of unsafe water, sanitation and hygiene on the global burden of disease: evolving and alternative methods. *Tropical medicine & international health : TM & IH*, 19(8), 884–893. <https://doi.org/10.1111/tmi.12330>.
- Costanzo, A., et Ades, S. E. 2006. Growth phase-dependent regulation of the extracytoplasmic stress factor, sigmaE, by guanosine 3',5'-bispyrophosphate (ppGpp). *Journal of bacteriology*, 188(13), 4627–4634. <https://doi.org/10.1128/JB.01981-05>.
- Dodd, Michael C. 2012. « Potential Impacts of Disinfection Processes on Elimination and Deactivation of Antibiotic Resistance Genes during Water and Wastewater Treatment ». *Journal of Environmental Monitoring* 14 (7): 1754. <https://doi.org/10.1039/c2em00006g>.
- Dolezalova, E., et Lukes, P. 2015. Membrane damage and active but nonculturable state in liquid cultures of *Escherichia coli* treated with an atmospheric pressure plasma jet. *Bioelectrochemistry (Amsterdam, Netherlands)*, 103, 7–14. <https://doi.org/10.1016/j.bioelechem.2014.08.018>.
- Dong, K., Pan, H., Yang, D., Rao, L., Zhao, L., Wang, Y., et Liao, X. 2020. Induction, detection, formation, and resuscitation of viable but non-culturable state microorganisms. *Comprehensive reviews in food science and food safety*, 19(1), 149–183. <https://doi.org/10.1111/1541-4337.12513>.
- Eisenberg, George M. 1943. « Colorimetric Determination of Hydrogen Peroxide ». *Industrial and Engineering Chemistry - Analytical Edition* 15 (5): 327-28. <https://doi.org/10.1021/i560117a011>.
- Eskova, A. I., Andryukov, B. G., Yakovlev, A. A., Kim, A. V., Ponomareva, A. L., et Obuhova, V. S. 2022. Horizontal Transfer of Virulence Factors by Pathogenic Enterobacteria to Marine Saprotrophic Bacteria during Co-Cultivation in Biofilm. *Biotech (Basel (Switzerland))*, 11(2), 17. <https://doi.org/10.3390/biotech11020017>.
- Espina, L., García-Gonzalo, D., et Pagán, R. 2016. Detection of Thermal Sublethal Injury in *Escherichia coli* via the Selective Medium Plating Technique: Mechanisms and Improvements. *Frontiers in microbiology*, 7, 1376. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.01376>.
- Ezeuko, A.S., Mike O.O., Omobola O.O., et Anthony I.O. 2021. « Technological Advancement for Eliminating Antibiotic Resistance Genes from Wastewater: A Review of Their Mechanisms and Progress ». *Journal of Environmental Chemical Engineering* 9 (5): 106183. <https://doi.org/10.1016/j.jece.2021.106183>.
- Farmer, J.J., M.K. Farmer, et Barry Holmes. 2010a. The Enterobacteriaceae: General Characteristics. In *Topley & Wilson's Microbiology and Microbial Infections*, édité par Brian W.J. Mahy, Volker ter Meulen, S. Peter Borriello, Patrick R. Murray, Guido Funke, Stefan H.E. Kaufmann, Michael W. Steward, et al., taw0051. Chichester, UK: John Wiley & Sons, Ltd. <https://doi.org/10.1002/9780470688618.taw0051>.
- Fu, Y., Jia, Y., Fan, J., Yu, C., Yu, C., et Shen, C. 2020. Induction of *Escherichia coli* O157:H7 into a viable but non-culturable state by high temperature and its resuscitation. *Environmental microbiology reports*, 12(5), 568–577. <https://doi.org/10.1111/1758-2229.12877>.
- Gągól, M., Andrzej P., et Grzegorz B. 2018. « Wastewater Treatment by Means of Advanced Oxidation Processes Based on Cavitation – A Review ». *Chemical Engineering Journal* 338 (avril): 599-627. <https://doi.org/10.1016/j.cej.2018.01.049>.

- Gallert, C., Fund, K., et Winter, J. 2005. Antibiotic resistance of bacteria in raw and biologically treated sewage and in groundwater below leaking sewers. *Applied microbiology and biotechnology*, 69(1), 106–112. <https://doi.org/10.1007/s00253-005-0033-7>.
- Gao, S., Gillian D.L., Muthupandian A., et Yacine H. 2014. « Inactivation of Microorganisms by Low-Frequency High-Power Ultrasound: 1. Effect of Growth Phase and Capsule Properties of the Bacteria ». *Ultrasonics Sonochemistry* 21 (1): 446-53. <https://doi.org/10.1016/j.ultsonch.2013.06.006>.
- Gillings, M. R., Gaze, W. H., Pruden, A., Smalla, K., Tiedje, J. M., et Zhu, Y. G. 2015. Using the class 1 integron-integrase gene as a proxy for anthropogenic pollution. *The ISME journal*, 9(6), 1269–1279. <https://doi.org/10.1038/ismej.2014.226>.
- Gohrbandt, M., Lipski, A., Grimshaw, J. W., Buttress, J. A., Baig, Z., Herkenhoff, B., Walter, S., Kurre, R., Deckers-Hebestreit, G., et Strahl, H. 2022. Low membrane fluidity triggers lipid phase separation and protein segregation in living bacteria. *The EMBO journal*, 41(5), e109800. <https://doi.org/10.15252/embj.2021109800>.
- Gorrasi, S., Marcella, P., Andrea, F., Alejandro, G.M., Jesus, G.L., Barbara, M.P. et Massimiliano, F. 2021. « Persistence of Enterobacteriaceae Drawn into a Marine Saltern (Saline Di Tarquinia, Italy) from the Adjacent Coastal Zone ». *Water* 13 (11): 1443. <https://doi.org/10.3390/w13111443>.
- Guo, M. T., Yuan, Q. B., et Yang, J. 2013. Microbial selectivity of UV treatment on antibiotic-resistant heterotrophic bacteria in secondary effluents of a municipal wastewater treatment plant. *Water research*, 47(16), 6388–6394. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2013.08.012>.
- Hage, M., Khelissa, S., Akoum, H., Chihib, N. E., et Jama, C. 2022. Cold plasma surface treatments to prevent biofilm formation in food industries and medical sectors. *Applied microbiology and biotechnology*, 106(1), 81–100. <https://doi.org/10.1007/s00253-021-11715-y>.
