HAL
open science

Caractérisation des propriétés antibactériennes de textiles fonctionnalisés avec de l'argent ou du PolyHexaMéthylène Biguanide (PHMB)

Élise Chadeau

▶ **To cite this version:**

Élise Chadeau. Caractérisation des propriétés antibactériennes de textiles fonctionnalisés avec de l'argent ou du PolyHexaMéthylène Biguanide (PHMB). Autre. Université Claude Bernard - Lyon I, 2011. Français. NNT : 2011LYO10030 . tel-00848612

HAL Id: tel-00848612

https://theses.hal.science/tel-00848612

Submitted on 26 Jul 2013

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.

N° d'ordre : 30 - 2011 Année 2011

THESE DE L'UNIVERSITE DE LYON

Délivrée par

L'UNIVERSITE CLAUDE BERNARD LYON 1

Ecole Doctorale EDISS

(Ecole Doctorale Interdisciplinaire Sciences-Santé)

DIPLOME DE DOCTORAT

(arrêté du 7 août 2006)

« Caractérisation des propriétés antibactériennes de textiles fonctionnalisés avec de l'argent ou du PolyHexaMéthylène Biguanide (PHMB) »

par

Elise CHADEAU

Le 15 février 2011

Directeur de thèse : Pr. Pascal DEGRAEVE
Co-directrice de thèse : Dr. Nadia OULAHAL

JURY :

Dr Brigitte CARPENTIER, Directrice de Recherche, ANSES, Maisons Alfort	Rapporteur
Pr Jean-François CAVIN, Agrosup Dijon	Rapporteur
Pr Pascal DEGRAEVE, Université Lyon 1	Directeur de thèse
Dr Nadia OULAHAL, Université Lyon 1	Co-directrice de thèse
Pr Didier LEONARD, Université Lyon 1	Examinateur
Dr Isabelle FERREIRA, IFTH, Ecully	Examinateur
Dr Anne-Marie REVOL-JUNELLES, ENSAIA-INPL, Nancy	Examinateur
Dr Michel LANGLET, Directeur de Recherche CNRS, INP Grenoble - Minatec	Examinateur

Remerciements

Ce travail a été effectué dans le cadre du projet Actiprotex, projet de recherche et développement collaboratif incluant différents partenaires universitaires et industriels. Je tiens donc à remercier tous les partenaires du projet pour l'intérêt qu'ils ont porté à ce sujet et pour l'aide qu'ils ont pu m'apporter durant ma thèse.

Je souhaite remercier le Docteur Brigitte Carpentier de l'ANSES de Maisons Alfort et le Professeur Jean-François Cavin d'Agrosup Dijon d'avoir accepté d'être rapporteurs de ce mémoire de thèse et de s'être intéressé à mon travail de recherche. J'adresse également mes remerciements aux autres membres du jury, le Professeur Didier Léonard, le Docteur Isabelle Ferreira, le Docteur Anne-Marie Revol-Junelles ainsi que le Docteur Michel Langlet pour leur participation au jury de thèse.

Je tiens tout d'abord à exprimer ma gratitude à Pascal Degraeve, directeur du LRGIA et mon directeur de thèse de m'avoir accueilli dans son laboratoire et pour son aide et ses conseils au cours de ces années. Je tiens ensuite à exprimer toute ma reconnaissance et ma gratitude à Nadia Oulahal pour son encadrement, ses conseils et son soutien tout au long de ces 3 années.

Je souhaite également remercier toutes les personnes du LRGIA et de l'IUT de Bourg en Bresse. Je pense particulièrement à Isabelle, Sophie, Amandine, Catherine Joly, Coralie, Adem, Emilie, Fouzia, Zolalaina, Roselyne, Sandrine, Catherine Jallas, Cathy, Pascal Dupeux, Hélène, Joël, Christine, Marie-Christine, Emmanuelle et j'espère n'oublier personne. Mais aussi les ATER croisés pendant ces 3 années : Wafa, Nicolas, Mélanie, Fouad.
Merci aux compagnons de soirées, qui se reconnaîtront, pour les moments passés ensemble pour les soirées crêpes, barbecues sous la direction de Zou, la descente de l'Ardèche en canoë et bien d'autres réjouissances. Merci à toi Amandine pour les longues discussions sur les bestioles que l'on aime tant autour d'un thé et pour m'avoir écouté dans les moments un peu moins faciles.

Je souhaite aussi remercier tous les stagiaires qui ont participé à ce projet pour leur aide et leur disponibilité car cela n'a pas toujours été de tout repos pour eux : merci à Faïza, Manon, Slim, Emna, Benjamin, Aurore, Alexandre et Christophe.

Et enfin je ne pourrais pas terminer ces remerciements en remerciant infiniment mes parents qui ont toujours cru en moi et qui seront si fier demain de pouvoir appeler leur dernière fille « Docteur ». Merci à vous pour tout ce que vous avez fait, pour m'avoir permis d'aller aussi loin, et de garder confiance en moi quoi qu'il arrive. Merci aussi à mes sœurs Céline et Emilie et à ma grand-mère pour leur soutien sans faille.
Ma dernière pensée va à Stéphane, mon futur mari et compagnon de toujours, merci aussi à toi pour ta confiance, ta patience et ta façon de me rassurer dans les moments difficiles.

Je tiens également à remercier Céline Brunon et Mouna Messaoud, les 2 doctorantes du projet. Plus particulièrement Céline, sans toi, cette thèse n'aurait pas été la même, merci pour tout.

La thèse s'achève et c'est une nouvelle vie qui commence. Plus qu'une expérience professionnelle la thèse a été pour moi une expérience humaine avec son lot d'émotions et de rencontres.

Sommaire

Liste des figures et tableaux **9**

Liste des abréviations **17**

Liste des annexes **19**

Liste des valorisations scientifiques **20**

Présentation générale **21**

Chapitre 1 : Etude Bibliographique **28**

1. Les textiles antimicrobiens 31

1.1. Fabrication des textiles et vêtements de protection 31
1.2. Modes de fonctionnalisation des tissus et molécules antimicrobiennes utilisées 34
1.2.1. Les molécules antimicrobiennes 34
1.2.1.1. L'argent 37
1.2.1.2. Les ammoniums quaternaires 40
1.2.1.3. Le chlorhydrate de polyhexaméthylène biguanide (PHMB) 42
1.2.2. Modes de fonctionnalisation des tissus pour introduire des propriétés antimicrobiennes 45
1.2.2.1. Le traitement plasma 46
1.2.2.2. La méthodologie sol-gel 51
1.3. Méthodes de caractérisation des textiles 54
1.3.1. La spectroscopie de photoélectrons induits par rayons X (XPS) 54
1.3.2. La spectrométrie de masse d'ions secondaires (ToF-SIMS) 56
1.4. Méthodes d'évaluation de l'activité antimicrobienne des textiles fonctionnalisés 57
1.4.1. Présentation des différentes méthodologies 57
1.4.2. Méthodes in vitro : norme ISO 20743-2005 58

2. Méthodes d'étude de l'effet des textiles antimicrobiens sur les micro-organismes 60

2.1. Description et définition des biofilms 61
2.2. Les biofilms en industries agro-alimentaires et les risques microbiologiques liés 63
2.3. Comportement des biofilms vis-à-vis des agents antimicrobiens 64
2.4. Caractérisation des propriétés de surface des souches bactériennes : méthode MATS (Microbial Adhesion to Solvents) 66
2.5. Evaluation de la viabilité des micro-organismes par microscopie à épifluorescence 67
2.5.1. Principe 67
2.5.2. Les fluorochromes 70
2.5.3. Le kit d'évaluation de la viabilité des micro-organismes : Live/Dead® Baclight™ 72
2.6. Evaluation de la fluidité membranaire des micro-organismes par spectrofluorimétrie 74
2.6.1. La membrane cytoplasmique bactérienne : lipides et fluidité membranaire 74
2.6.2. La polarisation de fluorescence et les marqueurs utilisés 76
2.6.3. Effet de différents stress sur la fluidité de la membrane cytoplasmique des bactéries 80
2.7. Etude de la membrane des micro-organismes par spectroscopie Infrarouge à Transformée de Fourier (IRTF) 82

3. Conclusion 84

4. Références bibliographiques 85

Chapitre 2 : Matériels et Méthodes 99

1. Fonctionnalisation des textiles et caractérisation des surfaces..... 102

1.1. Nature des textiles, mode de préparation et lavages..... 102
1.1.1. Nature des textiles utilisés.....102
1.1.2. Textiles fonctionnalisés par de l'argent déposé par traitement plasma (par la société HEF).....103
1.1.3. Textiles fonctionnalisés avec du PHMB par l'IFTH.....107
1.1.4. Textiles fonctionnalisés avec de l'argent et du TiO_2 par sol-gel par le LMGP.....109
1.1.5. Lavages réalisés.....111

1.2. Caractérisation de la composition chimique de surface des textiles après traitement 112
1.2.1. Caractérisation par XPS (réalisée au LSA, Université Lyon 1).....112
1.2.2. Caractérisation par spectrométrie de masse des ions secondaires à temps de vol (ToF-SIMS) (réalisée au LSA, Université Lyon 1).....115

2. Caractéristiques des souches bactériennes testées..... 116

2.1. Description et conservation des souches 116
2.2. Caractérisation de la surface des cellules bactériennes par la méthode MATS (Microbial Adhesion to Solvents) 118
2.2.1. Culture des souches pour la méthode MATS.....118
2.2.2. Protocole de la méthode MATS.....118

3. Etude de l'effet des agents antimicrobiens sur les souches bactériennes en solution ou après dépôt sur textile..... 120

3.1. Culture des souches bactériennes 120
3.2. Les antimicrobiens employés 121
3.3. Détermination des concentrations minimales inhibitrices (CMI) du PHMB..... 122
3.4. Textiles non traités en conditions différentes d'humidités relatives de l'air 124
3.4.1. Préparation des textiles.....125
3.4.2. Ensemencement des éprouvettes.....125
3.5. Détermination de l'activité antimicrobienne adaptée de la norme ISO 20743/2005..... 127
3.6. Observation des textiles par microscopie électronique à balayage (MEB) 128

4. Etude de la viabilité des bactéries par microscopie à épifluorescence..... 130

4.1. Après contact avec les antimicrobiens en milieu liquide..... 130
4.2. Après contact avec les textiles antimicrobiens 131

5. Etude de la membrane bactérienne après contact avec des molécules antimicrobiennes par spectrofluorimétrie en présence de sondes fluorescentes pour évaluer la fluidité membranaire et par spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier 134

5.1. Etude de la fluidité des membranes bactériennes après contact avec le PHMB par spectrofluorimétrie en présence de sondes fluorescentes 134
5.2. Etude des modifications de la membrane bactérienne après contact avec le PHMB par spectroscopie infrarouge à transformé de Fourier 136

6. Références bibliographiques 137

Chapitre 3 : Choix des micro-organismes cibles et adaptation du protocole de détermination de l'activité antimicrobienne pour des textiles 138

1. Choix et caractérisation des souches bactériennes 141

1.1. Choix des souches bactériennes 141
1.2. Détermination des propriétés de surface des bactéries par la méthode MATS 144
1.3. Détermination des concentrations minimales inhibitrices (CMI) du PHMB vis-à-vis de 3 souches bactériennes : *L. innocua* LRGIA 01, *S. aureus* méthi-R nosoco 3011, *P. aeruginosa* ATCC 15742 149
1.4. Etude de l'état physiologique de *Listeria innocua* LRGIA 01 après contact avec le PHMB en milieu liquide par microscopie à épifluorescence en présence de fluorochromes 152

2. Protocole de détermination de l'activité antimicrobienne : adaptation de la norme ISO 20743/2005 157

2.1. Présentation de la norme 158
2.2. Mise au point du protocole de détermination de l'activité antimicrobienne sur la base de la norme ISO 20743/2005 159
2.2.1. Conditions de dépôt des micro-organismes sur les textiles.....159
2.2.2. Méthode de décrochage des micro-organismes des textiles.....160
2.3. Etude de la croissance de différentes souches sur textiles témoin non traités 163
2.3.1. Etude de la croissance de *L. innocua* LRGIA 01, *S. aureus* méthi-R nosoco 3011, *P. aeruginosa* ATCC 15742 et *L. monocytogenes* AER 102 sur textiles témoins (C/P et P/C blancs).....164
2.3.2. Etude de la croissance de *L. innocua* LRGIA 01 et *P. aeruginosa* ATCC 15742 sur textiles témoins C/P blancs en conditions d'humidités différentes.....167

3. Conclusion 171

4. Références bibliographiques 172

Chapitre 4 : Fonctionnalisation antimicrobienne d'un textile par l'argent : méthodologie plasma ou méthodologie sol-gel, caractérisation physico-chimique et étude de l'activité antimicrobienne 175

1. Evaluation de l'activité antimicrobienne d'un textile traité par plasma simple couche à l'argent 178

1.1. Caractérisation physico-chimique des textiles après dépôt par traitement plasma simple couche d'argent 178
1.2. Caractérisation ToF-SIMS des textiles après dépôt d'argent par méthodologie plasma en simple couche 183
1.3. Cinétique de croissance de *Listeria innocua* LRGIA 01 et activité antimicrobienne de textiles traités 184

2. Etude de la répartition des micro-organismes après contact avec un textile traité à l'argent par méthode plasma par MEB : exemple d'un textile C/P traité par dépôt d'une simple couche d'argent de 10 Å 191

3. Evaluation de l'activité antimicrobienne d'un textile traité par plasma : dépôt simultané Ag-SiOCH 193

3.1. Méthode de dépôt simultané Ag-SIOCH par traitement plasma 194
3.2. Caractérisation des textiles après dépôt simultané Ag-SiOCH par méthodologie plasma 196

3.3. Suivi de croissance de *Listeria innocua* LRGIA 01 sur les textiles traités Ag-SiOCH par plasma 198

4. Evaluation de l'activité antimicrobienne d'un textile traité par plasma : dépôt d'Ag-SiOCH et une encapsulation par SiOCH ou Al_2O_3 201

4.1. Méthode de traitement plasma : dépôt d'Ag-SiOCH encapsulé par SiOCH ou Al_2O_3..... 202
4.2. Caractérisation des textiles après un dépôt d'Ag-SiOCH encapsulé par SiOCH ou Al_2O_3 par méthodologie plasma..... 203
4.3. Effet de textiles traités Ag-SiOCH encapsulé par SiOCH ou Al_2O_3 sur *Listeria innocua* LRGIA 01 206

5. Evaluation de l'activité antimicrobienne d'un textile traité par méthodologie sol-gel .. 214
5.1. Méthodologie sol-gel..... 215
5.2. Activités antimicrobiennes de textiles fonctionnalisés par Sol-Gel à l'argent 217

6. Conclusion..... 223

7. Références bibliographiques 226

Chapitre 5 : activité antimicrobienne d'un textile fonctionnalisé avec du PHMB par foulardage et co-précipitation du PHMB avec du laurylsulfate (suivant le procédé décrit dans le brevet n° EP 0 955 069 de l'IFTH)..... 229

1. Fonctionnalisation et caractérisation de la composition chimique de l'extrême surface d'un textile traité par foulardage au PHMB selon le brevet EP n° 0955069 de l'IFTH 232

1.1. Fonctionnalisation 232
1.2. Analyse par XPS de la composition chimique de surface des textiles traités au PHMB/LS 233
1.3. Analyse par ToF-SIMS de la composition chimique de surface des textiles traités au PHMB/LS 234

2. Effet du contact avec le textile traité au PHMB/LS sur les micro-organismes : activité antimicrobienne sur différentes souches et évaluation de l'état physiologique des micro-organismes..... 236

2.1. Activités antimicrobiennes des textiles traités au PHMB/LS avant et après lavage..... 237
2.2. Etude de l'état physiologique par microscopie à épifluorescence de *L. innocua* LRGIA 01, *S. aureus* méthi-R nosoco 3011 et *P. aeruginosa* ATCC 15742 après contact avec un textile traité au PHMB/LS 241
2.3. Observation des textiles traités au PHMB/LS par MEB après contact avec *Listeria innocua* LRGIA01..... 247

3. Etude de la fluidité membranaire de *Listeria innocua* LRGIA 01 après contact avec le PHMB en milieu liquide 249

3.1. Etude de la fluidité de la membrane de *L. innocua* LRGIA 01 après contact avec le PHMB en milieu liquide..... 249
3.2. Utilisation du DPH et du TMA-DPH pour évaluer la fluidité de la membrane de *L. innocua* LRGIA 01 après contact avec le PHMB en milieu liquide..... 251

4. Evaluation des changements au niveau la membrane de *Listeria innocua* LRGIA 01 après contact avec le PHMB en milieu liquide par spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier (IRTF) 258

4.1. Spectre infrarouge type de *L. innocua* LRGIA 01 avant contact avec le PHMB 259
4.2. Comparaison des spectres infrarouges des cellules de *L. innocua* LRGIA 01 avant et après contact avec le PHMB 261

5. Conclusion 268

6. Références bibliographiques 270

Conclusion générale et perspectives de recherche 275

Annexes 285

Résumé 316

Liste des figures

Figures de la partie « introduction »

Figure a-1 : Organisation du projet Actiprotex en 4 groupes

Figure a-2 : Collaboration des différents partenaires au sein du groupe 2a

Figures de la partie « Etude bibliographique »

Figure 1-1 : Différentes formes d'argent pouvant être retrouvées

Figure 1-2 : Formule chimique générale des ammoniums quaternaires

Figure 1-3 : Formule chimique générale des biguanides

Figure 1-4 : Représentation schématique du mécanisme d'action du PHMB sur les membranes cytoplasmiques des bactéries

Figure 1-5 : Principe d'une installation de dépôt par pulvérisation

Figure 1-6 : Représentation schématique des procédés Physical Vapor Deposition (PVD) et Chemical Vapor Deposition (CVD)

Figure 1-7 : La transition sol-gel et ses produits

Figure 1-8 : Techniques de dépôt en milieu liquide

Figure 1-9 : Etapes de la formation d'un biofilm

Figure 1-10 : Principe du fonctionnement d'un microscope à épifluorescence

Figure 1-11 : Mode de fonctionnement des différents fluorochromes

Figure 1-12 : Mode de fonctionnement des 2 fluorochromes du kit Live/Dead® BacLight™

Figure 1-13 : Représentation schématique d'une membrane

Figure 1-14 : Positionnement des sondes DPH et TMA-DPH dans la bicouche phospholipidique

Figures de la partie « matériels et méthodes »

Figure 2-1 : Textiles témoins non traités C/P et P/C blancs fournis par la société TDV

Figure 2-2 : Photographie du système de dépôt par méthode plasma employé pour la fonctionnalisation des textiles

Figure 2-3 : Schéma du dispositif de co-pulvérisation plasma

Figure 2-4 : conditions de dépôt par méthodologie plasma

Figure 2-5 : formule chimique du polyhexaméthylène (PHMB) et du laurylsulfate (LS)

Figure 2-6 : Shématisation de la technique de foulardage

Figure 2-7: Méthodologie d'obtention de nanoparticules d'argent en suspension par réduction photocatalytique

Figure 2-8 : Méthodologie de fonctionnalisation de textiles par imprégnation dans un bain de particules d'argent et de TiO_2 en suspension dans l'éthanol puis dépôt par foulardage

Figure 2-9 : Schéma de principe de l'effet photoélectrique

Figure 2-10: Spectre général du Polyéthylène Téréphtalate (PET) - Excitation Al Kα

Figure 2-11: Schéma de principe des cascades de collisions isotropes et des particules éjectées après bombardement d'un substrat par des ions primaires

Figure 2-12 : Schéma du protocole expérimental de la méthode MATS

Figure 2-13 : Méthode d'ensemencement pour la détermination des CMI des agents antimicrobiens testés

Figure 2-14 : Exemple de la détermination de la CMI du PHMB vis-à-vis de *P. aeruginosa* ATCC 15742

Figure 2-15 : Dispositif pour la mesure de la croissance des micro-organismes sur textiles en conditions différentes d'humidités relatives de l'air

Figure 2-16 : Protocole d'ensemencement des éprouvettes de textiles pour la détermination de l'activité antimicrobienne de textiles adapté de la norme ISO 20743-2005

Figure 2-17 : Représentation schématique du calcul du coefficient mesurant l'activité antimicrobienne du textile

Figure 2-18 : Protocole de coloration des cellules pour l'étude de leur viabilité après contact avec du PHMB en milieu liquide

Figure 2-19 : Protocole de marquage des cellules avec kit Live/Dead® BacLight™ après contact avec un textile antimicrobien

Figure 2-20 : Mode opératoire pour la mesure d'anisotropie de fluorescence des sondes de fluidité membranaire (DPH et TMA-DPH) par spectrofluorimétrie de *L. innocua* LRGIA 01 après contact avec un agent antimicrobien

Figures de la partie « résultats »

Chapitre 3

Figure 3-1 : Pourcentage d'affinité aux solvants : chloroforme, hexadécane, hexane et éther de 4 des souches étudiées

Figure 3-2 : Suivi de croissance de *Listeria innocua* LRGIA 01 en Bouillon Cœur Cervelle (BCC) à 30°C et suivi de l'état physiologique par coloration avec le kit Live/Dead® Baclight™

Figure 3-3 : Clichés d'observations au microscope à épifluorescence de *Listeria innocua* LRGIA01 après contact avec 3 concentrations en PHMB : 5, 20 et 40 mg/L et sans PHMB

immédiatement après le contact (0 h) et après 6 et 24 h

Figure 3-4 : Décrochages successifs de *L. innocua* LRGIA 01 après dépôt sur textile blanc témoin non traité C/P et incubation pendant 8 h