- Haldar, K., Kujawa-Roeleveld, K., Hofstra, N., Datta, D. K., et Rijnaarts, H. 2022. Microbial contamination in surface water and potential health risks for peri-urban farmers of the Bengal delta. *International journal of hygiene and environmental health*, 244, 114002. <https://doi.org/10.1016/j.ijheh.2022.114002>.
- Han, L., Patil, S., Boehm, D., Milosavljević, V., Cullen, P. J., et Bourke, P. 2015. Mechanisms of Inactivation by High-Voltage Atmospheric Cold Plasma Differ for *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus*. *Applied and environmental microbiology*, 82(2), 450–458. <https://doi.org/10.1128/AEM.02660-15>.
- Haymaker, J., Sharma, M., Parveen, S., Hashem, F., May, E. B., Handy, E. T., White, C., East, C., Bradshaw, R., Micallef, S. A., Callahan, M. T., Allard, S., Anderson, B., Craighead, S., Gartley, S., Vanore, A., Kniel, K. E., Solaiman, S., Bui, A., Murray, R., ... Sapkota, A. R. 2019. Prevalence of Shiga-toxigenic and atypical enteropathogenic *Escherichia coli* in untreated surface water and reclaimed water in the Mid-Atlantic U.S. *Environmental research*, 172, 630–636. <https://doi.org/10.1016/j.envres.2019.02.019>.
- Headd, B., et Bradford, S. A. 2018. Physicochemical Factors That Favor Conjugation of an Antibiotic Resistant Plasmid in Non-growing Bacterial Cultures in the Absence and Presence of Antibiotics. *Frontiers in microbiology*, 9, 2122. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.02122>.
- Hensel, K., Kučerová, K., Tarabová, B., Janda, M., Machala, Z., Sano, K., Mihai, C. T., Ciorpac, M., Gorgan, L. D., Jijie, R., Pohoata, V., et Topala, I. 2015. Effects of air transient spark discharge and helium plasma jet on water, bacteria, cells, and biomolecules. *Biointerphases*, 10(2), 029515. <https://doi.org/10.1116/1.4919559>.
- Hosseinzadeh Colagar, A., Memariani, H., Sohbatzadeh, F., et Valinataj Omran, A. 2013. Nonthermal atmospheric argon plasma jet effects on *Escherichia coli* biomacromolecules. *Applied biochemistry and biotechnology*, 171(7), 1617–1629. <https://doi.org/10.1007/s12010-013-0430-9>.
- Hou, Y.M., Xiao, Y.D., Hong, Y., Shuang, L., Chun, S.R., Dai Jia, Z., et Zhi, L.Xiu. 2008. Disintegration of Biomacromolecules by Dielectric Barrier Discharge Plasma in Helium at Atmospheric Pressure. *IEEE Transactions on Plasma Science* 36 (4): 1633-37. <https://doi.org/10.1109/TPS.2008.927630>.

- Ikawa, S., Katsuhisa K., et Satoshi H. 2010. Effects of PH on Bacterial Inactivation in Aqueous Solutions Due to Low-Temperature Atmospheric Pressure Plasma Application: Effects of PH on Bacterial Inactivation in Aqueous Solutions .... *Plasma Processes and Polymers* 7 (1): 33-42. <https://doi.org/10.1002/ppap.200900090>.
- Imlay, J. A., et Fridovich, I. 1991. Assay of metabolic superoxide production in *Escherichia coli*. *The Journal of biological chemistry*, 266(11), 6957–6965.
- Imlay, J. A. 2009. Oxidative Stress. Édité par James M. Schlauch. *EcoSal Plus* 3 (2): ecosalplus.5.4.4. <https://doi.org/10.1128/ecosalplus.5.4.4>.
- Imlay J. A. 2013. The molecular mechanisms and physiological consequences of oxidative stress: lessons from a model bacterium. *Nature reviews. Microbiology*, 11(7), 443–454. <https://doi.org/10.1038/nrmicro3032>.
- Imlay J. A. 2015. Transcription Factors That Defend Bacteria Against Reactive Oxygen Species. *Annual Review of Microbiology* 69 (1): 93-108. <https://doi.org/10.1146/annurev-micro-091014-104322>.
- Invernizzi, Laurent. 2019. Développement, caractérisation et optimisation d'une source plasma pour le traitement de liquides.
- Jaishankar, J., et Srivastava, P. 2017. Molecular Basis of Stationary Phase Survival and Applications. *Frontiers in microbiology*, 8, 2000. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.02000>.
- Janda, J. M., et Abbott, S. L. 2021. The Changing Face of the Family Enterobacteriaceae (Order: "Enterobacterales"): New Members, Taxonomic Issues, Geographic Expansion, and New Diseases and Disease Syndromes. *Clinical microbiology reviews*, 34(2), e00174-20. <https://doi.org/10.1128/CMR.00174-20>.
- Jiang, B., Jingtang, Z., Shi, Q., Mingbo, W., Qinhui, Z., Zifeng, Y., et Qingzhong X. 2014. Review on Electrical Discharge Plasma Technology for Wastewater Remediation. *Chemical Engineering Journal* 236 (janvier): 348-68. <https://doi.org/10.1016/j.cej.2013.09.090>.
- Jiang, J., Zhenyu, T., Chunhong, S., Jie, P., Guangsheng, P., Yadi, L., Xinxian, C., et Xiaolong, W. 2016. A New Study on the Penetration of Reactive Species in Their Mass Transfer Processes in Water by Increasing the Electron Energy in Plasmas. *Phys. Plasmas*, 11.
- Jin, Y., Gan, G., Yu, X., Wu, D., Zhang, L., Yang, N., Hu, J., Liu, Z., Zhang, L., Hong, H., Yan, X., Liang, Y., Ding, L., et Pan, Y. 2017. Isolation of Viable but Non-culturable Bacteria from Printing and Dyeing Wastewater Bioreactor Based on Resuscitation Promoting Factor. *Current microbiology*, 74(7), 787–797. <https://doi.org/10.1007/s00284-017-1240-z>.
- Joshi, S. G., Cooper, M., Yost, A., Paff, M., Ercan, U. K., Fridman, G., Friedman, G., Fridman, A., et Brooks, A. D. 2011. Nonthermal dielectric-barrier discharge plasma-induced inactivation involves oxidative DNA damage and membrane lipid peroxidation in *Escherichia coli*. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 55(3), 1053–1062. <https://doi.org/10.1128/AAC.01002-10>.