Figure 3-5 : Cinétique de croissance de *L. innocua* LRGIA 01, *S. aureus* méthi-R nosoco 3011, *E. faecium* 5255, *P. aeruginosa* ATCC 15742 et *L. monocytogenes* AER 102 sur textiles blancs C/P et P/C

Figure 3-6 : Cinétiques de croissance de *L. innocua* LRGIA 01 et *P. aeruginosa* ATCC 15742 sur textiles C/P blancs en conditions d'humidités différentes (100, 97, 90, 84, 75 et 32 %)

Chapitre 4

Figure 4-1 : Spectres de transmission optique des différents films d'argent déposés sur lames de verres (1 à 20 nm) obtenu avec le spectromètre lambda 35 de Perkin Elmer

Figure 4-2 : Echantillons de textiles C/P traités sur lesquels différentes épaisseurs d'argent ont été déposées

Figure 4-3 : Spectre ToF-SIMS en mode positif d'un textile P/C traité avec la plus faible quantité d'argent (10 Å)

Figure 4-4 : Cinétique de croissance de *L. innocua* LRGIA 01 sur textiles C/P et P/C non traité et traités par méthodologie plasma avec de l'argent (simple couche) avec des épaisseurs d'argent déposé de 10 Å, 20 ou 50 Å, 100 Å, 200 Å et 400 Å

Figure 4-5 : Activités antimicrobiennes vis-à-vis de *L. innocua* LRGIA 01 sur textiles C/P et P/C traités par méthodologie plasma avec de l'argent (simple couche) après 24 h de contact selon la norme ISO 20743-2005 C/P et P/C

Figure 4-6 : clichés de microscopie électronique à balayage (MEB) de la surface des échantillons de textiles C/P. textile non traité sans bactérie, textile non traité avec bactéries en contact pendant 8 h, textile non traité avec bactéries en contact pendant 24 h, textile traité par méthodologie plasma avec un dépôt simple couche de 10 Å sans bactéries, textile traité par méthodologie plasma avec un dépôt simple couche de 10 Å avec bactéries en contact pendant 8 h, textile traité par méthodologie plasma avec un dépôt simple couche de 10 Å avec bactéries en contact pendant 24 h

Figure 4-7 : Micrographies par microscopie électronique à transmission (MET) sur verre de couches alternées d'argent (10 Å) et de SiOCH obtenues par dépôts PVD (Ar, $2{,}2.10^{-1}$ Pa, 100 W) et PECVD (O_2 + HMDSO, 1,7 Pa, 150 W)

Figure 4-8 : Spectres de transmission optique des dépôts de Ag-SiOCH avec une puissance de dépôt allant de 100 W à 2000 W et une pression de 3.10^{-1} Pa utilisant simultanément des procédés PVD et PECVD (Ar, HMDSO)

Figure 4-9 : Cinétique de croissance de *L. innocua* LRGIA 01 sur textiles P/C non traité et sur textiles traités par méthodologie plasma avec Ag - SiOCH (couches simultanées) à pression constante (3.10^{-1} Pa), débit d'argon constant (140 cm^3/min) et puissance croissante de 100 à 1000 W et pression constante (3.10^{-1} Pa), puissance constante de (300 W) et débit d'argon croissant de 140 à 1220 cm^3/min

Figure 4-10 : Activités antimicrobiennes vis-à-vis de *L. innocua* LRGIA 01 et *E. coli* XL1 blue après 24 h de contact selon la norme ISO 20743/2005 pour les textiles traités par méthodologie plasma à l'argent (multicouche Ag - SiOCH) à différentes puissances de dépôt comprises entre 100 et 1000 W

Figure 4-11 : Récapitulatif des différents dépôts effectués sur textile P/C : dépôt d'une sous-couche d'Ag-SiOCH puis couche protectrice deAl_2O_3 ou de SiOCH

Figure 4-12 : Cinétique de croissance de *L. innocua* LRGIA 01 sur textiles P/C traité SiOCH seul et Al_2O_3 seul par méthodologie plasma

Figure 4-13 : Cinétique de croissance de *L. innocua* LRGIA 01 sur textiles P/C non traité et sur textiles traités par méthodologie plasma avec Ag encapsulés SiOCH ou Al_2O_3, condition L = 100 W

Figure 4-14 : Cinétique de croissance de *L. innocua* LRGIA 01 (A et C) et d'*E. coli* XL1 blue sur textiles P/C non traité et sur textiles traités par méthodologie plasma avec Ag encapsulés SiOCH ou Al_2O_3 condition H = 300 W

Figure 4-15 : Résultats des activités antimicrobiennes vis-à-vis de *L. innocua* LRGIA 01 et *E. coli* XL1 après 24 h de contact selon la norme ISO 20743-2005 pour les textiles traités par méthodologie plasma Ag-SiOCH puissance de dépôt de 300 W encapsulés SiOCH et Al_2O_3

Figure 4-16 : Cinétique de croissance de *L. innocua* LRGIA 01 sur textiles C/P non traité et textiles imprégnés de suspensions d'Ag°-TiO_2 par sol-gel

Figure 4-17 : Cinétique de croissance d'*E. coli* XL1 blue (en haut) et *L. innocua* LRGIA 01 (en bas) sur textiles C/P non traité et textiles imprégnés de suspensions d'Ag°-TiO_2 par sol-gel, après 60 min d'exposition à la lumière UV, 0,5 ; 0,1 et 0,05 mmol/L d'$AgNO_3$ et 2,4 mmol/L TiO_2

Figure 4-18 : Activités anti- *L. innocua* et anti- *E. coli*, suivant la norme 20743/2005, pour les textiles imprégnés de suspensions d'Ag°-TiO_2 par sol-gel, après exposition 60 min à la lumière UV, 0.,5 ; 0,1 et 0,05 mmol/L d'$AgNO_3$ et 2,4 mmol/L TiO_2

Chapitre 5

Figure 5-1 : Suivi de la population de *L. innocua* LRGIA 01, *S. aureus* méthi-R nosoco 3011 et *P. aeruginosa* ATCC 15742 sur textiles blancs non traités et traités au PHMB/LS avant et après 5 et 10 lavages industriels

Figure 5-2 : Evolution de la croissance de *L. innocua* LRGIA 01, *S. aureus* méthi-R nosoco 3011 et *P. aeruginosa* ATCC 15742 sur un textile témoin et sur un textile traité au PHMB/LS 1L CTTN en log (Nb bactéries vertes/g) bactéries viables et non viables dénombrées au microscope à épifluorescence et en log (UFC/g) dénombrées sur milieu gélosé

Figure 5-3 : Clichés de MEB de la surface des échantillons de textiles C/P, Textile non traité en contact avec pendant 24 heures, textile traité au PHMB/LS lavé 10 fois selon le protocole du CTTN en contact avec *L. innocua* LRGIA 01 pendant 24 heures

Figure 5-4 : Illustration de la rotation des marqueurs en fonction de la fluidité membranaire

Figure 5-5 : Anisotropie de fluorescence du DPH et du TMA-DPH de cellules de *L. innocua* LRGIA 01 non traitées, cellules traitées à la ½ CMI et à la CMI du PHMB

Figure 5-6 : Spectre IR témoin de *L, innocua* LRGIA 01, enregistré entre 1000 et 4000 cm^{-1}

Figure 5-7 : Dérivées secondes des spectres IR de *L. innocua* LRGIA 01 (région 2820-2980 cm^{-1}) après contact avec le PHMB à la ½ CMI et à la CMI pendant 4 h

Figure 5-8 : Curve-fitting du spectre IRTF de *L. innocua* LRGIA01 dans la zone des lipides (2830-3000 cm^{-1}) avant traitement au PHMB pour le temps 4 h

Figure 5-9 : Curve-fitting du spectre IRTF de *L. innocua* LRGIA01 dans la zone des lipides (2830-3000 cm^{-1}) après traitement au PHMB à la ½ CMI pour le temps 4 h

Figure 5-10 : Curve-fitting du spectre IRTF de *L. innocua* LRGIA01 dans la zone des lipides (2830-3000 cm^{-1}) après traitement au PHMB à la CMI pour le temps 4 h

Liste des tableaux

Tableaux de la partie « Etude bibliographique »

Tableau 1-1 : Récapitulatif des principaux composés antimicrobiens utilisés pour le traitement des textiles

Tableau 1-2 : Techniques d'application des agents antimicrobiens dans la matière textile

Tableau 1-3 : Caractéristiques des fluorochromes les plus couramment utilisés

Tableau 1-4 : Marqueurs de fluorescence utilisés pour l'étude des membranes

Tableau 1-5 : Effets de différents stress sur la fluidité des membranes bactériennes

Tableaux de la partie « matériels et méthodes »

Tableau 2-1 : Récapitulatif des méthodes et des agents antimicrobiens employés

Tableau 2-2 : Textiles fonctionnalisés par la société HEF (C/P et P/C blancs) avec de l'argent comme antimicrobien déposé par technologie plasma (PVD ou PVD/PECVD)

Tableau 2-3 : Textiles fonctionnalisés par le Laboratoire des Matériaux Génie Physique (C/P blancs).

Tableau 2-4 : Composition de la lessive industrielle Bahia utilisée par la société TDV.

Tableau 2-5 : Composition de la lessive industrielle utilisée par le CTTN

Tableau 2-6 : Caractéristiques et origine des souches bactériennes

Tableau 2-7 : caractéristiques énergétiques (mN/m) des solvants utilisés pour la méthode de MATS selon Bellon-Fontaine *et al.* [4] avec γ_L^{LW} composante de Lifshitz Van der Waals, γ^+_L composante électron-accepteur et γ^-_L composante électron-donneur

Tableau 2-8 : Référence et origine du PHMB utilisés dans le projet Actiprotex

Tableau 2-9 : Concentrations en PHMB testées sur 3 souches sélectionnées

Tableau 2-10 : Quantité des sels considérés à ajouter à 100 g d'eau pour obtenir une solution saturée en sel à 30°C

Tableaux de la partie « résultats »

Chapitre 3

Tableau 3-1 : Récapitulatif des propriétés de surface des 4 souches testées

Tableau 3-2 : CMI du PHMB vis-à-vis de *L. innocua* LRGIA 01, *S. aureus* nosoco 3011 et *P. aeruginosa* ATCC 15742. Les CMI ont été déterminées en milieu gélosé et sont exprimées en mg/L de PHMB

Tableau 3-3 : Dénombrement des cellules de *L. innocua* LRGIA 01 après dépôt de 50 µL sur chaque éprouvette ou de 200 µL répartis sur 4 éprouvettes de textiles C/P blancs. Décrochage au Stomacher 2 min/face et dénombrement sur milieu gélosé TSA

Tableau 3-4 : Comparaison des modes de décrochage (Stomacher 1 minute et 2 minutes par face) et Ultrasons (5 secondes et 10 secondes à 40 kHz par face) pour décrocher *L. innocua* LRGIA 01 du textile C/P après contact

Tableau 3-5 : comparaison du dénombrement de l'inoculum de *L. innocua* LRGIA 01 avec celui des bactéries sur le textile témoin blanc, 65% polyester à T0

Chapitre 4

Tableau 4-1 : Mesures de couleurs des textiles P/C (A) et C/P (B) traités plasma et non traités suivant le système CIE L*a*b quelques jours après le traitement et conservation dans du papier d'aluminium à l'obscurité

Tableau 4-2 : Récapitulatif des références des échantillons traités Ag – SiOCH simultanément en faisant varier les puissances et débit d'argon lors du traitement

Tableau 4-3 : Résultats des analyses XPS faites sur textile P/C après traitement plasma simultané Ag-SiOCH à pression constante (3.10^{-1} Pa) en pourcentage atomique de chaque élément à l'extrême surface

Tableau 4-4 : Récapitulatif des références des échantillons traités Ag encapsulés SiOCH ou Al_2O_3

Tableau 4-5 : Concentrations atomiques XPS de l'argent (% at.) d'une lame de verre recouverte d'Ag/SiOCH (conditions plasma L et H) et des couches d'encapsulation SiOCH (épaisseurs = 50, 200 et 1000 nm). Les dépôts Ag/SiOCH ont été obtenus en utilisant simultanément PVD et PECVD (100 W) (3x10-1 Pa, Ar + HMDSO, puissance pour la pulvérisation PVD : 100 W (condition plasma L) et 300W (condition plasma H)). Les couches d'encapsulation SiOCH ont été obtenues par PECVD (épaisseurs des couches SiOCH = 50, 200 et 1000 nm ; 3x10-1 Pa (Ar et HMDSO, 140 sccm)).

Tableau 4-6 : Concentrations atomiques d'argent (% at.) de la lame de verre recouverte d'Ag/SiOCH (conditions plasma L et H) puis de couches d'encapsulation Al_2O_3 (épaisseurs = 60, 150 et 320 nm). Les dépôts Ag/SiOCH ont été obtenus en utilisant simultanément PVD et PECVD (100 W) (3x10-1 Pa, Ar + HMDSO, puissance pour la pulvérisation PVD: 100 W (condition plasma L) et 300 W (condition plasma H)). Les couches d'encapsulation Al_2O_3 ont été obtenues par PVD (épaisseurs des couches d'encapsulation Al_2O_3 = 60, 150 et 320 nm; 1kW, 3x10-1 Pa, Ar/O2 (96/ 14 sccm)).

Chapitre 5

Tableau 5-1 : Liste des échantillons étudiés et identification des échantillons, textiles C/P, après lavage ECE (L ECE), après traitement antimicrobien PHMB/LS (LS/PHMB) et après lavage industriel selon la norme ISO 15797 (L CTTN) appliqués sur les textiles traités et non traités

Tableau 5-2 : Résultats des analyses XPS en concentration atomique (%) à la surface des échantillons C/P non traités, lavés ECE et CTTN et après traitement antimicrobien au PHMB/LS avant et après lavages CTTN. Les lessives ECE et de la norme ont également été analysées

Tableau 5-3 : Intensités obtenues par ToF-SIMS normalisées et ratios des intensités à la surface de textiles C/P des signatures ToF-SIMS spécifiques du polyester, du coton, du PHMB et du LS

Tableau 5-4 : Activités antimicrobiennes (norme ISO 20743-2005) à 24h de textiles traités au PHMB/LS vis-à-vis de *L. innocua* LRGIA 01, *P. aeruginosa* ATCC 15742 et *S. aureus* NOSOCO 3011 méthi-R avant et après 1, 5 et 10 lavages industriels réalisés au CTTN

Tableau 5-5 : Valeurs d'anisotropie de fluorescence de cellules non traitées au PHMB et de cellules au contact du PHMB à la ½ CMI et à la CMI après 165 minutes de contact

Tableau 5-6 : Ratio des aires sous le pic CH_2 (2924 cm-1) / CH_3 (2960 cm-1) après contact entre les cellules de *L. innocua* LRGIA 01 et le PHMB à la 1/2CMI et à la CMI ou sans traitement au PHMB

Liste des abréviations

AATCC : American Association of Textile, Chemists and Colorists
ADN : Acide DésoxyriboNucléique
AFM : Atomic Force Microscopy
ATCC : American Type Culture Collection
ATP : Adénosine TriPhosphate
BCC : Bouillon Cœur Cervelle
CMI : Concentration Minimale Inhibitrice
CTTN : Centre Technique de la Teinture et du Nettoyage
CVD : Chemical Vapor Deposition (dépôt chimique en phase vapeur)
DAPI : 4',6'-DiAmino-2-PhénylIndole
CTC : Chlorure de 5-Cyano-2,3-ditolyl Tetrazolium
DLC : Diamond Like Carbone
DMSO : DiMéthylSulfOxide
DO : Densité Optique
DPH : 1,6-DiPhényl-1,3,5-Hexatriène
DSC : Differential Scanning Calorimetry
EDX : Energy Dipersive X-Ray analysis (analyse dispersive en énergie)
EPI : Equipements de Protection Individuel
EPS : ExoPolySaccharide
ESCA : Electron Spectroscopy for Chemical Analysis
FUI : Fonds Unique Ministériel
HDMS : HexaMéthylDiSilazane
HMDSO hexaméthyldisiloxane
IFTH : Institut Français du Textile et de l'Habillement
IP : Iodure de Propidium
IRTF : infrarouge à transformée de Fourier
LRGIA : Laboratoire de Recherche en Génie Industriel Alimentaire
LS : LaurylSufate
LSA : Laboratoire des Sciences Analytiques
LMGP : Laboratoire des Matériaux et Génie Physique
MATS : Microbial Adhesion to Solvents
MEB : microscopie électronique à balayage
MET : Microscopie Electronique en Transmission
PC : PhosphatidylCholine
PECVD : Plasma-Enhanced Chemical Vapor Deposition (dépôt chimique en phase vapeur assisté par plasma)
PEG : PolyEthylène Glycol
PHMB : PolyHexaMéthylène Biguanide
PME : Petite et Moyennes Entreprises
PVD : Physical Vapor Deposition (dépôt physique en phase vapeur)
QAC : Quaternary Ammonium Compounds
REACH : Registration, Evaluation and Authorisation of CHemicals
RTI2B : Réparation Tissulaire, Interactions Biologiques et Biomatériaux
SA : Substances Actives
SARM : *Staphylococcus aureus* résistant à la méthicilline
SIMS : Secondary Ion Mass Spectrometry
TIAC : Toxi Infection Alimentaire Collective

TMA-DPH : 1-[4-(TriMéthyl-Amino)-phényl]-6-PhénylHexa-1,3,5-triène
ToF-SIMS : Time of Flight Secondary Ion Mass Spectrometry
TSA : Tryptone Soja Agar
TSB : Bouillon Tryptone Soja
TSYE : Tryptone Soja Yeast Extract
TUT : Textile à Usage Technique
UFC : Unité Formant Colonie
UV : Ultra Violet
VNC : Viable mais Non Cultivable
XPS : X-ray Photoelection Spectroscopy (spectroscopie de photoélections induits par rayons X)

Liste des annexes

Annexe 1 : Composition des milieux de culture

Annexe 2 : article accepté dans la revue Food Control en juillet 2009 “Anti-*Listeria innocua* activity of silver functionalised textile prepared with plasma technology”

Annexe 3 : article accepté dans la revue Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry en août 2010 “Photocatalytic generation of silver nanoparticles and application to the antibacterial functionalization of textile fabrics”

Annexe 4 : article accepté dans la revue SIMS Proceedings Papers en mai 2010 “ToF-SIMS and XPS characterization of antimicrobial textiles for the food processing industry”

Liste des valorisations scientifiques

Articles

E. Chadeau, N. Oulahal, L. Dubost, F. Favergeon, P. Degraeve. Anti-*Listeria innocua* activity of silver functionalised textile prepared with plasma technology. *Food Control* (2010) 21: 505-512

C. Brunon, F. Bessueille, C. Grossiord, **E. Chadeau**, N. Oulahal, C. Darroux, I. Ferreira, M. Bourgeois, F. Simon, F. Rimbault, C. Yu, D. Leonard. ToF-SIMS characterization of antimicrobial textiles for the food-processing industry. *Surface and Interface Analysis* (2011) 43 (1-2): 683-688

M. Messaoud, **E. Chadeau**, C. Brunon, T. Ballet, L. Rappenne, F. Roussel, D. Leonard, N. Oulahal, M. Langlet. Photocatalytic generation of silver nanoparticles and application to the antibacterial functionalization of textile supports. *Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry* (2010) 215: 147-156

C. Brunon, **E. Chadeau**, N. Oulahal, C. Grossiord, L. Dubost, F. Bessueille, F. Simon, P. Degraeve, D. Leonard. Characterization of PECVD-PVD transparent deposits on textiles to trigger various antimicrobial properties to food industry textiles. *Thin Solid Film*. In press.

Communications orales dans des congrès internationaux et nationaux

Communications orales lors de congrès

E. Chadeau, F. Zahrani P. Degraeve, N. Oulahal. Etude de la formation de biofilms sur un textile ; application à *Listeria innocua*, suivi de la croissance et de l'état physiologique en biofilm. *Journée scientifique de l'école doctorale* (EDISS : Ecole Doctorale Interdisciplinaire Science Santé), 19 mars 2008, Lyon, France.

E. Chadeau, N. Oulahal, F. Zahrani, L. Dubost, F. Faverjon, P. Degraeve. Study of the Formation of Biofilm on Untreated and Antimicrobial Textile: Application to *Listeria innocua*. *First International Food Congress*, 4-9 novembre 2008, Ljubljana, Slovénie.

E. Chadeau, N. Oulahal, E. Jelassi, P. Degraeve. Evaluation de l'activité anti-*Listeria* de textiles fonctionnalisés : suivi microbiologique et état physiologique de *Listeria innocua*. *Congrès National de Recherche dans les IUT*, 8-10 juin 2009, Villeneuve d'Ascq, France.

A. Cottaz, **E. Chadeau**, I. Adt, P. Degraeve, N. Oulahal. FTIR spectroscopy a potential tool for evaluation of *Listeria innocua* membrane modification after contact with an antimicrobial agent: PolyHexaMethylene Biguanide. *Food science engineering and technologies*, 15-16 octobre 2010, Plovdiv, Bulgarie.

Communications affichées lors de congrès

E. Chadeau, C. Brunon, P. Degraeve, F. Bessueille, C. Grossiord, I. Ferreira, F. Simon, D. Leonard, N. Oulahal. Evaluation of the physiological state of 2 strains after contact after contact with an antimicrobial treated textile. *First International Meeting on Material / Bioproduct Interactions* (MATBIM), 3-5 Mars 2010, AgroParisTech, Paris, France.

E. Chadeau, C. Brunon, C. Grossiord, P. Degraeve, I. Ferreira, C. Darroux, F. Simon, C. Yu, D. Leonard, N. Oulahal. Modification ; caractérisation et étude de l'activité antimicrobienne d'un textile traité au polyhéxaméthylène biguanide (PHMB) vis-à-vis de *Listeria innocua*, *Pseudomonas aeruginosa* et *Staphylococcus aureus*. *Congrès National de la Société Française de Microbiologie*, 2-4 juin 2010, Marseille, France.

Présentation générale

Présentation générale

L'hygiène est une préoccupation constante du domaine hospitalier ainsi que du domaine des industries agro-alimentaires. En effet, les contaminations microbiologiques des aliments par des micro-organismes d'altération ou pathogènes génèrent respectivement d'importantes pertes économiques et peuvent être à l'origine certaines toxi-infections alimentaires collectives (TIAC) avec d'importantes conséquences potentielles sur la santé publique. Afin de maîtriser ce risque microbiologique, différentes mesures doivent être prises : des démarches de prévention, de destruction, d'inhibition, d'élimination et de compétition des micro-organismes dans les matières premières et dans les produits de transformation, au niveau du matériel et de l'environnement de la production. En 2008, 1124 foyers de TIAC ont été déclarés en France, affectant 12549 personnes, dont 5 sont décédées. Les agents responsables les plus fréquemment incriminés ou suspectés étaient l'entérotoxine staphylococcique (32 % des foyers pour lesquels un agent a été identifié ou suspecté) et les salmonelles (25 % des foyers) mais aucun agent n'a pu être, ni mis en évidence, ni suspecté dans 40 % des foyers déclarés. En ce qui concerne la restauration collective, pour un nombre de 230 foyers où au moins un facteur a été identifié sur l'année 2008, 23 % des facteurs ayant contribué aux TIAC étaient causés par le personnel et 47 % par l'équipement de production par exemple de transformation de l'aliment. Pour la consommation familiale (pour un nombre de foyers pour lesquels au moins un facteur a été identifié), 10 % des facteurs ayant contribué aux TIAC étaient causés par les individus constituant le foyer et 23 % par l'équipement. Ces chiffres sont extraits du rapport de l'Institut National de Veille Sanitaire (INVS).

En ce qui concerne la prévention, tout doit être fait afin d'éviter l'apport de micro-organismes, en particulier pathogènes ou d'altération, à chacune des étapes de la chaîne de fabrication. La contamination microbiologique d'un produit peut être apportée par la matière première et /ou par l'environnement. Les vecteurs de contamination principaux étant l'air, l'eau, le personnel et les surfaces des équipements. Pour minimiser l'apport de ces contaminations, le paquet hygiène a instauré des règles d'hygiène générale. Le paquet hygiène est un ensemble de cinq règlements communautaires, fixant des exigences relatives à l'hygiène des denrées alimentaires et des denrées animales. Les vêtements de travail des opérateurs (blouses, gants…) et des tissus tels que ceux constituant les lavettes, pouvant

constituer un vecteur de contaminations microbiennes, l'industrie textile cherche à développer des textiles antimicrobiens pour en limiter l'incidence.

D'autre part, l'industrie textile est à la recherche de produits innovants et s'oriente de plus en plus vers les textiles dits « techniques » notamment pour faire face à la concurrence. Les « textiles techniques » se définissent comme tous produits ou matériaux textiles dont les performances techniques et les propriétés fonctionnelles (durabilité, résistance aux agressions chimiques, perméabilité ou imperméabilité, résistance thermique…) prévalent sur les caractéristiques esthétiques ou décoratives.

Le marché des textiles bioactifs étant encore relativement récent, il est difficile d'avoir des données économiques. Quelques données sont disponibles pour le secteur hospitalier. Selon Biocide Information, le marché mondial s'élèverait à environ 600 000 tonnes/an de textiles antibactériens et selon le cabinet suisse D&K, la consommation totale de textiles antimicrobiens en Europe est passée de 110 000 tonnes en 2001 à 150 000 tonnes à 2005 (+8,1% par an) (données fournies par l'Institut Français du Textile et de l'Habillement (IFTH)). Les textiles retrouvés dans le milieu hospitalier pour la lutte contre les infections nosocomiales sont les suivants : les produits d'hygiène (les lingettes), les pansements, les filtres, le linge hospitalier, en particulier opératoire. Parmi les produits de ce type déjà commercialisés, on peut citer quelques exemples de fibres dites « bioactives » :

- Aquacel® Ag fabriqué par la société Convatec Limited (USA), qui est une fibre de carboxyméthyl cellulose fonctionnalisée avec de l'argent utilisée pour les pansements,

- Dew® antimicrobial fabriqué par la société Nihon Sanmo Dying (Japon) qui est à base de fibres de coton et de viscose fonctionnalisé avec du cuivre utilisé pour les masques,

- Smartcel™ Biactive fibres fabriqué par la société Smartfiber AG (Allemagne) qui sont des fibres fonctionnalisées avec de l'argent avec diverses applications telles que la literie, les vêtements de sport ou encore les pansements,

- Kerlix AMD™ fabriqué par la société Kendall – Covidien (USA) qui sont des pansements et des bandes fonctionnalisées avec du PolyHexaMéthylèneBiguanide (PHMB)

- Xstatic® fabriqué par la société Noble Fiber Technology (Italie) et qui sont des fibres avec de l'argent ayant diverses applications.

Les différents textiles ou fibres développés et déjà commercialisés proposent donc des applications telles que les pansements, les bandes à usage unique ou les vêtements de sport. Peu d'applications concernant les vêtements de protection sont encore proposées. On peut citer la société Dupont Personal Protection qui propose des vêtements de protection (combinaison DuPontTM Tyvek® Industry) des opérateurs notamment en industries agro-alimentaires avec un traitement antistatique pour empêcher l'adhésion des particules véhiculant des micro-organismes.

C'est dans ce contexte, que le pôle de compétitivité TECHTERA (TEChnical TExtiles Rhône-Alpes) a labellisé un projet de recherche et développement collaboratif : le projet Actiprotex « textiles de protection multi-actifs pour des applications dans les domaines médicaux, professionnels et grand public ». Ce projet a eu comme objectif de mettre au point des textiles de haute technologie pour la prévention de l'adhésion des micro-organismes aux textiles. Il implique 19 partenaires dont 75 % d'industriels répartis dans 7 départements (Rhône, Isère, Ain, Loire, Saône et Loire, Maine-et-Loire et Mayenne). Ce projet a été financé, dans le cadre des appels à projets FUI (Fonds Unique Interministériel), par la Direction Générale des Entreprises (Ministère de l'Economie, des Finances et de l'Emploi), la Région Rhône-Alpes, Le Grand Lyon, les Conseils Généraux de l'Ain, de la Loire et de l'Isère.

Le porteur du projet est la société Biomatech (Chasse-sur-Rhône, Isère) spécialisée dans l'évaluation des dispositifs médicaux, et en particulier leader européen sur l'activité anti-bactérienne de produits médicaux. La coordination est assurée par l'Institut Français du Textile et de l'Habillement (IFTH, Direction Régionale, Ecully, Rhône). Dans ce but, le projet Actiprotex a ainsi rassemblé un ensemble de partenaires disposant de différentes technologies (nouvelles fibres contenant en leur centre de l'argent, nouveaux procédés de dépôt sur textile tels que la technologie plasma ou le sol-gel) pour développer des solutions adaptées à chaque besoin. Ce projet collaboratif a permis de partager les moyens de mise en œuvre et les compétences de l'ensemble des partenaires pour des développements à moindre coût. Le projet s'est articulé en 4 groupes (figure a-1) que sont le groupe 1 pour les dispositifs médicaux internes, les groupes 2a et 2b pour les vêtements de protection respectivement pour le secteur agro-alimentaire et le secteur hospitalier et les groupes 3 et 4 pour les dispositifs médicaux externes et la lingerie.

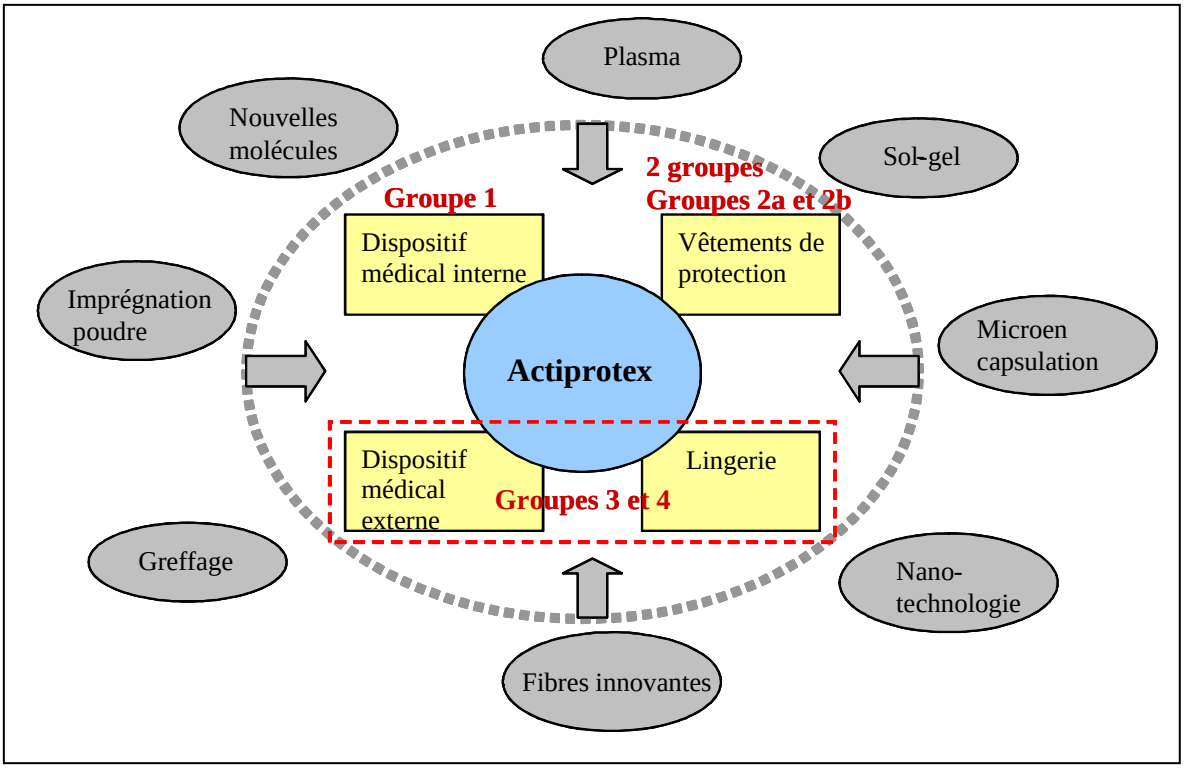


Figure a-1 : Organisation du projet Actiprotex en 4 groupes. Schéma fourni par l'IFTH

C'est dans ce contexte que mon sujet de thèse au sein du Laboratoire de Recherche en Génie Industriel Alimentaire (LRGIA), Equipe d'Accueil (EA) n°3733 de l'Université Claude Bernard Lyon 1, localisé sur le technopole Alimentec à Bourg en Bresse, a été défini. Différents partenaires ont collaboré sur ce sujet notamment la société TDV (Laval, France) qui a fourni les différents supports textiles pour l'agro-alimentaire et coordonné le groupe de travail pour le secteur industriel, la société HEF située à Andrézieux Bouthéon dans la Loire spécialisée dans le traitement plasma, le LMGP (Laboratoire des Matériaux et du Génie Physique – UMR CNRS 5628, Institut National Polytechnique de Grenoble) spécialiste du sol-gel, l'IFTH (Institut Français du Textile et de l'Habillement) situé à Ecully dans le Rhône qui est le centre technique de l'industrie textile. Enfin, le LSA (Laboratoire des Sciences Analytiques) de l'université Lyon 1 et la société Sciences et Surface située à Ecully sont deux spécialistes de la caractérisation de surface.

Le travail présenté dans ce manuscrit a concerné l'étude de l'activité antimicrobienne de textiles fonctionnalisés pour le groupe 2a par différentes technologies (foulardage, sol-gel, traitement plasma) avec différents composés antimicrobiens (argent, ammonium quaternaire, PHMB…) et en la compréhension des mécanismes d'action des antimicrobiens sur des souches bactériennes sélectionnées au début du projet. Les souches sélectionnées en début de

projet sont des souches bactériennes responsables d'infections nosocomiales en milieu hospitalier et/ou de TIA dans le secteur de l'agro-alimentaire ou de souches apparentées.

Les technologies pour fonctionnaliser les textiles avec des composés antimicrobiens employées par les différents partenaires sont le plasma (HEF, Andrézieux Bouthéon, Loire), le Sol-Gel (Laboratoire Matériaux et Génie physique, LMGP, Grenoble, Isère) et le foulardage (IFTH). D'autre part le LSA (Laboratoire des Sciences Analytiques, Lyon, Rhône) et la société Science et Surface (Ecully, Rhône) ont réalisé des analyses de la composition chimique de la surface des textiles pour évaluer la présence de composés antimicrobiens à leur surface suite aux différents traitements.

Le schéma ci-dessous présente les différentes collaborations dans le cadre de ce travail de thèse. En complément des analyses de la composition chimique de surface des textiles réalisées par le LSA et Sciences et Surface, les activités antimicrobiennes des textiles vis-à-vis de différentes souches bactériennes ont été déterminées au LRGIA. Le lien entre la quantité de composés antimicrobiens déposés à leur surface et l'activité antimicrobienne des textiles a pu être évalué. De plus, le LRGIA a étudié les mécanismes d'action des agents antimicrobiens sur les bactéries qui y sont sensibles notamment par l'utilisation de la microscopie à épifluorescence, de la spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier ou encore de la spectrofluorimétrie en présence de sondes fluorescentes permettant d'évaluer la fluidité membranaire des bactéries cibles.

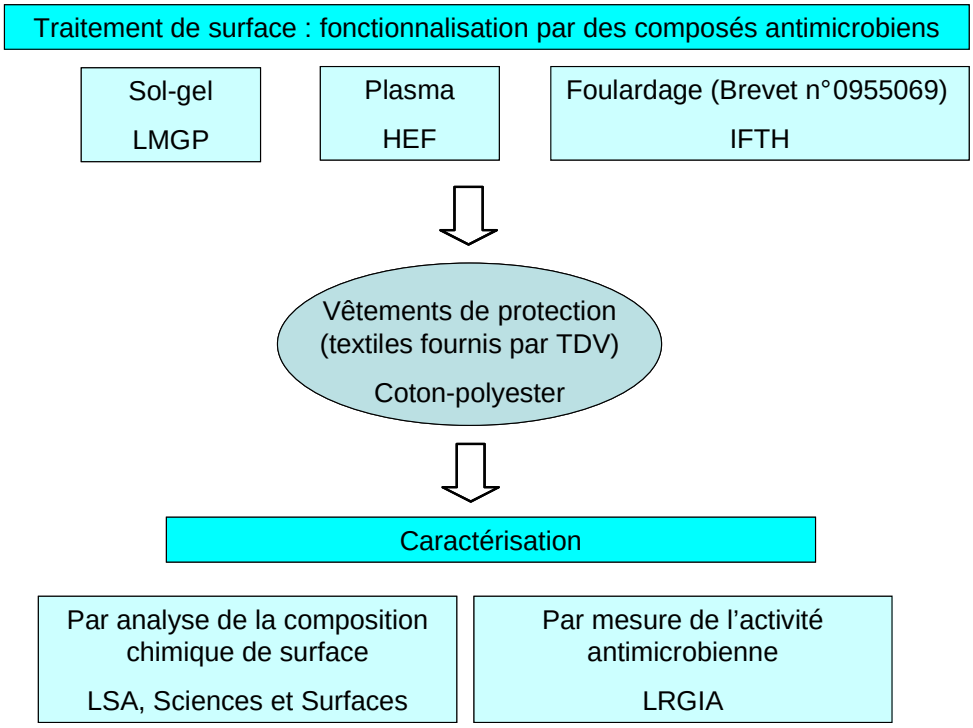


Figure a-2 : Collaboration des différents partenaires au sein du groupe 2a

Ce document s'articule en 3 parties :

- La première partie est une synthèse bibliographique qui présente les principales données bibliographiques concernant, d'une part les textiles antimicrobiens, les différentes techniques d'analyse de ces textiles ainsi que les méthodes de caractérisation de leur surface et d'autre part, les méthodes permettant la compréhension des mécanismes d'action des agents antimicrobiens.

- L'ensemble des parties expérimentales concernant les différents protocoles mis en place au LRGIA et utilisés pour le projet Actiprotex sont présentés dans la seconde partie (matériels et méthodes)

- La troisième partie est consacrée aux résultats et s'articule en 3 chapitres :

  - Un premier chapitre concernant la fonctionnalisation d'un textile avec de l'argent par méthodologie plasma ou sol-gel, la caractérisation de sa surface et l'évaluation de son activité antimicrobienne ;

  - Un second chapitre relatif à la fonctionnalisation d'un textile en utilisant un agent précipitant et un agent antimicrobien selon le brevet EP n°0 955 069, la caractérisation et l'évaluation de son activité antimicrobienne avant et après lavages industriels et la mise en évidence de bactéries viables non cultivables par microscopie à épifluorescence ;

  - Enfin, un troisième chapitre sur l'étude du mode d'action du PHMB vis-à-vis de *Listeria innocua* LRGIA 01 avec la contribution de la spectrofluorimétrie en présence de sondes fluorescentes de fluidité membranaire et de la spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier pour l'étude du mécanisme d'action de ce composé antimicrobien.

Chapitre 1 : Etude bibliographique

Chapitre 1 : Etude Bibliographique

1. Les textiles antimicrobiens 31
1.1. Fabrication des textiles et vêtements de protection 31
1.2. Modes de fonctionnalisation des tissus et molécules antimicrobiennes utilisées 34
1.2.1. Les molécules antimicrobiennes 34
1.2.1.1. L'argent 37
1.2.1.2. Les ammoniums quaternaires : 40
1.2.1.3. Le chlorhydrate de polyhexaméthylène biguanide (PHMB) 42
1.2.2. Modes de fonctionnalisation des tissus pour introduire des propriétés antimicrobiennes 45
1.2.2.1. Le traitement plasma 46
1.2.2.2. La méthodologie sol-gel 51
1.3. Méthodes de caractérisation des textiles 54
1.3.1. La spectroscopie de photoélectrons induits par rayons X (XPS) 54
1.3.2. La spectrométrie de masse d'ions secondaires (ToF-SIMS) 56
1.4. Méthodes d'évaluation de l'activité antimicrobienne des textiles fonctionnalisés 57
1.4.1. Présentation des différentes méthodologies 57
1.4.2. Méthodes *in vitro* : norme ISO 20743-2005 58

2. Méthodes d'étude de l'effet des textiles antimicrobiens sur les micro-organismes..... 60
2.1. Description et définition des biofilms 61
2.2. Les biofilms en industries agro-alimentaires et les risques microbiologiques liés 63
2.3. Comportement des biofilms vis-à-vis des agents antimicrobiens 64
2.4. Caractérisation des propriétés de surface des souches bactériennes : méthode MATS (Microbial Adhesion to Solvents) 66
2.5. Evaluation de la viabilité des micro-organismes par microscopie à épifluorescence 67
2.5.1. Principe 67
2.5.2. Les fluorochromes 70
2.5.3. Le kit d'évaluation de la viabilité des micro-organismes : Live/Dead® Baclight™ 72
2.6. Evaluation de la fluidité membranaire des micro-organismes par spectrofluorimétrie 74
2.6.1. La membrane cytoplasmique bactérienne : lipides et fluidité membranaire 74
2.6.2. La polarisation de fluorescence et les marqueurs utilisés 76
2.6.3. Effet de différents stress sur la fluidité de la membrane cytoplasmique des bactéries 80
2.7. Etude de la membrane des micro-organismes par spectroscopie Infrarouge à Transformée de Fourier (IRTF) 82

3. Conclusion 84

4. Références bibliographiques 85

Chapitre 1 : Etude Bibliographique

La problématique de la contamination des produits alimentaires au cours de leur production ou encore l'apparition des infections nosocomiales dans le domaine hospitalier renforcent la nécessité d'une meilleure maîtrise de la sécurité microbiologique reposant notamment sur la prévention du risque de contamination. Dans le cadre de cette prévention, la création de textiles antimicrobiens apparaît être une solution pertinente. En effet, le risque de contamination peut être dans certains cas lié à l'opérateur et à ses vêtements de travail, le textile pouvant être un vecteur de contamination du fait de sa composition naturellement propice au développement microbien au sein des fibres de coton notamment.