- Kaper, J. B., Nataro, J. P., et Mobley, H. L. 2004. Pathogenic *Escherichia coli*. *Nature reviews. Microbiology*, 2(2), 123–140. <https://doi.org/10.1038/nrmicro818>.
- Khan F.M. et Gupta R. 2020. *Escherichia coli* (E. coli) as an Indicator of Fecal Contamination in Groundwater: A Review. In: Jeon HY. (eds) *Sustainable Development of Water and Environment. ICSDWE 2020. Environmental Science and Engineering*. Springer, Cham. <https://doi.org/10.20944/preprints201910.0081.v1>.
- Kim, S., et Kim, C. H. 2021. Applications of Plasma-Activated Liquid in the Medical Field. *Biomedicines*, 9(11), 1700. <https://doi.org/10.3390/biomedicines9111700>.
- Kohanski, M. A., DePristo, M. A., et Collins, J. J. 2010. Sublethal antibiotic treatment leads to multidrug resistance via radical-induced mutagenesis. *Molecular cell*, 37(3), 311–320. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2010.01.003>.
- Kumar, A., Nikola, Š., Wolfgang, G. et Nevena, P. 2021. Cold Atmospheric Plasma Technology for Removal of Organic Micropollutants from Wastewater—a Review. *The European Physical Journal D* 75 (11): 283. <https://doi.org/10.1140/epjd/s10053-021-00283-5>.
- Lackmann, J. W., et Bandow, J. E. 2014. Inactivation of microbes and macromolecules by atmospheric-pressure plasma jets. *Applied microbiology and biotechnology*, 98(14), 6205–6213. <https://doi.org/10.1007/s00253-014-5781-9>.



- Lambert, R. J., et Pearson, J. 2000. Susceptibility testing: accurate and reproducible minimum inhibitory concentration (MIC) and non-inhibitory concentration (NIC) values. *Journal of applied microbiology*, 88(5), 784–790. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2672.2000.01017.x>.
- Lang, K. S., et Johnson, T. J. 2015. Transcriptome modulations due to A/C2 plasmid acquisition. *Plasmid*, 80, 83–89. <https://doi.org/10.1016/j.plasmid.2015.05.005>.
- Laux, C.O., Spence, T.G., Kruger, C.H., et Zare, R.N. 2003. Optical Diagnostics of Atmospheric Pressure Air Plasmas. *Plasma Sources Science and Technology* 12 (2): 125-38. <https://doi.org/10.1088/0963-0252/12/2/301>.
- Lee, O. M., Kim, H. Y., Park, W., Kim, T. H., et Yu, S. 2015. A comparative study of disinfection efficiency and regrowth control of microorganism in secondary wastewater effluent using UV, ozone, and ionizing irradiation process. *Journal of hazardous materials*, 295, 201–208. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2015.04.016>.
- Lemonnier, M., Levin, B. R., Romeo, T., Garner, K., Baquero, M. R., Mercante, J., Lemichez, E., Baquero, F., et Blázquez, J. 2008. The evolution of contact-dependent inhibition in non-growing populations of *Escherichia coli*. *Proceedings. Biological sciences*, 275(1630), 3–10. <https://doi.org/10.1098/rspb.2007.1234>.
- Li, H. B., Hou, A. M., Chen, T. J., Yang, D., Chen, Z. S., Shen, Z. Q., Qiu, Z. G., Yin, J., Yang, Z. W., Shi, D. Y., Wang, H. R., Li, J. W., et Jin, M. 2021. Decreased Antibiotic Susceptibility in *Pseudomonas aeruginosa* Surviving UV Irradiation. *Frontiers in microbiology*, 12, 604245. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2021.604245>.
- Li, H., Song, R., Wang, Y., Zhong, R., Zhang, Y., Zhou, J., Wang, T., Jia, H., et Zhu, L. 2021. Inhibited conjugative transfer of antibiotic resistance genes in antibiotic resistant bacteria by surface plasma. *Water research*, 204, 117630. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2021.117630>.
- Liao, X., Cullen, P. J., Liu, D., Muhammad, A. I., Chen, S., Ye, X., Wang, J., et Ding, T. 2018. Combating *Staphylococcus aureus* and its methicillin resistance gene (*mecA*) with cold plasma. *The Science of the total environment*, 645, 1287–1295. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2018.07.190>.
- Liao, X., Liu, D., Chen, S., Ye, X., et Ding, T. 2021. Degradation of antibiotic resistance contaminants in wastewater by atmospheric cold plasma: kinetics and mechanisms. *Environmental technology*, 42(1), 58–71. <https://doi.org/10.1080/09593330.2019.1620866>.
- Liao, X., Liu, D., Xiang, Q., Ahn, J., Chen, S., Ye, X. et Ding, T. 2017. Inactivation Mechanisms of Non-Thermal Plasma on Microbes: A Review. *Food Control* 75 (mai): 83-91. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2016.12.021>.
- Liao, X., Muhammad, A. I., Chen, S., Hu, Y., Ye, X., Liu, D., et Ding, T. 2019. Bacterial spore inactivation induced by cold plasma. *Critical reviews in food science and nutrition*, 59(16), 2562–2572. <https://doi.org/10.1080/10408398.2018.1460797>.
- Liao, X., Xiang, Q., Liu, D., Chen, S., Ye, X., et Ding, T. 2017. Lethal and Sublethal Effect of a Dielectric Barrier Discharge Atmospheric Cold Plasma on *Staphylococcus aureus*. *Journal of food protection*, 80(6), 928–932. <https://doi.org/10.4315/0362-028X.JFP-16-499>.
- López, M., Calvo, T., Prieto, M., Múgica-Vidal, R., Muro-Fraguas, I., Alba-Elías, F., et Alvarez-Ordóñez, A. 2019. A Review on Non-thermal Atmospheric Plasma for Food Preservation: Mode of Action, Determinants of Effectiveness, and Applications. *Frontiers in microbiology*, 10, 622. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.00622>.
- Lu, J., Wang, Y., Jin, M., Yuan, Z., Bond, P., et Guo, J. 2020. Both silver ions and silver nanoparticles facilitate the horizontal transfer of plasmid-mediated antibiotic resistance genes. *Water research*, 169, 115229. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2019.115229>.
- Lu, J., Wang, Y., Li, J., Mao, L., Nguyen, S. H., Duarte, T., Coin, L., Bond, P., Yuan, Z., et Guo, J. 2018. Triclosan at environmentally relevant concentrations promotes horizontal transfer of multidrug resistance genes within and across bacterial genera. *Environment international*, 121(Pt 2), 1217–1226. <https://doi.org/10.1016/j.envint.2018.10.040>.

- Lu, X., Laroussi, M., et Puech, V. 2012. On Atmospheric-Pressure Non-Equilibrium Plasma Jets and Plasma Bullets. *Plasma Sources Science and Technology* 21 (3): 034005. <https://doi.org/10.1088/0963-0252/21/3/034005>.
- Łuczkiwicz, A., Jankowska, K., Fudala-Książek, S., et Olańczuk-Neyman, K. 2010. Antimicrobial resistance of fecal indicators in municipal wastewater treatment plant. *Water research*, 44(17), 5089–5097. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2010.08.007>.
- Lukes, P., Dolezalova, E., Sisrova, I. et Clupek, M. 2014. Aqueous-phase chemistry and bactericidal effects from an air discharge plasma in contact with water: Evidence for the formation of peroxyxynitrite through a pseudo-second-order post-discharge reaction of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> and HNO<sub>2</sub>. *Plasma Sources Science and Technology* 23 (1). <https://doi.org/10.1088/0963-0252/23/1/015019>.
- Lushchak V. I. 2001. Oxidative stress and mechanisms of protection against it in bacteria. *Biochemistry. Biokhimiia*, 66(5), 476–489. <https://doi.org/10.1023/a:1010294415625>.
- Lv, X., et Cheng, J. H. 2022. Evaluation of the Effects of Cold Plasma on Cell Membrane Lipids and Oxidative Injury of *Salmonella typhimurium*. *Molecules (Basel, Switzerland)*, 27(3), 640. <https://doi.org/10.3390/molecules27030640>.
- Ma, R., Wang, G., Tian, Y., Wang, K., Zhang, J., et Fang, J. 2015. Non-thermal plasma-activated water inactivation of food-borne pathogen on fresh produce. *Journal of hazardous materials*, 300, 643–651. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2015.07.061>.
- Magureanu, M., Bilea, F., Bradu, C., et Hong, D. 2021) A review on non-thermal plasma treatment of water contaminated with antibiotics. *Journal of hazardous materials*, 417, 125481. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2021.125481>.
- Mahamuni, N. N., et Adewuyi, Y. G. 2010. Advanced oxidation processes (AOPs) involving ultrasound for waste water treatment: a review with emphasis on cost estimation. *Ultrasonics sonochemistry*, 17(6), 990–1003. <https://doi.org/10.1016/j.ultsonch.2009.09.005>.
- Maho, T., Binois, R., Brulé-Morabito, F., Demasure, M., Douat, C., Dozias, S., Escot Bocanegra, P., Goard, I., Hocqueloux, L., Le Helloco, C., Orel, I., Pouvesle, J.-M., Prazuck, T., Stancampiano, A., Tocaben, C., et Robert, E. 2021. Anti-Bacterial Action of Plasma Multi-Jets in the Context of Chronic Wound Healing. *Applied Sciences*, 11(20), 9598. <https://doi.org/10.3390/app11209598>.
- Maier, Raina M., Ian L. Pepper, et Charles P. Gerba, éd. 2009. *Environmental Microbiology*. 2nd ed. Amsterdam ; Boston: Elsevier/Academic Press.
- Mañas, P., et Mackey, B. M. 2004. Morphological and physiological changes induced by high hydrostatic pressure in exponential- and stationary-phase cells of *Escherichia coli*: relationship with cell death. *Applied and environmental microbiology*, 70(3), 1545–1554. <https://doi.org/10.1128/AEM.70.3.1545-1554.2004>.
- Marchant, M., Vinué, L., Torres, C., et Moreno, M. A. 2013. Change of integrons over time in *Escherichia coli* isolates recovered from healthy pigs and chickens. *Veterinary microbiology*, 163(1-2), 124–132. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2012.12.011>.
- McGrath, B. M., O'Halloran, J. A., et Pembroke, J. T. 2005. Pre-exposure to UV irradiation increases the transfer frequency of the *IncJ* conjugative transposon-like elements R391, R392, R705, R706, R997 and pMERPH and is *recA*<sup>+</sup> dependent. *FEMS microbiology letters*, 243(2), 461–465. <https://doi.org/10.1016/j.femsle.2005.01.013>.
- Mengin-Lecreulx, D., et J van Heijenoort. 1985. « Effect of Growth Conditions on Peptidoglycan Content and Cytoplasmic Steps of Its Biosynthesis in *Escherichia Coli* ». *Journal of Bacteriology* 163 (1): 208-12. <https://doi.org/10.1128/jb.163.1.208-212.1985>.
- Miklos, D. B., Remy, C., Jekel, M., Linden, K. G., Drewes, J. E., et Hübner, U. 2018. Evaluation of advanced oxidation processes for water and wastewater treatment - A critical review. *Water research*, 139, 118–131. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2018.03.042>.
- Mishra, S., et Imlay, J. 2012. Why do bacteria use so many enzymes to scavenge hydrogen peroxide?. *Archives of biochemistry and biophysics*, 525(2), 145–160. <https://doi.org/10.1016/j.abb.2012.04.014>.

- Misra, N. N., Oliver Schlüter, et Patrick J. Cullen. 2016. *Cold Plasma in Food and Agriculture: Fundamentals and Applications*. London, United Kingdom: Academic Press is an imprint of Elsevier.
- Mikoyan, G., Karapetyan, L., Vassilian, A., Trchounian, A., & Trchounian, K. (2020). External succinate and potassium ions influence Dcu dependent FOF1-ATPase activity and H<sup>+</sup> flux of *Escherichia coli* at different pHs. *Journal of bioenergetics and biomembranes*, 52(5), 377–382. <https://doi.org/10.1007/s10863-020-09847-3>.
- Mosmann T. 1983. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *Journal of immunological methods*, 65(1-2), 55–63. [https://doi.org/10.1016/0022-1759\(83\)90303-4](https://doi.org/10.1016/0022-1759(83)90303-4).
- Nair, S., et Finkel, S. E. 2004. Dps protects cells against multiple stresses during stationary phase. *Journal of bacteriology*, 186(13), 4192–4198. <https://doi.org/10.1128/JB.186.13.4192-4198.2004>.
- Navarro Llorens, J. M., Tormo, A., et Martínez-García, E. 2010. Stationary phase in gram-negative bacteria. *FEMS microbiology reviews*, 34(4), 476–495. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6976.2010.00213.x>.