Au sein de ce chapitre, une revue bibliographique sur les textiles antimicrobiens sera présentée dans une première partie, elle sera focalisée sur la fonctionnalisation de ces derniers. Les agents antimicrobiens utilisés pour cette fonctionnalisation seront présentés avec notamment le PHMB, l'argent ou encore les ammoniums quaternaires tous trois employés dans le cadre de ces travaux de thèse. Par la suite, les méthodes de fonctionnalisation des textiles dans l'objectif de les rendre antimicrobiens seront exposées avec notamment l'utilisation du traitement plasma ou de la méthodologie sol-gel également utilisés au cours de ces travaux. Afin d'estimer la quantité de composés antimicrobiens déposés à la surface des textiles, une présentation et une description des techniques de caractérisation de la composition chimique de la surface des textiles seront effectuées. Dans une seconde étape, les techniques d'étude de l'action antimicrobienne des textiles seront présentées. Cette partie constituant le cœur de ce travail de thèse, elle se compose de plusieurs parties présentant :

- les protocoles de mesure de l'activité antimicrobienne basés sur la mise en culture des bactéries cibles,
- les techniques d'évaluation de l'état physiologique des bactéries cibles basées sur la microscopie à épifluorescence couplée à l'emploi de fluorochromes,
- les techniques permettant de préciser les mécanismes d'action des composés antimicrobiens sur les bactéries cibles un focus sur la spectrofluorimétrie avec évaluation de la fluidité de la membrane des bactéries par l'utilisation de sondes fluorescentes et la spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier a été effectué car ces 2 techniques ont été employées pour étudier les modifications de la membrane des bactéries cibles induites par le PHMB.

1. Les textiles antimicrobiens

Avant de focaliser notre étude sur les « textiles antimicrobiens » (méthodes de fonctionnalisation et agents antimicrobiens pouvant être utilisés), un paragraphe est d'abord consacré à la fabrication des textiles d'une façon générale.

1.1. Fabrication des textiles et vêtements de protection

Un textile est le nom donné à toute étoffe ou matériau réalisé à partir de fibres ou de filaments (naturels ou synthétiques, organiques ou minéraux) ou de matériaux textiles. Parmi les textiles, on trouve des mats de fibres (pansements, filtres, feutres), des mèches (pansements), des fils (à coudre, à tricoter, à tisser), les tricots (rectilignes, circulaires), les tissus (traditionnels, Jacquard, multiples, double face…) et bien d'autres. On peut distinguer trois types de textiles : les textiles d'origine naturelle, ceux d'origine synthétique et ceux d'origine artificielle.

La première étape pour la fabrication de tissu est le tissage. Il s'agit d'une technique d'entrecroisement de fils qui permet de réaliser un tissu. Il se réalise sur des métiers à tisser sur lesquels sont tendus dans le sens de la longueur une série de fils dits "fils de chaîne" et dans le sens de la largeur, perpendiculairement aux précédents un ensemble de fils dits "fils de trame". Différents prétraitements et traitements du textile sont réalisés avant sa commercialisation. Parmi ces traitements, le blanchiment et l'azurage ont pour but de blanchir le tissu. Lors du blanchiment, le tissu peut conserver un aspect jaunâtre et l'azurage qui lui succède permet d'éliminer ce défaut en appliquant un colorant bleu ou violet en faible quantité dans le but de raviver l'éclat du blanc. Les autres traitements peuvent être la teinture, l'impression et l'apprêtage, c'est-à-dire le fait de déposer un apprêt ou une molécule pour rendre le textile plus doux par exemple [1].

La région Rhône-Alpes est la première région française dans les secteurs du textile et de l'habillement. Ces secteurs rassemblent 38 500 emplois et 1 778 entreprises (essentiellement des PME). C'est aussi la seule région qui couvre tous les métiers de la filière (production du fil, filature, tissage, enduction et confection jusqu'au produit fini).

Dans un secteur textile fortement en déclin, certains industriels ont opté pour une diversification ou une réorientation dans les textiles techniques. Cette industrie du textile technique regroupe environ 200 entreprises d'une vingtaine de salariés et plus [2]. Une des caractéristiques essentielles de cette industrie est l'innovation, la recherche et le développement, nécessaires pour répondre aux spécificités des cahiers des charges de ces

textiles. Les débouchés de ces textiles techniques sont multiples mais trois domaines d'application dominent : l'industrie, le médical et le transport.

Les vêtements de protection font partie des "équipements de protection individuelle" (ou EPI). Cet équipement est destiné à être porté ou tenu par le travailleur pour le protéger des risques au travail. Différentes normes européennes en vigueur définissent les vêtements de protection : la norme EN 340 pour les vêtements de protection (exigences générales), la norme EN 343 pour les vêtements de protection contre les intempéries, les normes EN 381-5 et prEN 381-11 pour les vêtements de protection anticoupures et la norme EN 471 pour les vêtements de signalisation à haute visibilité [3].

Le 7 janvier 2008, la Commission européenne a publié une communication qui identifie un ensemble de marchés susceptibles de devenir « porteurs ». La santé en ligne, les textiles de protection, la construction durable, le recyclage, les bioproduits ainsi que les énergies renouvelables ont été identifiés comme tels. Cette initiative vise à développer des marchés de produits et de service innovants. La taille actuelle du marché des EPI est estimée à 1 milliard d'euros et son potentiel de croissance est d'environ 50 % sur les prochaines années [4].

Les entreprises qui développent l'industrie des textiles techniques emploient 19 000 salariés et réalisent un chiffre d'affaires de 3,5 milliards d'euros dans le monde [2]. En France, les unités de production sont essentiellement localisées dans l'Est et le Nord, à proximité des deux régions phares du textile : la région Rhône-Alpes et la région Nord-Pas-de-Calais.

Les tissus à usage technique (TUT) sont des matériaux textiles répondant à des exigences techniques et qualitatives élevées. Le textile technique peut se définir comme tout produit ou matériau textile dont les performances techniques et les propriétés fonctionnelles prévalent sur les caractéristiques esthétiques ou décoratives. Leurs performances mécaniques, thermiques et électriques leur confèrent une aptitude à s'adapter à une fonction industrielle et technique. La consommation mondiale de textiles techniques est en hausse constante depuis 1995 et la valeur de ce marché est passée de 65 à 85 milliards d'euros entre 1995 et 2005 [5].

Dans ce contexte, il faut également citer les conduits en tissu ou gaines textiles. Il y a environ 12 ans, le premier échantillon de gaine textile baptisé « chaussette » provenait de Scandinavie [6] et a été utilisé en Europe. Il s'agissait de gaines en tissu coton ou polyamide et la diffusion d'air se faisait au travers des « pores » du tissu après avoir été mise sous pression par le ventilateur. De plus, il fallait tenir compte d'un critère assez nouveau, à savoir « le taux d'encrassement », la gaine pouvant aussi servir de filtre à air si aucun filtre suffisamment efficace n'était installé en amont de cette dernière. Il fallait donc envisager un lavage en machine régulier, rendu possible vu le tissu utilisé. Les premiers utilisateurs en France ont été

les industriels agro-alimentaires. Ces derniers avaient en main une solution efficace de diffusion d'air qui leur assurait confort des occupants, homogénéité des températures et absence de courants d'air malgré des conditions de températures comprises entre 5 et 10 ° C. Le fait de pouvoir enfin laver aisément les gaines (facilité de démontage et de montage, choix de tissus lavables) a terminé de conquérir définitivement l'industriel agro-alimentaire français dans sa très grande majorité. S'ouvrant à d'autres applications, changeant de tissu et de mode de diffusion au gré des besoins et des contraintes, qu'ils soient d'ordre réglementaire, dimensionnel ou technique, la « chaussette » a changé de vocable pour devenir la gaine textile diffusante.

Les textiles possèdent de nombreuses applications dans la vie de tous les jours et il apparaît important de développer de nouvelles fonctionnalités afin d'assurer la protection des utilisateurs vis-à-vis des potentielles contaminations par les micro-organismes.

Leur grande superficie et leur capacité à retenir l'humidité font des textiles une surface idéale pour le développement microbien. Les vêtements ou tout autre matériau textile agissent donc comme de potentiels réservoirs de micro-organismes pour des contaminations futures.

La panoplie des tenues de travail est vaste : vestes, tabliers, charlottes, combinaisons, gilets. Les vêtements de protection ont un double rôle, celui de sécuriser les personnes qui les portent d'une part, et d'autre part, de constituer une barrière la plus infranchissable possible, entre le corps et l'environnement de travail : protéger les aliments préparés des contaminations biologiques dont sont vecteurs les vêtements civils par exemple.

Les vêtements professionnels portés par le personnel en cuisine ont ainsi pour but de protéger les produits alimentaires des contaminations liées à la présence humaine (expectoration, sueur, desquamation de la peau ...). Mais de par leur utilisation de protection, les vêtements professionnels salis deviennent eux-mêmes des vecteurs de contamination et peuvent à ce titre véhiculer de nombreux micro-organismes, avec notamment la présence de bactéries au sein des fibres de textile et en quantité plus importante lorsque ceux-ci sont humides. Par exemple, *Staphylococcus aureus* a été retrouvé sur des textiles portés par le personnel de l'hôpital [7] ou par les chirurgiens au niveau des salles d'opérations [8]. Par conséquent ces textiles doivent être régulièrement lavés et/ou posséder un traitement à leur surface pour éviter la sur-contamination.

La création de textiles antimicrobiens apparaît donc un sujet important. Différents composés antimicrobiens (argent, ammoniums quaternaires, PHMB) peuvent être employés pour fonctionnaliser les textiles selon différents modes de dépôt (traitement plasma, méthodologie sol-gel).

1.2. Modes de fonctionnalisation des tissus et molécules antimicrobiennes utilisées

1.2.1. Les molécules antimicrobiennes

Les agents antimicrobiens sont des molécules ayant la capacité de détruire les micro-organismes (biocides) ou d'empêcher leur croissance (biostatiques).

Ces agents sont plus efficaces en suspension. En effet, leur immobilisation à la surface d'un textile ou leur incorporation dans les fibres limite leur disponibilité et réduit par conséquent leur activité.

Les revêtements antimicrobiens doivent combiner plusieurs attributs : une efficacité antibactérienne, préserver l'environnement, une faible toxicité vis-à-vis des cellules eucaryotes et une facilité de préparation.

Les molécules antibactériennes pouvant être utilisées pour la fonctionnalisation de textiles sont nombreuses. Il existe également des textiles anti-acariens (textiles destinés à lutter contre certains types d'allergies à base de pyrèthre et de pyréthrinoïdes de synthèse, tels que la perméthrine) ou antifongiques. Les molécules les plus utilisées dans le domaine du textile sont les suivantes : le triclosan et ses dérivés, les zéolithes (aluminosilicates d'argent et de cuivre ou d'argent et de zinc), les ammoniums quaternaires, les poudres minérales (argent et cuivre), les phénols, les polyphénols, le chitosane, les ions argent sur support céramique…

Les molécules les plus couramment utilisées sont présentées dans le tableau 1-1. Toutes les molécules actives ne peuvent pas être utilisées pour fonctionnaliser tous les types de tissus naturels (lin, coton…) ou synthétiques (polyester, polyamides…) [9]. En effet, la compatibilité des fibres pour la fixation de ces molécules est variable.

Pour pouvoir être utilisées, ces molécules doivent être présentes dans la liste de la directive biocide 98/8/CE et doivent être autorisées par le règlement REACH (Registration, Evaluation and Authorisation of CHemicals).

REACH est un règlement de l'Union Européenne sur les substances chimiques entré en vigueur le 1er juin 2007. En vertu de ce règlement, toutes les substances chimiques produites ou importées à plus d'une tonne par an et par fabricant ou importateur, y compris celles qui circulent déjà, devront faire l'objet d'une analyse de risques et être testées par leurs fabricants ou importateurs dans les onze prochaines années. L'objectif principal du règlement REACH est de « Garantir un haut niveau de protection pour la santé humaine et l'environnement ainsi

qu'une libre circulation des substances, en tant que tel, en mélange ou dans les articles, tout en renforçant la compétitivité et l'innovation ».

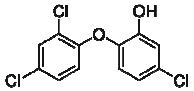
En effet, dans ce règlement, un textile est considéré comme un « article » qui se définit comme « un objet auquel sont donnés, au cours du processus de fabrication, une forme, une surface ou un dessin particuliers qui sont plus déterminants pour sa fonction que sa composition chimique », avec par exemple les vêtements, le linge de maison. Les lignes directrices d'aide à la mise en œuvre de REACH sur les articles sont dans le RIP 3.8 (projet pour la mise en œuvre de REACH) : « guidance on fulfilling the requirements for articles » [10]. Au sens du règlement, les produits biocides sont « des substances actives (SA) et les préparations contenant une ou plusieurs substances actives qui sont destinées à détruire, repousser ou rendre inoffensifs les organismes nuisibles, à en prévenir l'action ou à les combattre de toutes autres manières, par une action chimique ou biologique ». Dans la directive « biocides » (Directive n°98/8/CE du 16/02/1998 concernant la mise sur le marché des produits biocides), on distingue 23 types de produits biocides répartis en 4 groupes :

- **Groupe 1 : Désinfectants** (Type 1 à 5)
- **Groupe 2 : Produits de protection** (Type 6 à 13) dont le type 9 représentant les produits de protection des fibres, du cuir, du caoutchouc et des matériaux polymérisés, ce qui est le cas des textiles.
- **Groupe 3 : Produits antiparasitaires** (Type 14 à 19)
- **Groupe 4 : Autres produits biocides** (Type 20 à 23)

L'objectif général étant la mise sur le marché et l'utilisation de produits biocides dont les risques liés à l'utilisation sont valablement maîtrisés et suffisamment efficaces : un produit ne peut être mis sur le marché ni utilisé, s'il n'a pas fait l'objet, au préalable, d'une autorisation.

Trois types de molécules biocides intéressantes de par leurs spectres d'action et leur possible utilisation en agro-alimentaire seront employées et donc présentées plus spécifiquement par la suite : l'argent, les ammoniums quaternaires et le PolyHexaMéthylène Biguanide (PHMB).

Tableau 1-1 : Récapitulatif des principaux composés antimicrobiens utilisés pour le traitement des textiles

Agents antimicrobiens	**Propriétés**	**Mode d'action et structure moléculaire**	**Avantages**	**Inconvénients**	**Domaines d'application**
Argent dans des supports de type « zéolithes » [11]	- Minéraux ou aluminosilicates alcalins naturels ou synthétiques - Structure très poreuse sillonnée de nombreux petits canaux qui contiennent généralement de l'eau - Liés à des ions argent et cuivre ou argent et zinc	- Détachement des ions métalliques des cristaux, destruction des bactéries en bloquant les groupes thiols des protéines membranaires - Les zéolithes créent, au sein du réseau cristallin, des différences de potentiel suffisantes pour réaliser une électrolyse de l'eau et libérer des formes actives de l'oxygène qui oxydent et détruisent les membranes bactériennes $Na_{x1}\ Ca_{x2}\ Mg_{x3}\ K_{x5}\ Al_{x6}\ [Si_{x7}\ O_{x8}]_{x9}\ H_2O$	- Non toxique aux concentrations habituelles d'utilisation - Gardent leur activité après plusieurs lavages - Les bactéries ne semblent pas disposer de mécanisme leur permettant d'échapper à l'action de l'oxygène		- Produits destinés au grand public
Le triclosan (2,4,4'-trichloro-2'hydroxydiphényl éther)	- Composé phénolique qui possède des propriétés antimicrobiennes et anti-inflammatoires - Large spectre d'action : CMI de moins de 10 ppm [12] - Peut être déposé directement sur les fibres [13] ou par micro-encapsulation [14]	- Large spectre d'action : inhibition de l'énoyl réductase, enzyme indispensable à la synthèse des lipides de la membrane bactérienne [15] 	- Large spectre d'action - Non toxique - Toléré par l'homme : non cancérigène, non mutagène, ne pose pas de problèmes d'irritation de la peau ou des yeux - Lorsqu'il est utilisé sur des tissus il diffuse quel que soit le mode de fixation utilisé [15]	- Présence de mutants bactériens résistants - Produit une odeur désagréable dans un procédé qui dégage de la chaleur [15]	- Produits destinés au grand public (savon, dentifrice, crème de beauté…)
Le PHMB Polyhexaméthylène biguanide	- Possède une légère acidité - Présente un caractère chélatant et floculant - Polymère cationique formé de groupes biguanides liés par des chaînes hexaméthylènes	- Adhésion du PHMB à la surface de la cellule puis fuite de composants cytoplasmiques due à la perturbation de la perméabilité membranaire, puis précipitation *in situ* du contenu de la cellule (protéines et acides nucléiques) - Le PHMB agit spécialement sur les phospholipides de la membrane cytoplasmique [16]	- Agent puissant avec un large spectre d'action -Toxicité faible pour la peau, les yeux et par ingestion, aux concentrations usuelles	- Possède de nombreuses incompatibilités chimiques : il se complexe avec la plupart des cations métalliques et est incompatible avec les produits anioniques (formation d'un précipité blanc) - Action limitée sur les champignons et les spores	- Désinfection des surfaces en contact avec les denrées alimentaires - Désinfection des eaux de piscine [17] - Traitement de fibres cellulosiques [18] et de fibres synthétiques [19] - Application au coton [20], au polyester et au nylon - Application aux pansements
Les ions Ag^+	- L'argent est l'agent antimicrobien le plus utilisé dans le traitement des textiles [21] - Sa concentration minimale inhibitrice contre *Escherichia coli* est de 0,05 à 1 mg/L [22] - L'argent peut être incorporé directement dans les fibres ou par éléctrofilage [23].	- L'interaction des ions Ag^+ avec les groupements thiol des enzymes et des protéines induit l'inactivation des bactéries - La membrane cytoplasmique est la cible principale des ions Ag^+, où ils provoquent une fuite des ions K^+ et ils interagissent également avec les acides nucléiques [24]	- Inhibe la croissance, détruit la paroi et le contenu cellulaire de *Pseudomonas aeruginosa* qui est une souche résistante à plusieurs agents antimicrobiens [25] - Efficace contre les SARM (*Staphylococcus aureus* résistants à la méthicilline) -Non toxique	- Problèmes techniques (oxydation) et environnementaux (pollution) [35] - Diminution de l'activité des textiles traités après plusieurs lavages - Action limitée contre les champignons, certains virus et les bactéries Gram-	- Traitement des fibres synthétiques, polyester, nylon, coton… - Application aux pansements
Les composés d'ammoniums quaternaires (QAC)	- Agents cationiques largement utilisés comme antiseptiques et désinfectants, particulièrement ceux qui contiennent des chaînes de 12-18 carbones [17] - La concentration minimale inhibitrice contre les bactéries Gram + et les bactéries Gram - est de 10-100 mg/mL [26] - En solution, les QAC portent une charge positive sur l'atome d'azote [17] - L'attachement des composés au textile est assuré par des interactions ioniques [27]. Un prétraitement qui augmenterait les sites anioniques sur le textile peut donc favoriser la fixation des QACs [28]	- L'adsorption et la pénétration de l'agent dans la cellule bactérienne et son interaction avec les phospholipides engendre une désorganisation de la membrane cytoplasmique, une lyse des protoplastes ainsi qu'une dégradation des protéines et des acides nucléiques entraînant une perturbation de la structure cellulaire et une perte de l'intégrité membranaire [29].	- Les QACs gardent leur activité antimicrobienne tant qu'ils restent attachés aux textiles [30] - Résistent à 10 lavages - Large spectre d'action	- Existence de bactéries résistantes [41]	- Utilisés dans plusieurs traitements cliniques comme la désinfection de la peau - Nettoyage des surfaces et désodorisation [17] - Application au nylon, au coton et au polyester

1.2.1.1. L'argent

Depuis des siècles, l'argent a été utilisé dans le traitement des brûlures ou des plaies. Son activité antibactérienne dépend de sa quantité mais surtout de la quantité d'argent relargué. L'argent peut se présenter sous diverses formes : l'argent métallique, le sulfate d'argent (ou argent sulfadiazine), l'acétate d'argent, le nitrate d'argent ou encore fixé à des zéolites (figure 1-1) mais c'est sous forme d'ions qu'il est le plus souvent actif [31]. Différents auteurs ont étudié l'effet de l'argent sous ces différentes formes et sur diverses souches bactériennes [32].

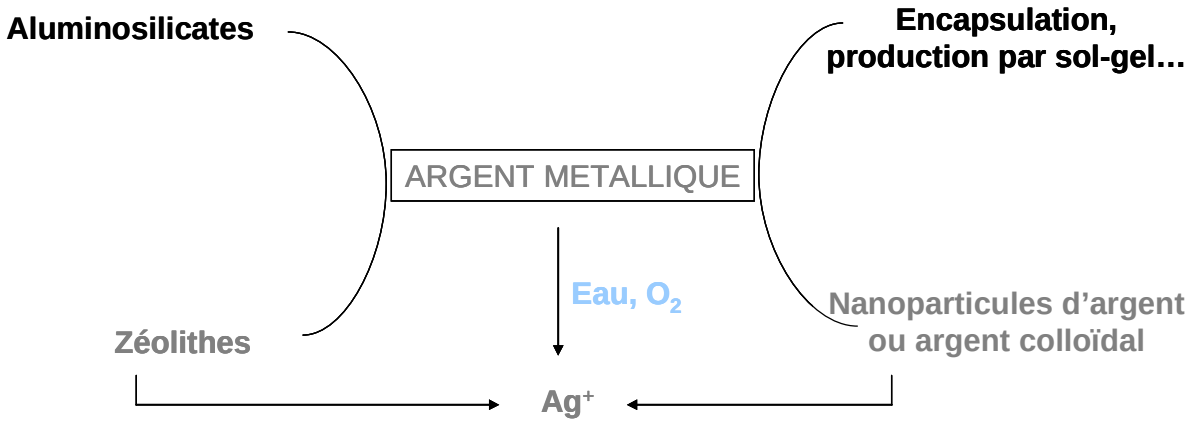


Figure 1-1 : Différentes formes d'argent pouvant être retrouvées [33]

L'argent métallique est relativement peu réactif, mais dans un environnement aqueux, il peut se ioniser et des ions Ag^+ sont relargués [34]. L'argent ionisé est beaucoup plus réactif et est capable de se fixer aux cellules bactériennes entraînant des changements structuraux et la mort cellulaire [33]. Cependant, Bataresh [35] a mis en évidence une efficacité 32 fois plus importante lorsque l'argent se présente sous forme de complexes c'est-à-dire chélaté que lorsqu'il se trouve sous forme d'ions Ag^+. Ceci s'explique par le fait que lorsque l'argent se trouve à l'intérieur d'un complexe et non sous forme d'ions libres, il parait « protégé » des différents mécanismes de résistance de la cellule hôte. Silver *et al.* [36] et d'autres auteurs ont montré qu'il existait des mécanismes de résistance des bactéries à l'argent. Cette résistance bactérienne à l'argent est fréquemment codée par des gènes localisés sur des plasmides et dans certains cas localisés sur le chromosome. L'exemple le plus étudié est celui du plasmide pMG101 de *Salmonella* [37] qui code pour la résistance aux ions Ag^+, Hg^{2+} et au tellurite ainsi qu'à divers antibiotiques.