- Nawrocki, J., et Barbara K.H. 2010. The Efficiency and Mechanisms of Catalytic Ozonation. *Applied Catalysis B: Environmental* 99 (1-2): 27-42. <https://doi.org/10.1016/j.apcatb.2010.06.033>.
- Needham, B. D., et Trent, M. S. 2013. Fortifying the barrier: the impact of lipid A remodelling on bacterial pathogenesis. *Nature reviews. Microbiology*, 11(7), 467–481. <https://doi.org/10.1038/nrmicro3047>.
- Neudorf, K. D., Huang, Y. N., Ragush, C. M., Yost, C. K., Jamieson, R. C., et Truelstrup Hansen, L. 2017. Antibiotic resistance genes in municipal wastewater treatment systems and receiving waters in Arctic Canada. *The Science of the total environment*, 598, 1085–1094. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2017.04.151>.
- Nguyen, A. Q., Vu, H. P., Nguyen, L. N., Wang, Q., Djordjevic, S. P., Donner, E., Yin, H., et Nghiem, L. D. 2021. Monitoring antibiotic resistance genes in wastewater treatment: Current strategies and future challenges. *The Science of the total environment*, 783, 146964. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2021.146964>.
- Nguyen, S. V. 1986. Plasma Assisted Chemical Vapor Deposited Thin Films for Microelectronic Applications. *Journal of Vacuum Science & Technology B: Microelectronics and Nanometer Structures* 4 (5): 1159. <https://doi.org/10.1116/1.583476>.
- Nosho, K., Fukushima, H., Asai, T., Nishio, M., Takamaru, R., Kobayashi-Kirschvink, K. J., Ogawa, T., Hidaka, M., et Masaki, H. 2018. cAMP-CRP acts as a key regulator for the viable but non-culturable state in *Escherichia coli*. *Microbiology (Reading, England)*, 164(3), 410–419. <https://doi.org/10.1099/mic.0.000618>.
- Nyström, T. 2004. Stationary-Phase Physiology. *Annual Review of Microbiology* 58 (1): 161-81. <https://doi.org/10.1146/annurev.micro.58.030603.123818>.
- OMS. 2015. Progrès en matière d'alimentation en eau et d'assainissement : rapport 2015 et évaluation des OMD. Genève: Organisation mondiale de la Santé. <https://apps.who.int/iris/handle/10665/204486>.
- OMS. 2017. Directives de qualité pour l'eau de boisson : 4e éd. intégrant le premier additif. 4e éd + 1er additif. Genève: Organisation mondiale de la Santé. <https://apps.who.int/iris/handle/10665/258887>.
- Ou, A., Wang, K., Ye, Y., Chen, L., Gong, X., Qian, L., et Liu, J. 2021. Direct Detection of Viable but Non-culturable (VBNC) *Salmonella* in Real Food System by a Rapid and Accurate PMA-CPA Technique. *Frontiers in microbiology*, 12, 634555. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2021.634555>.
- Pagán, R., et Mackey, B. 2000. Relationship between membrane damage and cell death in pressure-treated *Escherichia coli* cells: differences between exponential- and stationary-phase cells and variation among strains. *Applied and environmental microbiology*, 66(7), 2829–2834. <https://doi.org/10.1128/AEM.66.7.2829-2834.2000>.

- Palma, F., Radomski, N., Guérin, A., Sévellec, Y., Félix, B., Bridier, A., Soumet, C., Roussel, S., et Guillier, L. 2022. Genomic elements located in the accessory repertoire drive the adaptation to biocides in *Listeria monocytogenes* strains from different ecological niches. *Food microbiology*, 106, 103757. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2021.103757>.
- Pan, Y., Jun-Hu, C., Xiaoye, L., et Da-Wen, S. 2019. Assessing the Inactivation Efficiency of Ar/O2 Plasma Treatment against *Listeria Monocytogenes* Cells: Sublethal Injury and Inactivation Kinetics. *LWT* 111 (août): 318-27. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2019.05.041>.
- Park, C., et Zhang, J. 2012) High expression hampers horizontal gene transfer. *Genome biology and evolution*, 4(4), 523–532. <https://doi.org/10.1093/gbe/evs030>.
- Pärnänen, K. M. M., Narciso-da-Rocha, C., Kneis, D., Berendonk, T. U., Cacace, D., Do, T. T., Elpers, C., Fatta-Kassinos, D., Henriques, I., Jaeger, T., Karkman, A., Martinez, J. L., Michael, S. G., Michael-Kordatou, I., O'Sullivan, K., Rodriguez-Mozaz, S., Schwartz, T., Sheng, H., Sørsum, H., Stedtfeld, R. D., ... Manaia, C. M. 2019. Antibiotic resistance in European wastewater treatment plants mirrors the pattern of clinical antibiotic resistance prevalence. *Science advances*, 5(3), eaau9124. <https://doi.org/10.1126/sciadv.aau9124>.
- Paruch, L., Paruch, A.M., Eiken, H.G, et Sørheim, R. 2019. Faecal Pollution Affects Abundance and Diversity of Aquatic Microbial Community in Anthro-Zoogenically Influenced Lotic Ecosystems. *Scientific Reports* 9 (1): 19469. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-56058-x>.
- Pazda, M., Kumirska, J., Stepnowski, P., et Mulkiewicz, E. 2019. Antibiotic resistance genes identified in wastewater treatment plant systems - A review. *The Science of the total environment*, 697, 134023. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2019.134023>.
- Pearse, R.W.B. et Gaydon, A.G. 1963. The identification of molecular spectra. The Whitefriars Press.
- Perinban, S., Valérie, O., et Vijaya, R. 2019. Nonthermal Plasma–Liquid Interactions in Food Processing: A Review. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety* 18 (6): 1985-2008. <https://doi.org/10.1111/1541-4337.12503>.
- Pomposiello, P. J., et Demple, B. 2001. Redox-operated genetic switches: the SoxR and OxyR transcription factors. *Trends in biotechnology*, 19(3), 109–114. [https://doi.org/10.1016/s0167-7799\(00\)01542-0](https://doi.org/10.1016/s0167-7799(00)01542-0).
- Qiu, Z., Yu, Y., Chen, Z., Jin, M., Yang, D., Zhao, Z., Wang, J., Shen, Z., Wang, X., Qian, D., Huang, A., Zhang, B., et Li, J. W. 2012. Nanoalumina promotes the horizontal transfer of multiresistance genes mediated by plasmids across genera. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 109(13), 4944–4949. <https://doi.org/10.1073/pnas.1107254109>.