Yamanaka *et al.* [38] ont étudié l'activité antimicrobienne d'ions argent vis-à-vis d'*Escherichia coli*. Une solution aqueuse d'ions argent à 900 ppm a été préparée. Cette même solution ont été placés en contact avec 10^7-10^8 UFC/mL d'*Escherichia coli* pendant 30

minutes, 3 heures et 24 heures. Un dénombrement sur milieu gélosé a ensuite été effectué pour évaluer la quantité de bactéries cultivables. Lors du contact des cellules de cette souche avec la solution d'argent à 900 ppm, une diminution exponentielle du nombre de cellules en fonction du temps d'exposition a été observée. En effet, pour une concentration initiale de 10^7-10^8 UFC/mL, des concentrations résiduelles de 10^6 UFC/mL et de 10 UFC/mL ont respectivement été obtenues au bout de 3 heures et de 24 heures. Des images observées en microscopie électronique à transmission ont montré que les cellules en contact avec la solution d'argent à 900 ppm pendant 30 minutes et 3 heures ont conservé un aspect morphologique normal. Les cellules en contact avec cette même solution d'argent pendant 24 heures ont quant à elles présenté les différentes phases du processus de mort cellulaire. Ces différentes observations montrent que l'argent possède une action bactéricide qui s'explique dans un premier temps par une interaction avec les composants du cytoplasme à l'intérieur de la cellule car les ions Ag^+ semblent traverser la cellule par des canaux sans causer de dommages. Les résultats de cette étude ont également indiqué qu'une des activités antimicrobiennes des ions argent est due à l'interaction de ceux-ci avec les ribosomes. Celle-ci entraine en effet la suppression de l'expression d'enzymes et de protéines essentielles à la production d'ATP.

Pal *et al.* [39] ont montré que l'activité antimicrobienne de nanoparticules d'argent dépend de leur forme. En effet, lorsque les nanoparticules sont sous forme sphérique il faut une quantité 50 à 100 fois plus élevée d'argent pour observer 100 % d'inhibition par rapport à des nanoparticules d'argent sous forme triangulaire. Les différences observées peuvent être expliquée en termes de « facettes actives » présentes au sein des nanoparticules de différentes formes. En effet, sous forme triangulaire, les faces des nanoparticules possèdent une grande densité en atomes permettant une interaction directe avec la surface de la cellule bactérienne, de ce fait les nanoparticules triangulaires sont plus actives que les nanoparticules sphériques qui possèdent une densité plus faible.

Il existe diverses applications de la micro-encapsulation dans le domaine des textiles [40] notamment celle d'agents antimicrobiens. Actuellement, il est possible d'immobiliser de nombreux types de nanoparticules ou nanostructures sur une fibre afin d'apporter de nouvelles fonctions au produit fini comme par exemple une activité antimicrobienne. L'argent peut être utilisé sous forme de nanoparticules mais également fixé à des zéolithes (minéral microporeux appartenant au groupe des silicates). En effet, Dubas et *al.* [41] ont fixé des nanoparticules d'argent en plusieurs couches sur de la soie et du nylon et l'activité

antimicrobienne de ces fibres a été estimée vis-à-vis de *Staphylococcus aureus*. Le dépôt de nanoparticules d'argent sur ces fibres a entraîné une réduction de 80% de la croissance microbienne dans le cas de la soie et de 50 % dans le cas du nylon. Cette technique s'avère donc intéressante pour la modification de fibres dans le but de rendre le produit fini antimicrobien.

Matsumura *et al.* [42] ont évalué l'activité antimicrobienne de zéolithes d'argent vis-à-vis d'*Escherichia coli*. Les résultats montrent que la suspension de zéolithes d'argent à 100 mg/L réduit le nombre de cellules viables et que cette activité est plus importante à forte température (42°C) et à pH élevé (8,5). Les zéolithes d'argent ont été incubées en absence de bactéries pendant 1 heure à 37°C puis centrifugées. Le surnageant a ensuite été mis en présence d'*Escherichia coli* et aucune activité antimicrobienne n'a pu être détectée. Ces résultats suggèrent que les zéolithes d'argent doivent entrer en contact avec les cellules pour exercer leur action bactéricide.

L'argent peut également être utilisé pour déstabiliser ou détruire les biofilms. En effet, Chaw *et al.* [43] ont réalisé des essais permettant de détruire l'exopolysaccharide (EPS) de la membrane de *Staphylococcus epidermidis* grâce à l'action des ions argent dans le but d'évaluer l'implication de ces ions dans la déstabilisation des forces d'adhésion intercellulaire à l'intérieur même d'un biofilm. Il a également été démontré que les ions argent ne sont pas actifs vis-à-vis des bactéries qui se trouvent au sein du biofilm. Ceci pouvant être dû à un piégeage des ions argent par le biofilm les empêchant de pénétrer au sein même du biofilm (le processus détaillé n'a pas été décrit dans ce cas) ou à une complexation des ions Ag^+ après leur interaction avec l'EPS. L'utilisation de l'AFM (Atomic Force Microscopy) comme outil de mesure quantitatif des forces intermoléculaires impliquées dans la formation du biofilm se montre ici intéressante pour évaluer les changements après contact avec les ions Ag^+. Ainsi, un biofilm de *S. epidermidis* a été déposé sur l'instrument de mesure de l'AFM (tip) et les forces intermoléculaires ont été mesurées dans le but de connaître l'effet des ions Ag^+ sur le biofilm. Grâce à l'AFM, les auteurs [43] ont pu mettre en évidence un déplacement dans la distribution des forces d'adhésion intermoléculaires. Ces résultats prouvent que les ions Ag^+ déstabilisent la matrice du biofilm.

Que ce soit sous forme de nanoparticules, fixé à des zéolithes ou sous forme d'ions, seule une partie du mode d'action de l'argent est à ce jour élucidée.

Feng *et al.* [32] ont observé des changements morphologiques et structuraux de cellules bactériennes dans le but de comprendre l'effet antibactérien de l'argent. Dans cette étude,

deux méthodes ont été utilisées : la microscopie électronique à transmission (TEM) et la microanalyse aux rayons X afin d'observer et d'identifier les changements morphologiques d'une cellule bactérienne lors d'un traitement à l'argent. Deux souches bactériennes (*Escherichia coli* ATCC 23282 et *Staphylococcus aureus* ATCC 35696) ont été traitées avec de l'$AgNO_3$ (10 µg/mL) pendant 4 à 12 heures puis l'aspect de ces cellules a été comparé à une culture témoin sans traitement. Dans les deux cas, on observe le même type de phénomène : le cytoplasme se détache de la membrane avec au centre de la cellule, l'apparition d'une région pauvre en électrons à l'intérieur de laquelle on retrouve des molécules d'ADN condensées. Des ions Ag^+ sont également détectés à l'intérieur de la cellule.

Ces différents résultats peuvent expliquer en partie le mode d'action de l'argent avec la condensation de l'ADN et la perte de sa capacité à être répliqué grâce à la fixation des ions Ag^+ sur ce dernier. La présence de soufre dans les analyses par rayons X indique que l'argent pourrait interagir avec les groupements thiols des protéines et inhiber l'action de certaines enzymes. Il faut cependant noter que la forte réactivité des ions argent entraine que ces derniers peuvent interagir notamment avec les sels du milieu pour former AgCl qui est un précipité peu soluble [44]. Cette information est intéressante puisqu'elle pourrait expliquer l'inaction dans les milieux où des ions Cl^- sont présents ce qui est fréquent en industries agro-alimentaires où le sel est couramment employé comme ingrédient.

1.2.1.2. Les ammoniums quaternaires :

Les ammoniums quaternaires sont des composés bipolaires comportant un pôle hydrophobe et un pôle hydrophile chargé positivement permettant à la molécule de s'adsorber aux surfaces inertes. Leur formule chimique générale est présentée dans la figure 1-2.

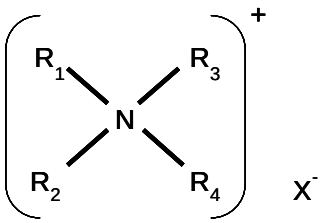


Figure 1-2 : Formule chimique générale des ammoniums quaternaires

Les sels d'ammonium quaternaire sont des composés chimiques constitués en général d'un atome d'azote substitué par 4 groupes comportant entre 8 et 35 atomes de carbone. Ces composés sont en général plus efficaces à des pH alcalins. Ils sont chargés positivement et se

lient sur les sites chargés négativement de la membrane cellulaire. En diminuant la perméabilité de la membrane, ils peuvent aussi stopper les flux d'entrée de composés vers l'intérieur de la cellule.

Ils possèdent une action sur un grand nombre de micro-organismes mais sont généralement plus efficaces sur les bactéries à Gram positif que sur les bactéries à Gram négatif. De par leurs propriétés physico-chimiques, ces molécules peuvent s'adsorber de manière irréversible aux phospholipides et aux protéines de l'enveloppe bactérienne entraînant ainsi des changements de perméabilité puis des lésions de la membrane cytoplasmique conduisant à la fuite des constituants cellulaires [17]. Salton [45] a proposé en 1968 un modèle de mode d'action des agents cationiques :

- dans un premier temps, adsorption et pénétration de l'agent antimicrobien dans la membrane cellulaire ;
- réaction avec les composants de la membrane cytoplasmique (lipides et protéines) suivie d'une désorganisation de cette dernière ;
- fuite des constituants de faible poids moléculaire ;
- et pour finir dégradation des protéines et acides nucléiques et lyse de la cellule par des enzymes autolytiques.

Ce mode d'action a également été décrit par Maillard en 2002 [46]. Il est établi depuis longtemps que les ammoniums quaternaires agissent au niveau de la membrane des micro-organismes avec une action préférentielle au niveau de la membrane cytoplasmique des bactéries et au niveau de la membrane plasmique chez les levures [17].

De nouvelles molécules ont été synthétisées par Chanawanno *et al.* [47] : pyridinium (entre 1 et 10 carbones) et quinolinium (entre 11 et 20 carbones) stilbène benzènesulfonates. Les activités antimicrobiennes de ces molécules ont été déterminées vis-à-vis de bactéries à Gram positif et à Gram négatif. Les dérivés de quinolinium montrent une forte activité antimicrobienne spécifique vis-à-vis de *Staphylococcus aureus* résistant à la méthicilline et un large spectre d'activité (*Bacillus subtilis, Enterococcus faecalis, Shigella sonnei*). Il faut cependant noter que les concentrations minimales inhibitrices de ces molécules sont plus élevées que celle du chlorure de benzalkonium (BZK) qui est un désinfectant classique.

Des sels d'ammonium quaternaire ont également été utilisés pour réaliser des films minces par procédé sol-gel [48]. Ces films minces ont été appliqués sur du polyéthylène et l'activité antimicrobienne a pu être testée vis-à-vis de 2 souches : *Escherichia coli* ATCC 25922 (Gram négatif) et *Staphylococcus aureus* ATCC 6538 (Gram positif). Une rapide inhibition de leur croissance a pu être mise en évidence lors du contact de ces 2 souches avec les dépôts sol-gel.

Après 48 heures de contact, une diminution significative de la population d'*E. coli* et de *S. aureus* respectivement de 96,4 % et 99,1 % respectivement a pu être observée par rapport à un film témoin. Cependant, suite à des lavages répétés dans une solution saline à 37°C, l'activité antimicrobienne des dépôts a été sévèrement réduite.

Plusieurs auteurs ont fait état de la résistance de souches microbiennes aux ammoniums quaternaires. Cette résistance couramment croisée avec de multiples résistances à des antibiotiques serait due à une pompe à efflux multi-drogues non spécifique dont le gène est localisé sur un plasmide [49].

1.2.1.3. Le chlorhydrate de polyhexaméthylène biguanide (PHMB)

Le PHMB a été employé dans le cadre du projet Actiprotex notamment parce qu'il s'agit d'une molécule à spectre d'action antimicrobienne large. Cette molécule a été déposée sur textile par foulardage et grâce à un brevet mis au point par l'IFTH (N° EP 0955069).

Le PHMB (Polyhexaméthylène biguanide) fait partie de la famille des biguanides. Il s'agit d'un polymère formé de groupes biguanides liés par des chaînes hexaméthylène (figure 1-3).

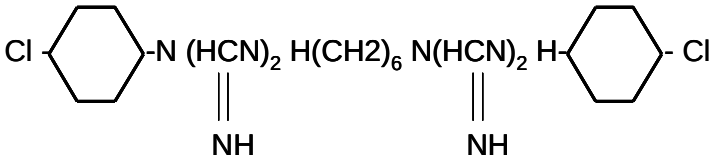


Figure 1-3 : Formule chimique générale des biguanides

C'est une substance cationique. Le PHMB est utilisé comme désinfectant dans les industries alimentaires et pour la désinfection des piscines [17]. Les biguanides sont des bases de force sensiblement équivalente à celle des ammoniaques. En revanche, la molécule de PHMB possède une légère acidité. Utilisée récemment comme système de traitement des eaux de piscine sans utilisation de chlore et nouvellement agréée par le Ministère de la Santé, cette molécule a été découverte en 1947 et possède un effet bactéricide sur certains micro-organismes. Elle est utilisée comme conservateur des produits cosmétiques ou des solutions désinfectantes pour les lentilles de contact.

Cette molécule est active sur les bactéries à Gram positif et à Gram négatif mais n'est pas sporicide. Il est à noter que *Pseudomonas aeruginosa* et *Proteus vulgaris* sont moins sensibles [50]. En effet, dans les mêmes conditions d'applications, il faudrait respectivement 32 et 64

mg/L pour tuer 90 % de la population de *P. aeruginosa* et *P. vulgaris* contre 2 mg/L pour *E. coli* par exemple [51].

En règle générale, le PHMB aurait un impact sur l'altération de la membrane cytoplasmique par désorganisation de la bicouche lipidique provoquant la fuite des constituants cytoplasmiques de faible poids moléculaire donnant à la cellule un aspect de « fantôme », c'est-à-dire une cellule aux contours peu définis. A forte concentration (supérieure à 100 mg/L), il y aurait précipitation et coagulation des composants du cytoplasme [52].

Le PHMB a pour cible les membranes bactériennes (cytoplasmique et externe). Cet agent antimicrobien va former des domaines avec les phospholipides acides de la membrane bactérienne et ainsi entraîner une modification de la perméabilité membranaire et une altération de certaines enzymes associées.

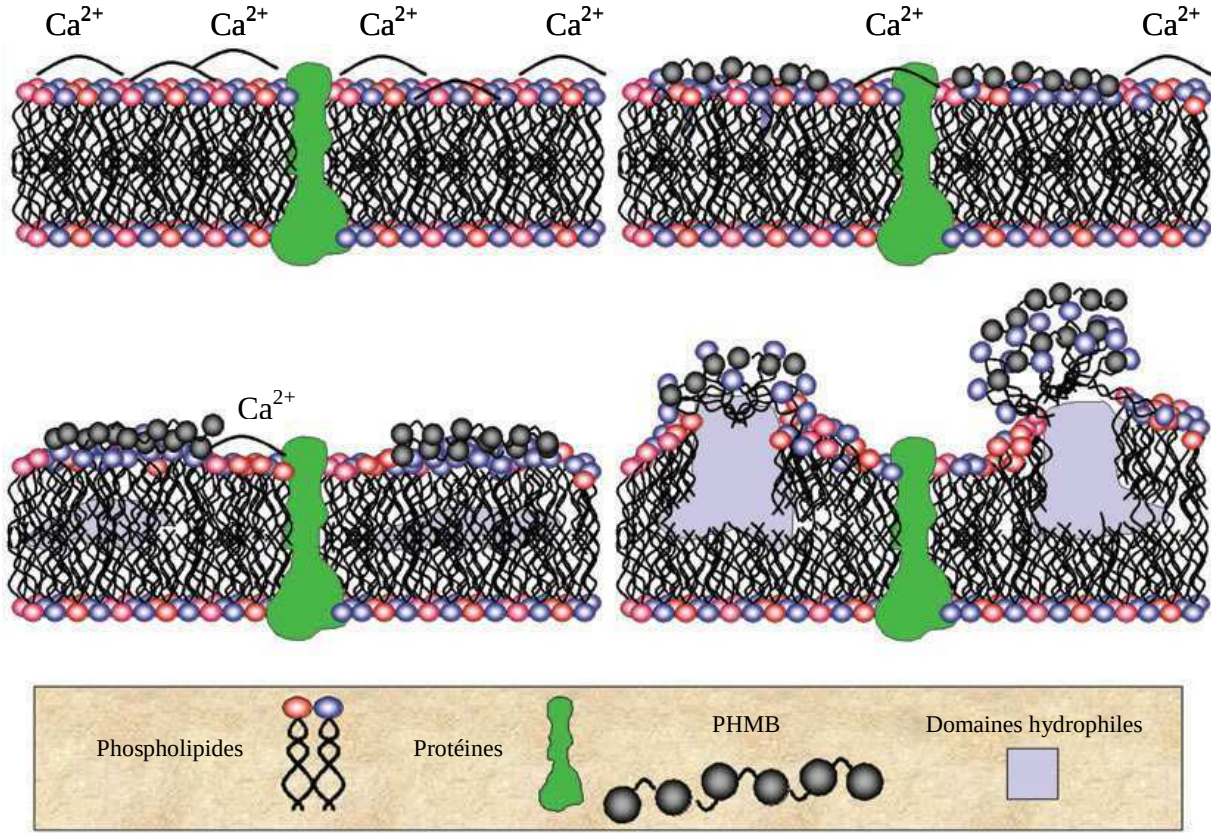


Figure 1-4 : Représentation schématique du mécanisme d'action du PHMB sur les membranes cytoplasmiques des bactéries [29]

La figure 1-4 représente le mécanisme d'action du PHMB au niveau des membranes bactériennes. Ce schéma montre une interaction progressive du PHMB avec les composants acides de la membrane plasmique entraînant une perte totale de fluidité membranaire puis une séparation des différentes phases des phospholipides présents au sein de cette membrane [29].

Selon ces mêmes auteurs, l'action du PHMB se décompose en plusieurs phases :

- attraction du PHMB aux surfaces bactériennes chargées négativement et adsorption spécifique aux composés contenant des phosphates ;
- déstabilisation de l'intégrité membranaire avec une attraction de la molécule vers la membrane interne ;
- liaison aux phospholipides membranaires avec augmentation de la perméabilité membranaire et fuite des ions K^+ ;
- perte totale des fonctions membranaires et précipitation des constituants intracellulaires entraînant la mort cellulaire.

En parallèle, Allen *et al.* [53] ont montré que la différence entre l'effet bactériostatique du PHMB et l'effet bactéricide reposait sur une interaction entre le PHMB et l'ADN des bactéries. En effet, à faible concentration (entre 2 et 10 mg/L), les dommages causés par l'interaction du PHMB avec l'ADN sont tolérables et peuvent être réparés. Cependant puisqu'il s'agit d'une interaction très forte entre l'ADN et le PHMB, une faible augmentation de concentration en PHMB (> 10 mg/L) peut causer d'importantes perturbations des fonctions de l'ADN pouvant entraîner la mort cellulaire. Ces résultats confirment ceux obtenus par Broxton *et al.* [54].

Ces mêmes auteurs [53] ont utilisé la transcriptomique pour mettre en évidence la réponse globale d'*Escherichia coli* vis-à-vis du PHMB. Dans un premier temps les auteurs ont déterminé l'activité antimicrobienne du PHMB vis-à-vis d'*Escherichia coli*. Pour des concentrations supérieures ou égales à 10 mg/L, le PHMB a une activité biocide et un ralentissement de la croissance a été observé pendant 5 heures après l'ajout d'une concentration de 7,5 mg/L. Ce ralentissement est temporaire et la croissance reprend normalement par la suite. Lors de l'exposition des cellules d'*Escherichia coli* au PHMB, 71 gènes sont induits et 12 sont réprimés. A ce jour, aucune résistance vis-à-vis du PHMB n'a été décrite [55] ce qui est probablement dû à son action non spécifique au niveau de la membrane bactérienne.

1.2.2. Modes de fonctionnalisation des tissus pour introduire des propriétés antimicrobiennes

Le textile a longtemps subi des modifications superficielles dans le but d'améliorer sa douceur, sa mouillabilité ou encore sa couleur. Depuis plus récemment, les modifications de surface ont également été employées pour leur conférer de nouvelles fonctionnalités comme l'activité antimicrobienne ou la diminution de l'irritation de peau.

Un textile antimicrobien se doit d'être le plus efficace et le plus respectueux possible de la personne qui le porte [56]. Pour cela :

- il doit être résistant aux lavages, au séchage et au calandrage ;
- il doit posséder une activité sélective vis-à-vis de micro-organismes indésirables ;
- il ne doit pas être agressif vis-à-vis de son utilisateur, ni vis-à-vis de l'environnement ;
- il doit être en conformité avec les normes et directives en vigueur notamment la directive biocide et le règlement REACH ;
- il doit être facilement applicable c'est-à-dire ne pas précipiter avec la chaleur par exemple ;
- il doit être résistant aux fluides corporels et à la désinfection et stérilisation.

Différentes techniques de préparation des textiles peuvent être employées pour les rendre antimicrobiens et sont présentées dans le tableau 1-2.

Les textiles antimicrobiens peuvent être obtenus par addition d'un agent antibactérien dans le polymère avant extrusion (cas des fibres synthétiques ou artificielles) ou par imprégnation, apprêtage ou greffage sur fibre, sur fil ou sur étoffe. Deux procédés innovants de traitement dans le domaine textile permettant le dépôt de molécules antimicrobiennes sur des étoffes sont décrits dans les paragraphes suivants, ces procédés sont la technologie Plasma et le procédé Sol-Gel. Les développements des nanotechnologies permettent également de préparer des nanoparticules qui une fois déposées, du fait de leur aire spécifique plus importante, seront plus actives ce qui permet souvent de déposer des quantités d'agents antimicrobiens plus faibles pour un même effet par rapport à des particules de plus grande taille.

Tableau 1-2 : Techniques d'application des agents antimicrobiens dans la matière textile [9]

	Méthodes	Avantages	Inconvénients
Dépôt	Le textile est plongé dans une solution aqueuse contenant le principe actif et un tensio-actif servant d'agent mouillant. Les molécules antibactériennes sont déposées sur les fibres sans ajout de liant	Simple	Usage limité : résistance faible au lavage (tissus à usage unique) Problème environnemental du devenir de la solution de trempage en fin de process
Apprêtage	Le textile est plongé dans la même solution aqueuse contenant un liant permettant au tensioactif de rester « collé » au textile	L'activité antimicrobienne résiste donc un peu mieux aux lavages	Pas plus de 20 lavages
Dissolution	L'agent antibactérien est mis en solution avec des granulés de polymère textile avant filage et tissage du textile	Résiste à environ 40 lavages	L'agent antibactérien doit résister à des températures élevées (> 100°C)
Fusion	L'agent antimicrobien est mélangé au polymère textile fondu à 240°C. La pâte obtenue est filtrée sous pression et filée (zéolithes)	L'agent est intimement mêlé à la fibre, le textile peut être lavé un très grand nombre de fois (jusqu'à 100 fois) sans perdre ses propriétés	L'agent antimicrobien doit résister à la température élevée de traitement
Micro-encapsulation	L'agent antimicrobien est stocké dans des microcapsules elles mêmes fixées au textile par dépôt ou apprêtage. Les capsules éclatent sous une action mécanique et libèrent le principe actif.	Diffusion contrôlée de l'actif	Lorsque toutes les microcapsules sont vides, le textile n'a plus d'activité antimicrobienne
Greffage radiochimique	Un faisceau d'électron crée des radicaux libres à la surface des polymères activés permettant de greffer des molécules organiques actives	Encore au stade expérimental, difficiles à évaluer	Encore au stade expérimental, difficiles à évaluer
Greffage chimique	Des systèmes d'oxydation entre autres créent des liaisons covalentes entre les groupements réactifs des textiles et les molécules actives (on peut ainsi greffer des textiles naturels comme le coton, le lin…)	Les molécules antibactériennes capables d'être intégrées à des textiles sont nombreuses. Il existe aussi des textiles anti-acariens (textiles destinés à lutter contre certains types d'allergies) et des textiles revendiquant des propriétés antifongiques	Toutes les molécules actives ne peuvent pas être déposées sur tous les types de tissus naturels (lin, coton…) ou polymères (polyester, polyamides…)

1.2.2.1. Le traitement plasma

Un pansement traité à l'argent par méthodologie plasma a déjà été commercialisé [57] par la société Québécoise DRM et il a été démontré que l'argent accélère la cicatrisation et la reconstruction de la peau. Un focus a été fait sur ce procédé plasma car il a été employé par la société HEF dans le cadre du projet et de ces travaux de thèse afin de déposer de l'argent sur des textiles dans le but de les fonctionnaliser.

Le plasma est le 4^{éme} état de la matière et représente plus de 95% de la matière dans l'univers. La projection plasma appartient à la famille des procédés de projection thermique. Le plasma est un milieu ionisé (ionisation partielle : plasma dit « froid »), c'est-à-dire constitué d'un mélange d'ions, d'électrons et d'espèces neutres, excitées ou non (Figure 1-5).

La modification de surface par technologie plasma possède un avantage non négligeable vis-à-vis des procédés conventionnels de préparation de textiles comme l'impression et la teinture

[58]. En effet, ce type de procédé ne nécessite pas l'utilisation d'eau et de produits chimiques, il est donc plus écologique et économique.

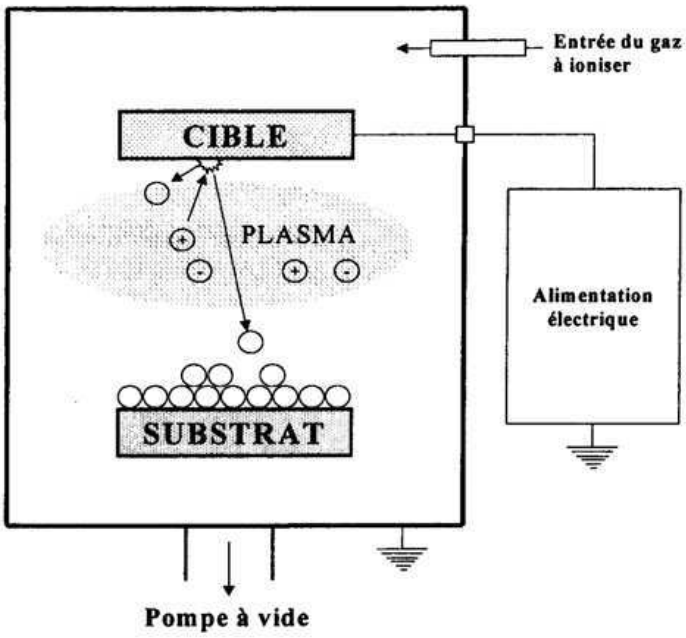


Figure 1-5 : Principe d'une installation de dépôt par pulvérisation [59]

Le principe de base de la projection plasma est le suivant : une torche est constituée de deux électrodes : une cathode conique à l'intérieur d'une anode cylindrique constituant une buse. Un gaz inerte (habituellement de l'argon (Ar), éventuellement mélangé avec de l'hydrogène ou de l'hélium) circule entre les deux électrodes où il est ionisé pour former un plasma. Un tube, dans le jet de plasma précédemment créé, introduit le matériau à projeter sous forme de poudre, porté lui-même par un gaz neutre. La cible désigne le matériau à pulvériser et qui est transféré vers le substrat à revêtir [60]. Les dépôts réalisés par méthode plasma peuvent être réalisés soit en phase gazeuse (PVD : Physical Vapor Deposition) soit par voie chimique (CVD : Chemical Vapor Deposition) (Figure 1-6).

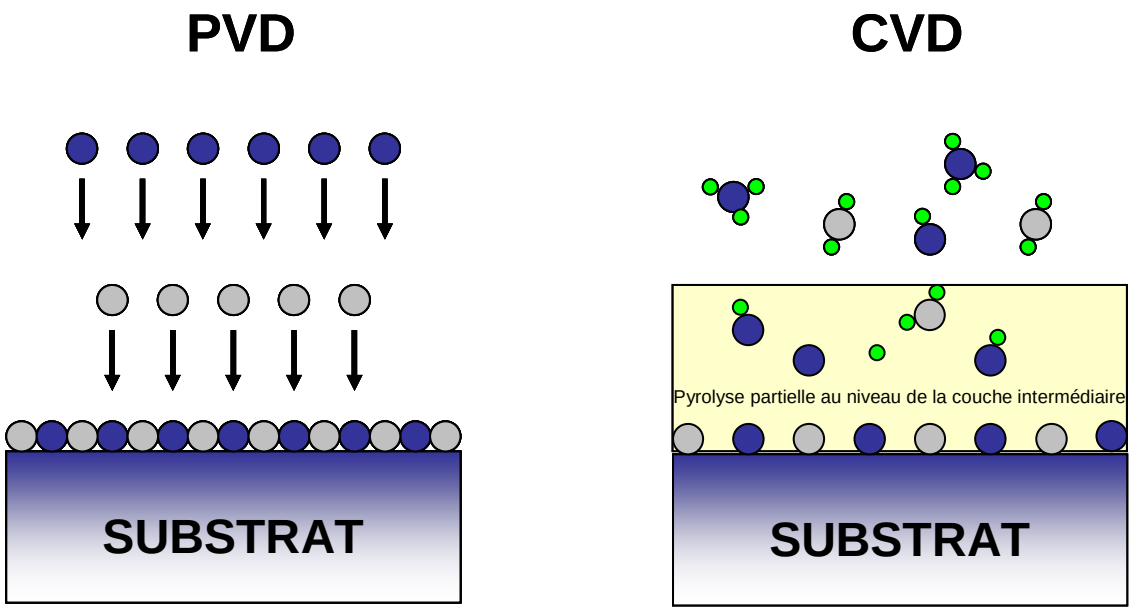


Figure 1-6 : Représentation schématique des procédés Physical Vapor Deposition (PVD) et Chemical Vapor Deposition (CVD). Les cercles gris et bleus représentent les molécules utilisées pour le dépôt et les cercles verts représentent des molécules gazeuses [61].

Les procédés PVD sont des procédés dans lesquels les atomes ou molécules sont vaporisés à partir d'une source solide ou liquide et transportés sur le substrat où ils se condensent sur l'échantillon à traiter. Cette technique permet de déposer des films de très faibles épaisseurs à la surface de matériaux (de quelques nanomètres à quelques micromètres). Ce procédé a par exemple été utilisé dans le but de créer des endoprothèses possédant une activité antimicrobienne mais également compatibles avec les os [62]. Une épaisseur d'argent d'environ 2 µm a été déposée sur la surface du titane. Cette technique permettrait de créer une surface de titane antimicrobienne ce qui s'avère être une solution intéressante dans la lutte contre les biofilms microbiens au niveau des implants. Saulou *et al.* [63] ont également utilisé le traitement plasma pour fonctionnaliser des surfaces d'acier inoxydable avec de l'argent.

Les traitements chimiques réalisés par CVD sont basés sur la réaction de précurseurs à la surface du substrat sous forme gazeuse. La technique de CVD consiste en plusieurs réactions chimiques qui transforment les molécules gazeuses (argon par exemple), appelées précurseurs, en un matériau solide sous forme de couches minces ou sous forme de poudre à la surface d'un substrat. Martin *et al.* [64] ont utilisé la technique de CVD pour fixer un polymère antimicrobien (le poly diméthylaminométhyl styrène) à la surface d'un textile en nylon. Cette méthode s'est avérée efficace. En effet, les textiles traités mis en contact pendant 60 minutes avec 2 souches bactériennes (*Bacillus subtilis* et *E. coli*) causent une réduction

proche de 100 % de la population de ces 2 souches. Des contacts de 2 et 60 minutes ont entraîné une diminution respective de 4 et 6 unités logarithmiques de la population d'*E. coli* par rapport à un tissu témoin non fonctionnalisé. Dans le domaine biomédical, Szymanowski *et al.* [65] ont utilisé le procédé CVD pour déposer des films à base de nanoparticules d'oxyde de titane (TiO_2) à la surface de verre et de coton. Le but de cette étude était de fonctionnaliser des matériaux à l'aide de l'irradiation UV du TiO_2, nanocomposite pouvant entraîner une activité antimicrobienne due à son action oxydante. Ces matériaux fonctionnalisés présentent une bonne activité vis-à-vis d'*Escherichia coli* (environ 90% d'inhibition).

A ce jour, peu d'études sur l'utilisation de la technologie plasma pour fonctionnaliser des textiles sont publiées. Quelques études récentes font état de la fonctionnalisation de différentes surfaces comme le titane ou l'acier inoxydable [62, 66-69]

Le traitement plasma dit « froid » est particulièrement intéressant pour l'application textile puisque ces derniers sont très souvent sensibles à la chaleur mais peu d'études sont encore disponibles. En effet, les traitements plasma dit « froids » peuvent être effectués à une température voisine de la température ambiante. De plus, il s'agit d'une technique polyvalente avec laquelle une grande variété de groupes fonctionnels chimiquement actifs peuvent être incorporés à la surface du textile [70]. Dans l'étude d'Abramov *et al.* [71], une installation pilote a été créée pour le dépôt de différentes nanoparticules, contenant du cuivre et du zinc, à la surface de textiles. Les auteurs ont montré que la couche déposée est homogène, stable et conserve ses propriétés biocides vis-à-vis d'*Escherichia coli* après au moins 20 cycles de lavage de 40 minutes à 40°C.

Torres *et al.* [72] ont réalisé un traitement plasma sur du coton dans le but de le fonctionnaliser. Un dépôt fin de CuO sur le coton a été obtenu et une action vis-à-vis d'*E. coli* a pu être mise en évidence. Dans ce cas, l'avantage résidait dans la possibilité de pouvoir déposer des quantités très faibles d'agents antimicrobiens. La méthodologie plasma a donc comme intérêt de pouvoir réduire l'épaisseur des couches de dépôt tout en gardant une activité antimicrobienne.

Trois études récentes font état d'un traitement plasma sur un matériau textile [73-75]. Wang *et al.* [73] ont étudié le dépôt de nanocomposites d'argent sur des non-tissés par traitement plasma. Ces auteurs ont ainsi pu obtenir un dépôt formé de particules d'argent très homogène lorsque le dépôt est fin. Il a également été observé qu'un dépôt de 1 nm d'épaisseur était

suffisant pour réduire de 86 % la population d'*E. coli* de départ mise en contact avec le textile traité et qu'une augmentation de l'épaisseur de dépôt entraînait une plus grande réduction de la population bactérienne. Cette forte activité antimicrobienne est due à l'action des ions Ag^+ qui sont relargués du dépôt au moment de la mise en contact avec les bactéries. Dans l'étude de Kostic *et al.* [74], un traitement plasma à pression atmosphérique en utilisant l'air comme gaz a été réalisé dans le but de fonctionnaliser un textile avec de l'argent. Ce textile a montré une forte activité antimicrobienne vis-à-vis des 2 souches bactériennes testées (*E. coli* et *S. aureus* : entre 1 et 2,5 mm de diamètre d'inhibition) et vis-à-vis de *Candida albicans* qui a présenté une sensibilité plus importante (entre 2,5 et 2,7 mm de diamètre d'inhibition). Enfin, Dong *et al.* [75] ont appliqué un traitement plasma pour greffer du polyéthylène glycol (PEG) sur des matériaux composés de polyamide et de polyester dans le but de réduire la formation de biofilms microbiens. Ces auteurs ont préalablement fonctionnalisé par un traitement plasma les surfaces dans le but de former des groupements chimiques pour greffer le PEG. Ces surfaces, ainsi fonctionnalisées ont pu réduire d'environ 96% l'adhésion de *Listeria monocytogenes*.

La méthodologie plasma est donc une méthode intéressante pour la fonctionnalisation des textiles mais la maîtrise de tous les paramètres de ce procédé reste encore difficilement applicable à grande échelle sur ce type de matériau. En effet, les paramètres de procédé restent encore difficiles à contrôler sur ce type de matériau du fait de la composition de ce dernier. C'est parce qu'elle est peu développée sur textiles et qu'elle peut être une alternative intéressante, que la méthodologie plasma a été choisie dans le projet Actiprotex.

1.2.2.2. La méthodologie sol-gel

Il s'agit d'un procédé permettant de former un polymère inorganique par des réactions chimiques simples à une température proche de la température ambiante. Ce procédé permet le dépôt de films minces sur divers substrats tels que le bois, les métaux, les textiles…

Le procédé sol-gel permet d'obtenir des matériaux de grande pureté, homogènes et de compositions variées. La voie liquide d'élaboration (le Sol pour solution) permet ensuite une mise en forme très diversifiée comme le montre la figure 1-7. En effet, à partir d'une même solution et en fonction du mode de séchage du gel, le matériau final peut prendre des formes très différentes : matériaux denses (monolithes de verres ou de céramiques), poudres, aérogels (séchage supercritique), fibres, composites, gels poreux ou membranes, et, bien entendu, films ou couches minces.

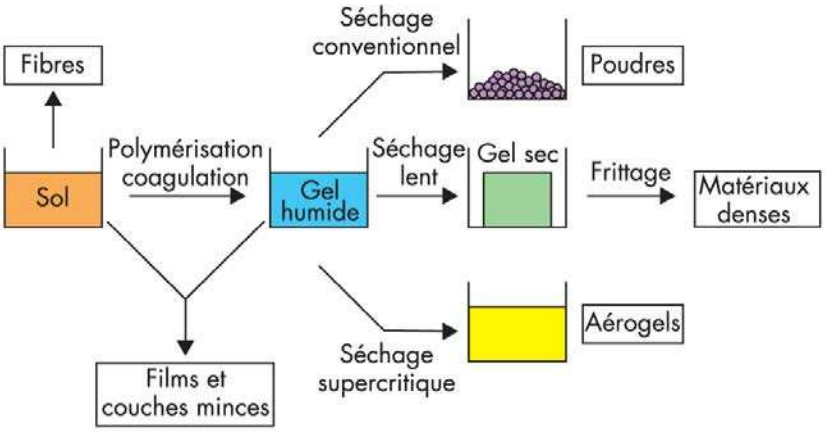


Figure 1-7 : La transition sol-gel et ses produits [76]

La modification physique et chimique par procédé sol-gel de nanoparticules d'oxyde de silicium (SiO_2) par fixation de molécules actives offre de nombreuses possibilités [77]. Parmi les nombreux avantages de ce procédé on notera notamment la stabilité physique, chimique et mécanique mais aussi, une transparence et une photostabilité plus importante ou encore la possibilité de contrôler la porosité.

Le procédé sol-gel permet d'obtenir un matériau final sous diverses formes, parmi lesquelles on trouve des films minces. La figure 1-8 représente 3 méthodes de dépôt d'une solution sol-gel sur un matériau. La première méthode (1) consiste en un « trempage-retrait » ou « dip-coating » avec une épaisseur déposée proportionnelle à la vitesse de dépôt. La seconde méthode (2) est appelée « enduction centrifuge » ou « spin-coating » et enfin la troisième méthode (3) est la méthode « d'enduction laminaire » ou « bare-coating ».

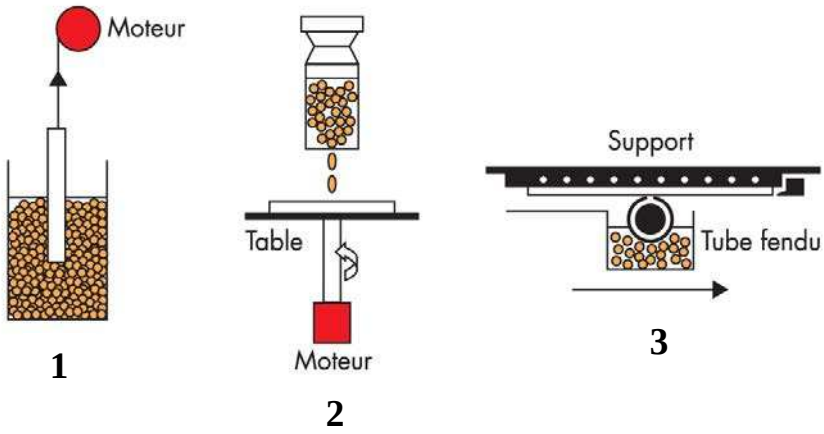


Figure 1-8 : Techniques de dépôt en milieu liquide [78]. 1 : dip-coating, 2 : spin-coating, 3 : bare-coating.

La méthodologie sol-gel a été employée pour fonctionnaliser des textiles dans le but de les rendre antimicrobiens dans le cadre de différentes études [79].

Haufe *et al.* [77] ont par exemple étudié la possibilité de contrôler l'immobilisation et le relargage de substances dite « actives » grâce à une base de silice modifiée dans le but de fonctionnaliser des textiles. L'application finale de ces expérimentations était la fabrication de textiles présentant un intérêt dans le domaine médical notamment dans le but de lutter contre les allergies et les maladies respiratoires. L'immobilisation d'huiles essentielles sur des textiles par procédé sol-gel pourrait permettre d'éviter des infections par *Staphylococcus aureus* qui causent des inflammations et des dommages au niveau de la peau. L'activité antimicrobienne de textiles sur lesquels ont été immobilisées des huiles essentielles de primevère vespérale et de *Perilla* a été testée sur *Staphylococcus capitis* et *Escherichia coli*. Ces textiles ont présenté une activité antimicrobienne importante avant et après lavage sur *Staphylococcus capitis* tandis que l'activité sur *Escherichia coli* est apparue plus faible après lavage.