- Rajab, M., Heim, C., Letzel, T., Drewes, J. E., et Helmreich, B. 2015. Electrochemical disinfection using boron-doped diamond electrode--the synergetic effects of in situ ozone and free chlorine generation. *Chemosphere*, 121, 47–53. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2014.10.075>.
- Rezaei, F., Vanraes, P., Nikiforov, A., Morent, R., et De Geyter, N. 2019. Applications of Plasma-Liquid Systems: A Review. *Materials (Basel, Switzerland)*, 12(17), 2751. <https://doi.org/10.3390/ma12172751>.
- Roberts, M., Rowley, G., Kormanec, J., et Zalm, M. E. J. 2017. The Role of Alternative Sigma Factors in Pathogen Virulence. In J. B. Gurtler, M. P. Doyle, & J. L. Kornacki (Eds.), *Foodborne Pathogens* (pp. 229-303). (Food Microbiology and Food Safety). Springer. [https://doi.org/10.1007/978-3-319-56836-2\\_9](https://doi.org/10.1007/978-3-319-56836-2_9);
- Rochelle-Newall, E., Nguyen, T. M., Le, T. P., Sengtaheuanghoung, O., et Ribolzi, O. 2015. A short review of fecal indicator bacteria in tropical aquatic ecosystems: knowledge gaps and future directions. *Frontiers in microbiology*, 6, 308. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2015.00308>.
- Rosenberg Goldstein, R. E., Micallef, S. A., Gibbs, S. G., George, A., Claye, E., Sapkota, A., Joseph, S. W., et Sapkota, A. R. 2014. Detection of vancomycin-resistant enterococci (VRE) at four U.S. wastewater treatment plants that provide effluent for reuse. *The Science of the total environment*, 466-467, 404–411. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2013.07.039>.

- Rowlett, V. W., Mallampalli, V. K. P. S., Karlstaedt, A., Dowhan, W., Taegtmeier, H., Margolin, W., et Vitrac, H. 2017. Impact of Membrane Phospholipid Alterations in *Escherichia coli* on Cellular Function and Bacterial Stress Adaptation. *Journal of bacteriology*, 199(13), e00849-16. <https://doi.org/10.1128/JB.00849-16>.
- Rozwadowski, M., et Gawel, D. 2022. Molecular Factors and Mechanisms Driving Multidrug Resistance in Uropathogenic *Escherichia coli*-An Update. *Genes*, 13(8), 1397. <https://doi.org/10.3390/genes13081397>.
- Rusterholtz, D. L., Lacoste, D. A., Stancu, G. D. Pai, D. Z. et Laux, C. O. 2013. Ultrafast heating and oxygen dissociation in atmospheric pressure air by nanosecond repetitively pulsed discharges. *Journal of Physics D: Applied Physics* 46 (46): 21. <https://doi.org/10.1088/0022-3727/46/46/464010>.
- Sakudo, A., et Misawa, T. 2020. Antibiotic-Resistant and Non-Resistant Bacteria Display Similar Susceptibility to Dielectric Barrier Discharge Plasma. *International journal of molecular sciences*, 21(17), 6326. <https://doi.org/10.3390/ijms21176326>.
- Salamandane, A., Vila-Boa, F., Malfeito-Ferreira, M., et Brito, L. 2021. High Fecal Contamination and High Levels of Antibiotic-Resistant Enterobacteriaceae in Water Consumed in the City of Maputo, Mozambique. *Biology*, 10(6), 558. <https://doi.org/10.3390/biology10060558>.
- Schellhorn, H. E., et Hassan, H. M. 1988. Transcriptional regulation of *katE* in *Escherichia coli* K-12. *Journal of bacteriology*, 170(9), 4286–4292. <https://doi.org/10.1128/jb.170.9.4286-4292.1988>.
- Scherber, C. M., Schottel, J. L., et Aksan, A. 2009. Membrane phase behavior of *Escherichia coli* during desiccation, rehydration, and growth recovery. *Biochimica et biophysica acta*, 1788(11), 2427–2435. <https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2009.08.011>.
- Scheutz, F., et Nancy A.S. 2015. « *Escherichia* ». In *Bergey's Manual of Systematics of Archaea and Bacteria*, édité par William B Whitman, Fred Rainey, Peter Kämpfer, Martha Trujillo, Jonsik Chun, Paul DeVos, Brian Hedlund, et Svetlana Dedysh, 1re éd., 1-49. Wiley. <https://doi.org/10.1002/9781118960608.gbm01147>.
- Schottruff, F., Fröhling, A., Zunabovic-Pichler, M., Krottenthaler, A., Schlüter, O., et Jäger, H. 2018. Sublethal Injury and Viable but Non-culturable (VBNC) State in Microorganisms During Preservation of Food and Biological Materials by Non-thermal Processes. *Frontiers in microbiology*, 9, 2773. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.02773>.
- Seaver, L. C., et Imlay, J. A. 2001. Hydrogen peroxide fluxes and compartmentalization inside growing *Escherichia coli*. *Journal of bacteriology*, 183(24), 7182–7189. <https://doi.org/10.1128/JB.183.24.7182-7189.2001>.
- Shokri, A., et Larsson, G. 2004. Characterisation of the *Escherichia coli* membrane structure and function during fedbatch cultivation. *Microbial cell factories*, 3(1), 9. <https://doi.org/10.1186/1475-2859-3-9>.
- Sillanpää, M., Ncibi, M. C., et Matilainen, A. 2018. Advanced oxidation processes for the removal of natural organic matter from drinking water sources: A comprehensive review. *Journal of environmental management*, 208, 56–76. <https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2017.12.009>.
- Song, R., Hu, L., Zhao, K., Rongwei, Z., Yangyang, W., Ying, Z., Guangzhou, Q., et Tiecheng, W. 2021. Surface Plasma Induced Elimination of Antibiotic-Resistant *Escherichia coli* and Resistance Genes: Antibiotic Resistance, Horizontal Gene Transfer, and Mechanisms. *Separation and Purification Technology* 275 (novembre): 119185. <https://doi.org/10.1016/j.seppur.2021.119185>.