Daoud *et al.* [80] ont réussi à déposer des films minces dérivés de dioxyde de titane (TiO_2) sur des textiles à base de coton à une température de 150°C. En exposant le TiO_2 à un rayonnement de lumière, des paires "électrons-trous positifs" sont formées et participent à des réactions d'oxydo-réduction entraînant la production de radicaux libres et d'espèces très réactives pouvant entrainer une activité antimicrobienne. Cette activité photocatalytique ainsi que l'activité antimicrobienne ont donc été étudiées. Deux autres études récentes ont également permis de mettre au point des textiles antimicrobiens par méthodologie sol-gel. Mahltig *et al.* [81] ont produit des matériaux textiles avec un dépôt contenant de l'argent et du

cuivre en surface. Les dépôts sol-gel ont été réalisés sur des textiles composés de viscose par « trempage-retrait » entre 80 et 180°C. Une diminution de croissance de champignons (*Aspergillus niger*) comme de bactéries (*Bacillus subtilis* et *Pseudomonas putida*) en lien avec l'augmentation de la quantité d'agents antimicrobiens déposée a pu être mise en évidence au cours de l'utilisation de ces textiles. Tarimala *et al.* [82] ont également utilisé comme agent antimicrobien l'argent sous forme de nanoparticules incorporées dans le sol. Le textile à base de coton ainsi traité par méthodologie sol-gel à 60°C a présenté une excellente activité anti-*Escherichia coli*.

En plus de la fonction antimicrobienne, le procédé sol-gel peut être employé pour donner une fonction particulière à un matériau, comme par exemple augmenter son hydrophobicité pour le rendre déperlant. Textor *et al*. [79] ont ainsi employé la méthodologie sol-gel pour rendre un textile antistatique et hydrophobe. Ces propriétés peuvent être une des qualités requises pour un textile utilisé en industrie notamment pour éviter les tâches. Vilcnik *et al*. [83] ont mis en évidence que des textiles très hydrophobes et oléophobes donc anti-tâches obtenus par voie sol-gel présentaient également une activité antimicrobienne. Cette activité antimicrobienne décrite comme « passive » par les auteurs serait due à la fonction répélante de ces textiles combinée à une action des apprêts utilisé pour rendre le textile hydrophobe et oléophobe. Yu *et al*. [84] ont préparé par voie sol-gel un textile en appliquant une association de nanoparticules de silice avec un ammonium quaternaire. Les mêmes propriétés que dans les deux études présentées précédemment ont été mises en évidence, c'est-à-dire l'hydrophobicité et l'oléophobicité.

La méthodologie sol-gel constitue donc une méthode intéressante pour fonctionnaliser des textiles [85], raison pour laquelle elle a été retenue pour le projet Actiprotex :

- les sols basés sur la modification de la silice ou d'oxydes de métaux (TiO_2…) avec des petites particules de 50 nm (« nanosols ») forment des couches d'oxydes très adhérentes et transparentes sur les textiles ;
- ces couches sont stables vis-à-vis de la lumière, de la chaleur et des attaques microbiennes ;
- ces couches améliorent les propriétés mécaniques des textiles comme par exemple l'augmentation de la force à la rupture, de la résistance à l'usure et à l'abrasion avec de plus des possibilités de changer les propriétés de surface comme l'hydrophobicité ;

- le dépôt peut servir de support pour insérer des additifs organiques ou inorganiques comme des agents antimicrobiens ;
- les dépôts peuvent être réalisés à température ambiante et à la pression atmosphérique.

Une fois les textiles fonctionnalisés avec les molécules antimicrobiennes appropriées, l'étape de caractérisation de ces derniers permet de déterminer la quantité d'agents antimicrobiens à leur surface. Dans la partie suivante, les méthodes de caractérisation de la composition chimique de la surface des textiles fonctionnalisés sont présentées.

1.3. Méthodes de caractérisation des textiles

Le but de ces analyses est d'évaluer les changements de la composition chimique de surface et de l'aspect des surfaces des textiles suite à leur fonctionnalisation. Elles permettent également d'évaluer la résistance aux différents cycles de lavages des groupements fonctionnels introduits dans les textiles.

Les techniques d'analyses de surface principalement utilisées dans le contexte des traitements de surface et dans le cadre du projet Actiprotex sont :

- la spectroscopie de photoélectrons induits par rayons X (XPS)
- la spectrométrie de masse d'ions secondaires (SIMS et ToF-SIMS)
- la microscopie électronique à balayage (MEB)
- la microscopie à force atomique (AFM)
- la microscopie électronique à transmission (MET)

Toutes ces techniques ont été utilisées pour caractériser la surface des textiles avant ou après fonctionnalisation par des antimicrobiens.

Par la suite, seules les techniques XPS et ToF-SIMS seront présentées car, dans le cadre de ce travail ce sont ces techniques qui ont été les plus utilisées.

1.3.1. La spectroscopie de photoélectrons induits par rayons X (XPS)

La surface de l'échantillon est bombardée par un faisceau de rayons X monochromatiques. Ces photons X sont absorbés par la matière, l'énergie transférée (Ex), sert, entre autres, à exciter les électrons de cœur des atomes présents : Ex = El + Ec, avec El et Ec, énergie de liaison et énergie cinétique de l'électron excité.

El est caractéristique d'une couche électronique donnée pour un élément donné. En fixant Ex et en mesurant Ec, il est possible de remonter à El donc à la nature de l'atome excité.

Dans la pratique, la détection consiste en un filtrage en énergie cinétique des électrons émis. Le spectre XPS est ainsi décrit par une succession de pics qui correspondent à une énergie El donnée (par exemple, pic C 1s = excitation des électrons de la couche 1s du carbone), d'où la possibilité de réaliser une analyse élémentaire.

Il y a globalement peu d'interférence entre les pics des différents éléments. Même lorsqu'un pic peut correspondre à plusieurs éléments, il est en général possible de lever l'ambiguïté en étudiant l'ensemble du spectre élémentaire : présence/absence d'un pic secondaire, intensité relative des pics caractéristiques des éléments soupçonnés, étude des pics Auger...

Le signal sous chaque pic/raie R de l'élément A étant proportionnel au nombre d'atomes de type A, l'analyse XPS est quantitative. La profondeur d'analyse de la technique XPS est de 3 à 5 nm, c'est pourquoi cette technique est considérée comme une technique d'analyse de surface. La technique XPS apparaît comme la technique de référence pour identifier et quantifier les éléments présents à l'extrême surface (à l'exception de H et He) [86].

Dans le cadre de ce travail, il est intéressant de s'attarder sur l'étude des textiles par cette technique. Différentes fibres naturelles ont été étudiées par XPS telles que la laine [87] ou encore la soie [88]. Dans le cas de la soie, les auteurs ont mis en évidence par la technique XPS les principaux éléments constituant cette fibre naturelle à savoir le carbone, l'azote et l'oxygène des acides aminés la constituant.

L'analyse XPS a également été utilisée pour étudier l'effet de traitements de surface notamment sur matériaux textiles. Ainsi, Chettra [89] a montré l'intérêt de la technique XPS pour déterminer la quantité de teinture présente à la surface de fibres de coton. Pongprayoon *et al.* [90] ont analysé la surface de fibres de coton recouvertes par un film mince de polystyrène permettant au tissu d'être hydrophobe. Dans ce cas, c'est l'analyse XPS qui a permis aux auteurs d'optimiser leur procédé de revêtement.

Il faut également noter que l'analyse XPS a permis d'analyser des agents antimicrobiens [91, 92]. Dans l'étude de Liu *et al.* [93], le TiO_2 et un film composite Ag/TiO_2 ont été analysés par XPS et ces analyses ont mis en évidence la présence des éléments Ag et Ti dans le film composite Ag/TiO_2. Xing *et al.* [91] ont également détecté un dépôt d'argent déposé sur du coton par la méthode sol-gel ($AgNO_3$ + SiO_2) grâce à l'XPS.

Bai *et al.* [94] ont étudié la modification de la surface de la soie à l'aide d'un peptide antimicrobien, le *Cecropine B* isolé du polyphème d'Amérique (insecte de la famille des lépidoptères). L'analyse élémentaire du textile non traité et du textile traité révèle une diminution de la teneur en carbone et une augmentation de la teneur en azote et oxygène. Ces

différences peuvent être expliquées par le couplage du peptide antimicrobien à la surface de la soie. Plus récemment, la technique a été utilisée en association avec la MET et la MEB, l'analyse dispersive en énergie ou EDX et la spectroscopie IRTF pour caractériser la morphologie et la composition d'un dépôt sol-gel de silice sur de la laine [95].

1.3.2. La spectrométrie de masse d'ions secondaires (ToF-SIMS)

La surface de l'échantillon est bombardée par un faisceau d'ions (source pulsée), appelés ions primaires, de quelques keV d'énergie. Sous l'effet du bombardement, diverses particules secondaires sont émises de la surface : électrons, photons, atomes et molécules neutres, atomes et molécules excités, ions.

La technique ToF-SIMS (Time of Flight Secondary Ion Mass Spectrometry) analyse, par spectrométrie de masse (acquisition parallèle à l'aide d'un analyseur à temps de vol), les ions secondaires atomiques et moléculaires issus de la pulvérisation. L'utilisation d'un très faible courant d'ions primaires (SIMS statique) permet de limiter la profondeur d'analyse (2 ou 3 premières couches atomiques) : il s'agit d'une analyse de l'extrême surface. Ceci explique les précautions à prendre lors du conditionnement des échantillons pour veiller à ne pas apporter une contamination qui masquerait la surface d'intérêt. Le faible courant de la source permet également de limiter les fragmentations d'où une information qualitative sur la structure chimique de l'échantillon en surface, c'est-à-dire sur les liaisons et les groupements de surface. C'est pourquoi cette méthode est particulièrement utilisée pour l'étude des polymères, des semi-conducteurs, des catalyseurs et des matériaux biologiques pour des problématiques de contamination, adsorption, adhésion, corrosion et biocompatibilité.

Cependant, la technique ToF-SIMS n'est pas toujours considérée comme la méthode de premier choix pour l'examen de fibres textiles, en raison de sa nature destructive de la surface des échantillons par le canon à ions. Il faut cependant noter que ces dommages sont limités au strict minimum par les bombardements d'ions car seulement 1% de la couche de la surface supérieure est dégradée par l'impact des ions primaires. Toutefois, cette technique a été utilisée dans quelques études dans le domaine textile comme une méthode complémentaire à d'autres techniques d'analyse de surface, en fournissant des informations importantes sur la composition chimique, avec une résolution à l'échelle des premières monocouches atomiques.

La technique ToF-SIMS peut par exemple être utilisée pour différencier des échantillons qui possèdent le même spectre XPS. Brack *et al.* [87] ont examiné par ToF-SIMS des agents

tensioactifs déposés à la surface de la laine. Arunyadej *et al*. [96] ont quant à eux étudié l'effet du lavage sur les fibres en coton ayant subi un traitement fluoro-chimique dans le but d'augmenter l'hydrophobicité du textile. Après 20 lavages, le coton perd son hydrophobicité à cause de l'utilisation de détergents au moment du lavage. Après plusieurs lavages, l'analyse ToF-SIMS a révélé que les tensioactifs non ioniques se sont adsorbés directement sur les fibres de coton, avec pour conséquence la perte de la propriété d'hydrophobicité du coton.
Les techniques XPS et ToF-SIMS sont des techniques qui donnent des informations moléculaires sur les échantillons analysés. La technique XPS apparaît comme étant la technique la plus communément utilisée pour l'étude chimique de la surface et elle a été utilisée pour mettre en évidence la présence d'agents antimicrobiens sur des textiles fonctionnalisés. La technique ToF-SIMS a été peu utilisée pour l'étude des textiles et la détection d'agents antimicrobiens mais s'est révélée utile dans les rares cas référencés notamment pour détecter la présence des agents tensioactifs et l'effet du lavage sur les textiles.

La caractérisation de la fonctionnalisation est la première étape ayant pour objectif de vérifier la présence de l'agent antimicrobien à la surface des textiles par le suivi de ses signatures élémentaires caractéristiques. Par la suite, il est nécessaire de vérifier l'efficacité antimicrobienne des agents antimicrobiens déposés sur les textiles dans un premier temps par des méthodes de microbiologie dite pasteurienne.

1.4. Méthodes d'évaluation de l'activité antimicrobienne des textiles fonctionnalisés

1.4.1. Présentation des différentes méthodologies

Un certain nombre de méthodes ont été développées pour déterminer l'activité antimicrobienne des textiles. Elles se divisent généralement en deux grandes catégories : des méthodes *in vitro* où le textile est testé au laboratoire quant à son activité vis-à-vis d'un certain nombre de souches microbiennes et des méthodes *in situ* ou au porté où le textile est testé dans les conditions réelles d'utilisation. Les méthodes *in vitro* sont réalisées dans des conditions standardisées et de ce fait, une validation par un test au porté est nécessaire. En effet, un textile actif *in vitro* ne le sera pas forcément dans les conditions d'utilisation en industries agro-alimentaires ou en hôpitaux [9].

Seuls les tests *in vitro* seront présentés dans cette étude bibliographique. Deux catégories de méthodes *in vitro* sont employées : la méthode de diffusion dans l'agar et la méthode par absorption [97]. Deux types de normes peuvent être utilisées : la norme ISO 20743-2005 qui regroupe 2 anciennes normes (la norme Japonaise JIS 1902, et la norme Française XPG 39 010) ou la norme Américaine AATCC 100-204 mise au point en 1961 par l'American Association of Textiles Chemists and Colorists (AATCC). Seule la norme Européenne ISO 20743-2005 sera présentée de façon détaillée car c'est la méthode qui a été employée dans le cadre du projet Actiprotex.

1.4.2. Méthodes *in vitro* : norme ISO 20743-2005

La norme ISO 20743-2005 spécifie les méthodes d'essais quantitatives permettant de déterminer l'activité antibactérienne des produits textiles finis antibactériens, y compris les non-tissés. Cette norme s'applique à tous les produits textiles, y compris le tissu, le rembourrage, le fil et les matériaux utilisés dans la confection de vêtements, de tissus d'ameublements et d'articles divers, quel que soit le type d'agent antibactérien utilisé (organique, inorganique, naturel ou synthétique) ou quelle que soit la méthode d'application (intégration, post-traitement ou greffage). Tenant compte de l'application prévue et de l'environnement dans lequel le produit textile est destiné à être utilisé, l'utilisateur peut choisir la mieux adaptée des trois méthodes suivantes de détermination de l'activité antibactérienne :

- méthode par absorption : la suspension bactérienne à l'essai est ensemencée directement sur des échantillons ;
- méthode par transfert : les bactéries soumises à l'essai sont placées sur une boîte de milieu gélosé puis transférées sur des échantillons ;
- méthode par impression : les bactéries soumises à l'essai sont placées sur un filtre puis imprimées sur des échantillons.

La technique de dénombrement et la méthode de mesure de luminescence de l'ATP (ATP-métrie) sont également spécifiées pour le dénombrement des bactéries.

Dans le cas des méthodes par absorption et transfert, les éprouvettes sont ensuite incubées 24 heures à la température optimale de croissance du micro-organisme cible en conditions saturantes d'humidité. Les bactéries sont ensuite décrochées du textile par agitation dans un milieu liquide et dénombrées par la méthode des dilutions en milieu solide. L'activité

antibactérienne est évaluée en calculant la différence entre la valeur de croissance obtenue sur le textile témoin et la valeur de croissance obtenue avec le textile traité antibactérien.

La norme International Standard Organisation (ISO) est peu utilisée dans la littérature internationale car il s'agit d'une norme européenne à l'origine. La norme couramment citée pour la détermination de l'activité antimicrobienne de textiles est la norme américaine (AATCC 100) dont le principe est similaire.

Dans le projet Actiprotex, c'est la norme ISO 20743 qui a été choisie car l'IFTH l'utilise couramment et c'est pour pouvoir comparer les résultats que le choix s'est porté sur cette norme pour la détermination des activités antimicrobiennes des textiles fonctionnalisés par les différents partenaires dans le cadre de ce projet.

Un article assez récent de Vilcnik *et al.* [83] utilise la norme ISO 20743 pour évaluer l'activité antimicrobienne vis-à-vis d'*Escherichia coli* d'un textile en coton traité par voie sol-gel. Dans ce cas, c'est la méthode de transfert qui a été utilisée pour mesurer l'activité antimicrobienne d'un textile hydrophobe et la réduction de la population d'*E. coli* déposée sur le textile au départ s'est avérée être proche de 100%.

Kitahara *et al.* [98] ont également utilisé cette norme pour évaluer l'activité antibactérienne vis-à-vis de *Staphylococcus aureus* et *Klebsiella pneumoniae* d'un textile en coton traité par méthodologie plasma avec du carbone amorphe ou Diamond-Like Carbon (DLC) Après incubation des textiles traités avec ces 2 souches, aucune bactérie n'a pu être dénombrée sur milieu gélosé. D'autres auteurs ont également utilisé cette norme, notamment Ringot *et al.* [99] pour déterminer l'activité antimicrobienne de textiles greffés avec de la porphyrine pour obtenir une activité photocatalytique en formant des espèces réactives.

La norme ISO 20743 permet d'évaluer l'activité antibactérienne de textiles et de la comparer à celle d'autres textiles. En revanche, en comparant le nombre de micro-organismes cultivables sur milieu de culture après contact avec le textile antimicrobien ou le textile témoin, elle ne permet d'évaluer que le nombre de micro-organismes cultivables suite à l'exposition à un agent antimicrobien. Il est également nécessaire d'évaluer si les micro-organismes non cultivables restent viables ou non. En effet, selon la nature de l'agent antimicrobien et les conditions d'exposition des micro-organismes à son action, les bactéries peuvent être tuées ou passer dans un état physiologique particulier dit viable non cultivable (ou VNC). La problématique des bactéries viables non cultivables est une problématique importante pour la sécurité microbiologique des productions alimentaires. En effet, si dans certaines conditions, ces bactéries peuvent à nouveau se multiplier, leur non prise en compte

peut alors engendrer une sous-estimation du risque microbiologique. De la même façon, il est nécessaire d'évaluer si les micro-organismes cibles peuvent développer des résistances aux agents antimicrobiens employés.

Les méthodes de détermination de l'activité antimicrobienne de textile notamment la norme ISO 20743 restent des méthodes assez simples et rapides. Dans le cadre de ce travail et pour comprendre les modes d'action des antimicrobiens, différentes méthodes d'étude de la physiologie des micro-organismes ont été employées en complément.

2. Méthodes d'étude de l'effet des textiles antimicrobiens sur les micro-organismes

En industries agro-alimentaires, toutes les surfaces sont susceptibles d'être colonisées par des micro-organismes et notamment par des biofilms, y compris les textiles : vêtements du personnel, gants, filtres des systèmes d'aération, lavettes utilisées en restauration collective. Les textiles antimicrobiens ont pour but de lutter contre cette colonisation des textiles par des micro-organismes et par conséquent de prévenir la formation de biofilms afin de réduire les risques de contaminations des aliments par leur environnement de production.

En effet, la formation de biofilms sur les chaînes de production entraîne souvent la contamination du produit avec comme risque final une infection du consommateur. Il reste donc essentiel dans un premier temps, de pouvoir détecter les micro-organismes pour, dans un second temps, mettre en place des mesures de prévention et de lutte.

Reij *et al.* [100] ont décrit la recontamination des aliments par des micro-organismes des industries agro-alimentaires après la fabrication des produits alimentaires. La recontamination est définie comme la contamination du produit fini après sa fabrication. D'après une étude réalisée par l'Organisation Mondiale de la Santé en 1995, en Europe, 25 % des maladies d'origine alimentaire, seraient dues à une recontamination [100]. Les facteurs les plus importants qui contribuent à la présence de pathogènes dans les aliments seraient les suivants : 1,6 % des cas liés à une mauvaise hygiène, 3,6 % dûs à des contaminations croisées, 4,2 % à cause de la conservation des aliments ou de leur fabrication dans des locaux non adaptés, 5,7 % du fait d'équipements contaminés et enfin 9,2 % de contaminations par le personnel [100]. Dans ce contexte, les biofilms sont considérés comme particulièrement néfastes pour les risques de contamination des aliments qu'ils représentent. Il existe déjà de nombreux outils de lutte contre les biofilms pour maîtriser la sécurité microbiologique des productions alimentaires notamment le nettoyage et la désinfection des installations ou encore

l'utilisation de surfaces pouvant limiter les risques d'installation d'un biofilm. Conférer une fonction antimicrobienne à des textiles est alors une des approches possibles.

Dans l'objectif de maîtriser la sécurité microbiologique des aliments, il est donc nécessaire de posséder des techniques afin de suivre la réponse des micro-organismes cibles à l'exposition à des agents antimicrobiens.
Dans les paragraphes suivants, nous présenterons dans un premier temps le mode de formation des biofilms et quel impact peut avoir leur formation en agro-alimentaire. Dans un deuxième temps, les techniques employées pour l'étude de la physiologie des micro-organismes seront présentées. Des techniques de microscopie à épifluorescence mais aussi la spectrofluorimétrie et la spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier (IRTF) ont été employées dans le but de comprendre les mécanismes d'action des agents antimicrobiens employés dans le cadre de ce travail vis-à-vis des souches bactériennes cibles : elles sont donc également présentées.

En industries agro-alimentaires, différentes flores pathogènes ou d'altération peuvent être responsables de contaminations croisées. Ces souches sont représentées par une large gamme de micro-organismes tels que des bactéries à Gram positif (*Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus*…) des bactéries à Gram négatif (*Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella*…) mais également des levures et des moisissures. Parmi ces souches bactériennes, certaines sont capables de s'implanter sur une surface au sein d'un biofilm pouvant être mixte c'est-à-dire contenir différentes espèces ce qui leur permettrait une meilleure résistance aux traitements antimicrobiens.