- Stautz, J., Hellmich, Y., Fuss, M. F., Silberberg, J. M., Devlin, J. R., Stockbridge, R. B., et Hänelt, I. 2021. Molecular Mechanisms for Bacterial Potassium Homeostasis. *Journal of molecular biology*, 433(16), 166968. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2021.166968>.
- Szczepanowski, R., Linke, B., Krahn, I., Gartemann, K. H., Gützkow, T., Eichler, W., Pühler, A., et Schlüter, A. 2009. Detection of 140 clinically relevant antibiotic-resistance genes in the plasmid metagenome of wastewater treatment plant bacteria showing reduced susceptibility to selected antibiotics. *Microbiology (Reading, England)*, 155(Pt 7), 2306–2319. <https://doi.org/10.1099/mic.0.028233-0>.

- Szewzyk, U., Szewzyk, R., Manz, W., et Schleifer, K. H. 2000. Microbiological safety of drinking water. *Annual review of microbiology*, 54, 81–127. <https://doi.org/10.1146/annurev.micro.54.1.81>.
- Takai, E., Katsuhisa, K., Junpei, K., et Kentaro, S. 2012. Protein Inactivation by Low-Temperature Atmospheric Pressure Plasma in Aqueous Solution. *Plasma Processes and Polymers* 9 (1): 77-82. <https://doi.org/10.1002/ppap.201100063>.
- Tenaillon, O., Skurnik, D., Picard, B., et Denamur, E. 2010. The population genetics of commensal *Escherichia coli*. *Nature reviews. Microbiology*, 8(3), 207–217. <https://doi.org/10.1038/nrmicro2298>.
- Theron, J., et Cloete, T. E. 2002. Emerging waterborne infections: contributing factors, agents, and detection tools. *Critical reviews in microbiology*, 28(1), 1–26. <https://doi.org/10.1080/1040-840291046669>.
- Tresp, H., Hammer, M.U., Winter, J., Weltmann, K.D., et Reuter, S. 2013. Quantitative Detection of Plasma-Generated Radicals in Liquids by Electron Paramagnetic Resonance Spectroscopy. *Journal of Physics D: Applied Physics* 46 (43): 435401. <https://doi.org/10.1088/0022-3727/46/43/435401>.
- Tresp, H., Hammer, M.U., Winter, J., Weltmann, K.D., et Reuter, S. 2013. Effects of Atmosphere Composition and Liquid Type on Plasma-Generated Reactive Species in Biologically Relevant Solutions. *Plasma Medicine* 3 (1-2): 45-55. <https://doi.org/10.1615/PlasmaMed.2014009711>.
- Triggiano, F., Calia, C., Diella, G., Montagna, M. T., De Giglio, O., et Caggiano, G. 2020. The Role of Urban Wastewater in the Environmental Transmission of Antimicrobial Resistance: The Current Situation in Italy (2010-2019). *Microorganisms*, 8(10), 1567. <https://doi.org/10.3390/microorganisms8101567>.
- Uluseker, C., Kaster, K. M., Thorsen, K., Basiry, D., Shobana, S., Jain, M., Kumar, G., Kommedal, R., et Pala-Ozkok, I. 2021. A Review on Occurrence and Spread of Antibiotic Resistance in Wastewaters and in Wastewater Treatment Plants: Mechanisms and Perspectives. *Frontiers in microbiology*, 12, 717809. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2021.717809>;
- van Duin, D., et Doi, Y. 2017. The global epidemiology of carbapenemase-producing Enterobacteriaceae. *Virulence*, 8(4), 460–469. <https://doi.org/10.1080/21505594.2016.1222343>.
- Vanraes, P., Anton, Y.N., et Leys, C. 2016. Electrical Discharge in Water Treatment Technology for Micropollutant Decomposition. In *Plasma Science and Technology - Progress in Physical States and Chemical Reactions*, édité par Tetsu Mieno. InTech. <https://doi.org/10.5772/61830>.
- Vaquero, J., Judée, F., Vallette, M., Decauchy, H., Arbelaiz, A., Aoudjehane, L., Scatton, O., Gonzalez-Sanchez, E., Merabtene, F., Augustin, J., Housset, C., Dufour, T., et Fouassier, L. 2020. Cold-Atmospheric Plasma Induces Tumor Cell Death in Preclinical In Vivo and In Vitro Models of Human Cholangiocarcinoma. *Cancers*, 12(5), 1280. <https://doi.org/10.3390/cancers12051280>.
- Vaze, N. D., Park, S., Brooks, A. D., Fridman, A., et Joshi, S. G. 2017. Involvement of multiple stressors induced by non-thermal plasma-charged aerosols during inactivation of airborne bacteria. *PloS one*, 12(2), e0171434. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0171434>.
- Verburg, I., García-Cobos, S., Hernández Leal, L., Waar, K., Friedrich, A. W., et Schmitt, H. 2019. Abundance and Antimicrobial Resistance of Three Bacterial Species along a Complete Wastewater Pathway. *Microorganisms*, 7(9), 312. <https://doi.org/10.3390/microorganisms7090312>.
- Wagner, H.E., Brandenburg, R. Kozlov, K.V. Sonnenfeld, A. Michel, P. et Behnke, J.F. 2003. The Barrier Discharge: Basic Properties and Applications to Surface Treatment. *Vacuum* 71 (3): 417-36. [https://doi.org/10.1016/S0042-207X\(02\)00765-0](https://doi.org/10.1016/S0042-207X(02)00765-0).
- Wende, K., Williams, P., Dalluge, J., Gaens, W. V., Aboubakr, H., Bischof, J., von Woedtke, T., Goyal, S. M., Weltmann, K. D., Bogaerts, A., Masur, K., et Bruggeman, P. J. 2015. Identification of the biologically active liquid chemistry induced by a nonthermal atmospheric pressure plasma jet. *Biointerphases*, 10(2), 029518. <https://doi.org/10.1116/1.4919710>.

- Winter, J., Tresp, H., Hammer, M.U., Iséni, S., Kupsch, S., Schmidt-Bleker, A., Wende, K., Dünnbier, M., Masur, K., Weltmann, K., et Reuter, S. 2014. Tracking plasma generated H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> from gas into liquid phase and revealing its dominant impact on human skin cells. *Journal of Physics D: Applied Physics*, 47.
- von Wintersdorff, C. J., Penders, J., van Niekerk, J. M., Mills, N. D., Majumder, S., van Alphen, L. B., Savelkoul, P. H., et Wolffs, P. F. 2016. Dissemination of Antimicrobial Resistance in Microbial Ecosystems through Horizontal Gene Transfer. *Frontiers in microbiology*, 7, 173. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.00173>.
- Machala, Z., Hensel, K., et Akishev, Y. 2012. Plasma-Liquid Interactions: Chemistry and Antimicrobial Effects. In *Plasma for Bio-Decontamination, Medicine and Food Security*, 67-78. NATO Science for Peace and Security Series A: Chemistry and Biology. Dordrecht: Springer Netherlands. [https://doi.org/10.1007/978-94-007-2852-3\\_6](https://doi.org/10.1007/978-94-007-2852-3_6).
- Xing, S., Lu, X., Liu, J., Zhu, L., Ma, Z., et Wu, Y. 2016. Catalytic ozonation of sulfosalicylic acid over manganese oxide supported on mesoporous ceria. *Chemosphere*, 144, 7–12. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2015.08.044>.
- Xu, H., Ma, R., Zhu, Y., Du, M., Zhang, H., et Jiao, Z. 2020. A systematic study of the antimicrobial mechanisms of cold atmospheric-pressure plasma for water disinfection. *The Science of the total environment*, 703, 134965. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2019.134965>.
- Xu, Z., Cheng, C., Shen, J., Lan, Y., Hu, S., Han, W., et Chu, P. K. 2018. In vitro antimicrobial effects and mechanisms of direct current air-liquid discharge plasma on planktonic *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli* in liquids. *Bioelectrochemistry (Amsterdam, Netherlands)*, 121, 125–134. <https://doi.org/10.1016/j.bioelechem.2018.01.012>.
- Yang, Y., Wan, K., Yang, Z., Li, D., Li, G., Zhang, S., Wang, L., et Yu, X. 2020. Inactivation of antibiotic resistant *Escherichia coli* and degradation of its resistance genes by glow discharge plasma in an aqueous solution. *Chemosphere*, 252, 126476. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2020.126476>.
- Yang, Y., Li, B., Zou, S., Fang, H. H., et Zhang, T. 2014. Fate of antibiotic resistance genes in sewage treatment plant revealed by metagenomic approach. *Water research*, 62, 97–106. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2014.05.019>.
- Yeom, J., et Groisman, E. A. 2021. Reduced ATP-dependent proteolysis of functional proteins during nutrient limitation speeds the return of microbes to a growth state. *Science signaling*, 14(667), eabc4235. <https://doi.org/10.1126/scisignal.abc4235>.
- Yoshida, H., Ueta, M., Maki, Y., Sakai, A., et Wada, A. 2009. Activities of *Escherichia coli* ribosomes in IF3 and RMF change to prepare 100S ribosome formation on entering the stationary growth phase. *Genes to cells : devoted to molecular & cellular mechanisms*, 14(2), 271–280. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2443.2008.01272.x>.
- Yost, A. D., et Joshi, S. G. 2015. Atmospheric Nonthermal Plasma-Treated PBS Inactivates *Escherichia coli* by Oxidative DNA Damage. *PloS one*, 10(10), e0139903. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0139903>.
- Yu, H., Perni, S., Shi, J. J., Wang, D. Z., Kong, M. G., et Shama, G. 2006. Effects of cell surface loading and phase of growth in cold atmospheric gas plasma inactivation of *Escherichia coli* K12. *Journal of applied microbiology*, 101(6), 1323–1330. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2006.03033.x>.
- Yuste, L., Hervás, A. B., Canosa, I., Tobes, R., Jiménez, J. I., Nogales, J., Pérez-Pérez, M. M., Santero, E., Díaz, E., Ramos, J. L., de Lorenzo, V., et Rojo, F. 2006. Growth phase-dependent expression of the *Pseudomonas putida* KT2440 transcriptional machinery analysed with a genome-wide DNA microarray. *Environmental microbiology*, 8(1), 165–177. <https://doi.org/10.1111/j.1462-2920.2005.00890.x>.
- Zambrano, M. M., et Kolter, R. 1996. GASPing for life in stationary phase. *Cell*, 86(2), 181–184. [https://doi.org/10.1016/s0092-8674\(00\)80089-6](https://doi.org/10.1016/s0092-8674(00)80089-6).
- Zaneveld, J. R., Nemergut, D. R., et Knight, R. 2008. Are all horizontal gene transfers created equal? Prospects for mechanism-based studies of HGT patterns. *Microbiology (Reading, England)*, 154(Pt 1), 1–15. <https://doi.org/10.1099/mic.0.2007/011833-0>.

- Zarzecka, U., Zadernowska, A., Chajęcka-Wierzchowska, W., Wiśniewska, K., et Modzelewska-Kapituła, M. 2022. Antibiotic Resistance Carriage Causes a Lower Survivability Due to Stress Associated with High-Pressure Treatment among Strains from Starter Cultures. *Animals : an open access journal from MDPI*, 12(11), 1460. <https://doi.org/10.3390/ani12111460>.
- Zhang, X. X., et Zhang, T. 2011. Occurrence, abundance, and diversity of tetracycline resistance genes in 15 sewage treatment plants across China and other global locations. *Environmental science & technology*, 45(7), 2598–2604. <https://doi.org/10.1021/es103672x>.
- Zhao, S., Zhang, J., Li, Z., Han, Y., et Kan, B. 2021. Enumeration of Viable Non-Culturable *Vibrio cholerae* Using Droplet Digital PCR Combined With Propidium Monoazide Treatment. *Frontiers in cellular and infection microbiology*, 11, 753078. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2021.753078>.
- Zhao, X., Zhong, J., Wei, C., Lin, C. W., et Ding, T. 2017. Current Perspectives on Viable but Non-culturable State in Foodborne Pathogens. *Frontiers in microbiology*, 8, 580. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.00580>.
- Zhou, W., Wang, K., Hong, W., Bai, C., Chen, L., Fu, X., Huang, T., et Liu, J. 2020. Development and Application of a Simple "Easy To Operate" Propidium Monoazide-Crossing Priming Amplification on Detection of Viable and Viable But Non-culturable Cells of O157 *Escherichia coli*. *Frontiers in microbiology*, 11, 569105. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.569105>.
- Zhu, L., Shuai, X., Xu, L., Sun, Y., Lin, Z., Zhou, Z., Meng, L., et Chen, H. 2022. Mechanisms underlying the effect of chlorination and UV disinfection on VBNC state *Escherichia coli* isolated from hospital wastewater. *Journal of hazardous materials*, 423(Pt B), 127228. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2021.127228>.