2.1. Description et définition des biofilms

Le biofilm se définit comme une population bactérienne adhérant à une surface et enrobée d'une matrice de polymères extracellulaires (EPS). Les différentes étapes de formation du biofilm sont présentées dans la figure 1-9. La première étape d'attachement fait intervenir des appendices générateurs de mouvement ou flagelles qui permettent d'approcher la surface à coloniser [101]. Cette approche conduit à un attachement réversible pendant lequel la bactérie va chercher à « évaluer » la surface sur laquelle elle se trouve. Dans un deuxième temps, une association stable avec la surface ou avec d'autres micro-organismes déjà présents s'établit. Ces rassemblements de bactéries conduisent à la formation de micro-colonies dont la

différenciation mène à l'élaboration d'un biofilm [102]. À partir d'une concentration suffisamment dense d'individus, les micro-colonies commencent la sécrétion d'EPS. Le biofilm grandit et mûrit, s'épaississant jusqu'à devenir macroscopique en conditions optimales. La dernière étape est la phase de dispersion, dite phase planctonique. Ces micro-organismes retournent à l'état dit "planctonique" de libre circulation et peuvent aller coloniser de nouvelles surfaces, complétant ainsi le cycle.

La matrice d'EPS représente un volume important au niveau des biofilms [103]. Cette matrice renforce la structure du biofilm tout en lui conservant une grande plasticité. Au sein du biofilm, les micro-colonies sont séparées par des canaux aqueux qui forment un réseau de circulation permettant, d'une part, d'acheminer l'oxygène et les nutriments dans les régions enfouies du biofilm, et d'autre part, d'évacuer les déchets. Le matériel soluble peut diffuser à travers la matrice d'EPS et être utilisé par les bactéries. Un gradient de nutriments et d'oxygène est observable depuis le sommet du biofilm jusqu'à sa base où le micro-environnement est anaérobie. Cette observation conforte l'idée selon laquelle l'état métabolique d'une bactérie à l'intérieur d'un biofilm dépend de sa localisation au sein de la structure.

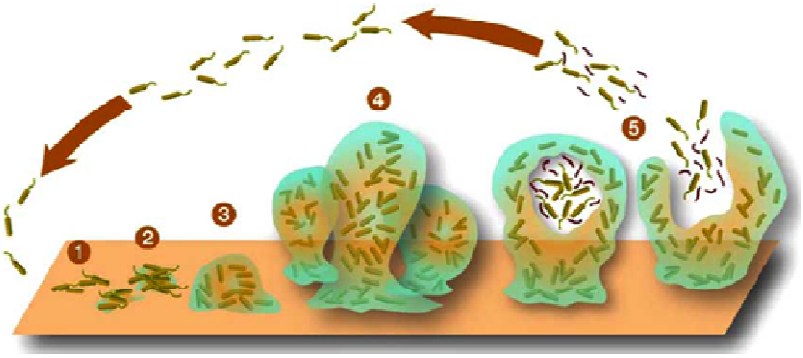


Figure 1-9 : Etapes de la formation d'un biofilm (Montana State University Center for Biofilm Engineering)

La formation du biofilm peut prendre un certain temps. En effet, la cinétique de formation du biofilm par *Staphylococcus epidermidis* sur des lentilles intra-oculaires en acrylique hydrophobe présente 4 phases de croissance [104] :

1- Une phase de latence : 12 h d'incubation correspondant au début de la formation du biofilm avec une accumulation lente de biomasse qui s'attache à la surface.

2-3 - Une phase dynamique ou d'accélération de croissance : 12 à 24 h d'incubation avec un développement rapide du biofilm et une accumulation marquée de biomasse fixée à la surface.

4 - Une phase linéaire de croissance correspondant à l'accumulation du biofilm sur le support de façon constante. A la fin de cette phase (28 h d'incubation), la surface de la lentille est totalement colonisée.

5 - Une phase de stabilisation et de dissémination : après 28 h d'incubation caractérisée par un nombre constant de bactéries attachées et une dissémination de ces dernières.

2.2. Les biofilms en industries agro-alimentaires et les risques microbiologiques liés

Les biofilms possèdent leur propre régulation et lorsqu'ils se multiplient, certaines cellules peuvent se séparer du biofilm et celles-ci peuvent coloniser de nouveaux substrats ou contaminer des produits [105]. Pan *et al.* [106] ont montré que la résistance de *Listeria monocytogenes* à la désinfection lors d'une simulation de procédé de fabrication était due aux propriétés liées au fait que les cellules sont adhérentes et non aux propriétés intrinsèques de la bactérie.

La capacité des bactéries à être transférées c'est-à-dire à contaminer une surface est notamment liée à leur adhésion. Les facteurs qui influencent cette capacité peuvent être divisés en 2 groupes [107] que sont : les facteurs environnementaux et les facteurs intrinsèques. Le premier groupe comprend les facteurs chimiques et/ou physiques tels que les propriétés de la surface, l'humidité, la pression et le temps de contact. Le second groupe inclut les facteurs liés à la bactérie tels que la capacité à produire des exopolysaccharides, la formation de biofilm ou encore la présence de structures extracellulaires comme les *curli* ou *fimbriae*.

Les biofilms sont présents dans tous les secteurs (laiteries, brasseries, meuneries, sucreries, malteries, salaisonneries…) et à tous les niveaux de la chaîne de production. Toute installation industrielle fabriquant des produits à humidité intermédiaire ou élevée est exposée à la formation de biofilms. Tout équipement non stérile abrite des micro-organismes qui peuvent amorcer un processus de colonisation entre deux procédures de nettoyage-désinfection, et ce en quelques heures [108]. Les contaminations d'aliments résultant de la présence de biofilms en industrie agro-alimentaire ont un impact socio-économique important. En effet, chaque année, des toxi-infections alimentaires collectives (TIAC) sont à l'origine de décès ou de maladies qu'il faut traiter (frais d'hospitalisation, traitements

médicaux…). De nombreux incidents liés à la contamination de produits alimentaires ont en effet été médiatisés ces dernières années et les menaces d'ordre alimentaire ont donc une incidence considérable.

La création de textiles antimicrobiens pourrait donc être un moyen de lutte contre les contaminations croisées et l'implantation de micro-organismes sur les vêtements de travail avec comme objectif de réduire les contaminations des produits au cours du procédé de fabrication. Cependant, les cellules au sein d'un biofilm possèdent des caractéristiques différentes des cellules planctoniques notamment vis-à-vis de la sensibilité aux agents antimicrobiens.

2.3. Comportement des biofilms vis-à-vis des agents antimicrobiens

Dans la plupart des environnements, les bactéries rencontrées sur les surfaces en contact avec les aliments et les textiles existent le plus souvent au sein de biofilms. Les communautés bactériennes ainsi formées peuvent être considérées comme des « refuges » vis-à-vis des phénomènes de compétition, de prédation mais également vis-à-vis d'autres conditions défavorables [109].

L'utilisation du verre pour tester la capacité d'un micro-organisme à former des biofilms est intéressante, d'une part parce qu'il s'agit d'une surface chargée négativement, comme l'acier inoxydable couramment utilisé dans les industries agro-alimentaires et d'autre part parce qu'il est possible d'observer directement la formation du biofilm au microscope à contraste de phase sur cette matière [110]. De ce fait, différents auteurs ont utilisé ce matériau pour l'évaluation de l'activité antimicrobienne vis-à-vis de biofilms microbiens de différentes molécules. Un test pour évaluer l'efficacité d'un désinfectant sur les biofilms a été mis en place par Luppens *et al.* en 2002 [110]. Ce test est un système simple composé d'un flux constant de nutriment et qui se rapproche le plus possible d'un des tests standard au niveau européen pour les désinfectants (EN 1040). Lors de cette étude, les auteurs ont confirmé que les cellules présentes dans un biofilm sont moins sensibles aux désinfectants que les cellules en suspension. En effet, pour une exposition de 5 minutes à 5 mg/L de chlorure de benzalkonium 100 % des cellules de *S. aureus* survivent lorsqu'elles sont en biofilm contre 10 % seulement lorsque les cellules se trouvent sous forme planctonique. Ceci est en accord avec les résultats obtenus par Wong en 1998 [111]. Ce dernier insiste également sur le fait que la résistance des bactéries du biofilm est conditionnée par le type de surface.

Newman *et al*. [112] ont observé que les bactéries planctoniques (*Pseudomonas aeruginosa*) commencent à mourir ou à être non cultivables après 20 minutes de contact avec un pansement antimicrobien contenant de l'argent. Après 100 minutes de contact, la totalité des bactéries sont mortes. Percival *et al*. [113] ont quant à eux observé que seulement 90% des bactéries en biofilm (*Pseudomonas aeruginosa*) meurent après 24 heures de contact avec ces mêmes pansements. Cela indique que les bactéries présentes dans un biofilm peuvent acquérir un phénotype plus résistant que leurs égales planctoniques.
La résistance accrue aux antimicrobiens des bactéries présentes dans les biofilms peut s'expliquer de différentes façons :

- tout d'abord, la croissance lente des bactéries présentes dans le biofilm peut rendre ces dernières moins sensibles aux désinfectants. En effet, certains modes d'actions concernent les fonctions « vitales » des micro-organismes et s'ils sont en phase de croissance lente, les cibles peuvent être moins accessibles ;

- Il existe un gradient de concentration en composé antimicrobien. En effet, si les micro-organismes à la surface d'un biofilm sont en contact direct avec les solutions de nettoyage et/ou de désinfection, ceux qui sont implantés au cœur d'un biofilm ne le sont pas. De ce fait un gradient décroissant de concentration en agents désinfectants ou nettoyants de la surface des biofilms vers leur cœur peut être observé. Ainsi, Stewart *et al.* [114] ont montré une pénétration plus ou moins rapide de 2 agents antimicrobiens (le dichlorosulfamate et les ions hypochlorites) à travers un biofilm mixte de *P. aeruginosa* et *Klebsiella pneumoniae*. Il s'est avéré que le dichlorosulfamate diffusait plus rapidement ($1{,}0.10^{-5}$ à $1{,}1.10^{-5}$ cm^2 par seconde) que les ions hypochlorites ($1{,}9.10^{-5}$ cm^2 par seconde) à travers ce biofilm. Ces différences de diffusion étant principalement dues à la « consommation » de la molécule au cours de la diffusion par des réactions chimiques ayant lieu au sein de la matrice d'exopolysaccharide.

- Les propriétés de surface des bactéries sont également en lien avec leur capacité à adhérer plus ou moins fortement sur différents types de supports. Il est donc important de pourvoir les caractériser notamment par la technique de MATS (Microbial Adhesion to Solvents).

2.4. Caractérisation des propriétés de surface des souches bactériennes : méthode MATS (Microbial Adhesion to Solvents)

Cette méthode a été mise au point en 1996 par Bellon-Fontaine *et al.* [115]. Elle consiste en la caractérisation de la surface cellulaire des micro-organismes (détermination des caractéristiques électron-donneur, électron-accepteur). La plupart des micro-organismes possèdent soit un caractère électron-donneur fort et un caractère électron-accepteur faible soit le contraire.

Cette méthode repose sur l'affinité des micro-organismes pour différents solvants :

- un solvant monopolaire acide : le chloroforme,
- un solvant monopolaire basique : l'acétate d'éthyle,
- deux solvants apolaires : le décane et l'hexadécane.

Ainsi, la différence d'affinité entre le chloroforme et l'hexadécane nous renseigne sur le caractère électron-donneur d'une souche bactérienne, puisque les composantes de Van Der Waals des deux solvants sont identiques.

De même, la différence d'affinité entre l'acétate d'éthyle et le décane nous renseigne sur le caractère électron-accepteur de cette même souche bactérienne, les composantes de van der Waals des deux solvants étant identiques.

L'estimation des caractéristiques électron-donneur et électron-accepteur ainsi que l'affinité pour les solvants apolaires permettent de déduire le caractère hydrophile/hydrophobe de la souche. Le pourcentage d'adhésion au solvant est ensuite déterminé à l'aide de ce rapport :

$$\frac{DO_{\text{(phase aqueuse de départ)}} - DO_{\text{(phase aqueuse après mélange)}}}{DO_{\text{(phase aqueuse de départ)}}} \times 100$$

Certains auteurs [116] ont déterminé les propriétés électriques de surface, l'hydrophobicité, les propriétés électron-donneur et électron-accepteur de *Listeria monocytogenes* Scott A dans différentes conditions de croissance. Les méthodes de MATS et de microélectrophorèse ont été utilisées. Cette étude a permis de mettre en évidence l'implication des interactions électriques et acides bases dans l'adhésion de *Listeria monocytogenes* ScottA à l'acier inoxydable. En effet, la surface cellulaire de ce micro-organisme est hydrophile lorsqu'il croît en Bouillon Cœur Cervelle (BCC) ou Tryptone Soja extrait de levures (TSYE) à 37°C et cette hydrophilie diminue lorsque ce même micro-organisme est cultivé en présence de glucose ou

d'acide lactique. Les conditions de croissance peuvent donc influencer les propriétés physico-chimiques de la surface cellulaire et par conséquent l'adhésion aux surfaces.

Planchon *et al.* [117] ont évalué la capacité de plusieurs souches de *Staphylococcus xylosus* à former un biofilm. La détermination des propriétés de surface de ces souches a permis de mettre en évidence leurs caractères hydrophobes et hydrophiles. La majorité des souches possédait des caractères hydrophiles et était donc capable d'adhérer préférentiellement à une surface hydrophile comme l'acier inoxydable.

Grâce à la détermination des caractères de surface d'une souche, il serait donc possible de « prédire » sa capacité à adhérer à un support plutôt qu'à un autre en fonction du milieu et de l'environnement dans lequel elle se trouve.

2.5. Evaluation de la viabilité des micro-organismes par microscopie à épifluorescence

2.5.1. Principe

Pour dénombrer des cellules viables adhérentes à une surface, il est nécessaire de les décrocher du support à l'aide de procédés physiques tels que l'utilisation d'un homogénéisateur, d'ultra-sons ou encore l'écouvillonnage. Les micro-organismes ainsi récupérés peuvent alors être ensemencés en gélose nutritive et incubés dans le but de réaliser un dénombrement des unités formant colonies (UFC). Cette méthode dite méthode « pasteurienne » permet de détecter seulement les formes viables capables de se multiplier sur milieux gélosés [118]. Cependant, l'exposition à différents stress peut entraîner la formation de cellules viables mais non cultivables (VNC) qui peuvent causer des problèmes de contamination en industries agro-alimentaires [119]. Les bactéries VNC sont définies comme des bactéries incapables de se multiplier sur les milieux de culture conventionnels mais ayant néanmoins conservées une activité métabolique [120]. Cet état est très complexe et sa définition a été très controversée au cours de ces dernières années. Elle peut s'appliquer à deux états physiologiques différents définis par des bactéries potentiellement réplicatives c'est-à-dire pouvant retrouver leur capacité à cultiver si des conditions adéquates sont rencontrées ; ce qui conduit à la « ressuscitation » des cellules [121] ou des bactéries en phase de transition, de la vie vers la mort cellulaire, qui possèdent encore des signes d'activité métabolique mais qui sont en phase de dégradation progressive [120]. Dans le cas du « réveil » des cellules, certaines cellules ne pouvant pas être détectées par les méthodes

classiques de dénombrement. La non prise en compte de ces cellules à l'état VNC entraînerait alors un risque de sous-estimation du risque microbiologique.

L'utilisation de marqueurs de viabilité fluorescents permet de mettre en évidence (soit par microscopie, soit par cytométrie de flux) les différents états physiologiques des bactéries (viables, viables non cultivable et mortes). Ainsi, cette méthode permet non seulement le dénombrement de la majorité des bactéries mais donne également une idée sur leur état physiologique dans différentes conditions (phase exponentielle, phase de déclin, stress, manque de nutriments…). Ainsi, Oliver *et al.* [119] ont décrit 111 espèces différentes capables d'entrer dans un stade VNC incluant de nombreux pathogènes humains avec notamment *Campylobacter spp.*, *Escherichia coli*, *Helicobacter pylori*, *Legionella pneumophila*, *Listeria monocytogenes* ou *Pseudomonas aeruginosa*. Dans certains cas, les bactéries VNC sont métaboliquement actives et donc capables de causer diverses contaminations [122].

Parmi les méthodes utilisées pour le dénombrement bactérien, celles faisant intervenir des numérations directes au microscope offrent des possibilités intéressantes dans le domaine de la microbiologie, par rapport aux méthodes nécessitant une phase de croissance (sur milieu gélosé), on notera également l'intérêt de l'utilisation de la cytométrie de flux.
Grâce à la cytométrie de flux, il est en effet possible d'évaluer en parallèle le degré de viabilité des cellules analysées par l'utilisation de marqueurs fluorescents ou substrats de viabilité devenant fluorescents lorsqu'ils sont métabolisés dans la cellule par mesure de l'intensité de fluorescence de ces marqueurs. Khan *et al.* [123] ont utilisé la cytométrie de flux pour dénombrer des cellules d'*Escherichia coli* O157:H7, de *Pseudomonas aeruginosa*, de *Pseudomonas syringae*, et de *Salmonella enterica* après différents marquage à l'aide de 4 marqueurs capables de traverser la membrane, le Syto 9, le Syto 13, le Syto 17 et le Syto 40 et un marqueur de l'ADN ne traversant pas la membrane, l'iodure de propidium pendant 70 minutes. Les résultats obtenus par cytométrie de flux ont été comparés à des dénombrements sur milieux gélosés après exposition des cellules à la chaleur et ceci a mis en évidence le biais du dénombrement en milieu gélosé qui sous estime la population de cellules encore viables.

La microscopie à épifluorescence est très largement utilisée en microbiologie. Il s'agit d'une méthode de détection directe des micro-organismes. Elle permet après filtration et coloration, un examen microscopique et un dénombrement des bactéries présentes dans un échantillon.

Utilisée depuis 1970, ce mode d'observation en lumière incidente requiert l'emploi de fluorochromes spécifiques se fixant sur les bactéries à observer. Le complexe ainsi formé avec les bactéries est excité en lumière de courte longueur d'onde et émet une lumière visible intense dans une longueur d'onde supérieure. La coloration se fait grâce à l'utilisation de fluorochromes et l'examen microscopique se réalise sous lumière UV. Un microscope équipé en épifluorescence est pourvu de plusieurs jeux de filtres correspondant aux fluorochromes les plus habituellement utilisés. Chaque jeu de filtres est constitué d'un filtre d'excitation (excitation de l'échantillon), d'un miroir dichroïque (qui réfléchit les rayons de courtes longueurs d'onde correspondant à l'excitation et transmet les plus grandes longueurs d'onde) et d'un filtre d'émission (qui bloque la lumière d'excitation parasite résiduelle et laisse passer la fluorescence) comme présenté dans la figure 1-10.

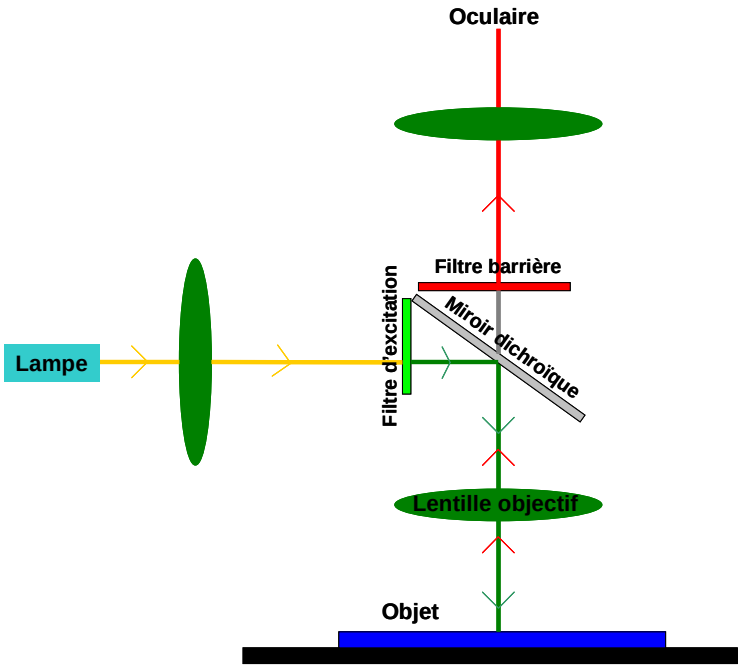


Figure 1-10 : Principe du fonctionnement d'un microscope à épifluorescence

Un autre intérêt de cette méthode réside dans la possibilité d'observer des agrégats complexes de micro-organismes comme des cellules sous forme de biofilm [124].

2.5.2. Les fluorochromes

Différents fluorochromes sont communément utilisés comme marqueurs pour l'observation par microscopie à épifluorescence des micro-organismes. Ces marqueurs sont les suivants : l'acridine orange, le DAPI (4',6'-diamino-2-phénylindole), le bromure d'éthidium, le CTC (chlorure de 5-cyano-2,3-ditolyl tetrazolium), le ChemchromB, le Chemchrom V6 (internalisation d'un marqueur non fluorescent qui est par la suite clivé par des estérases présentes dans les bactéries vivantes) [125], le Live/Dead® Baclight™, la fluorescamine, le Syber green et bien d'autres. Certaines colorations permettent de détecter les cellules mortes et les cellules vivantes. Les colorations au DAPI et à l'acridine orange sont communément employées pour déterminer l'abondance des bactéries et le volume cellulaire dans des échantillons planctoniques [126]. Ces deux colorants permettent également un dénombrement de la totalité des cellules. La figure 1-11 présente les différents fluorochromes utilisés en microscopie à épifluorescence et le tableau 1-3 représente les fluorochromes les plus couramment utilisés.

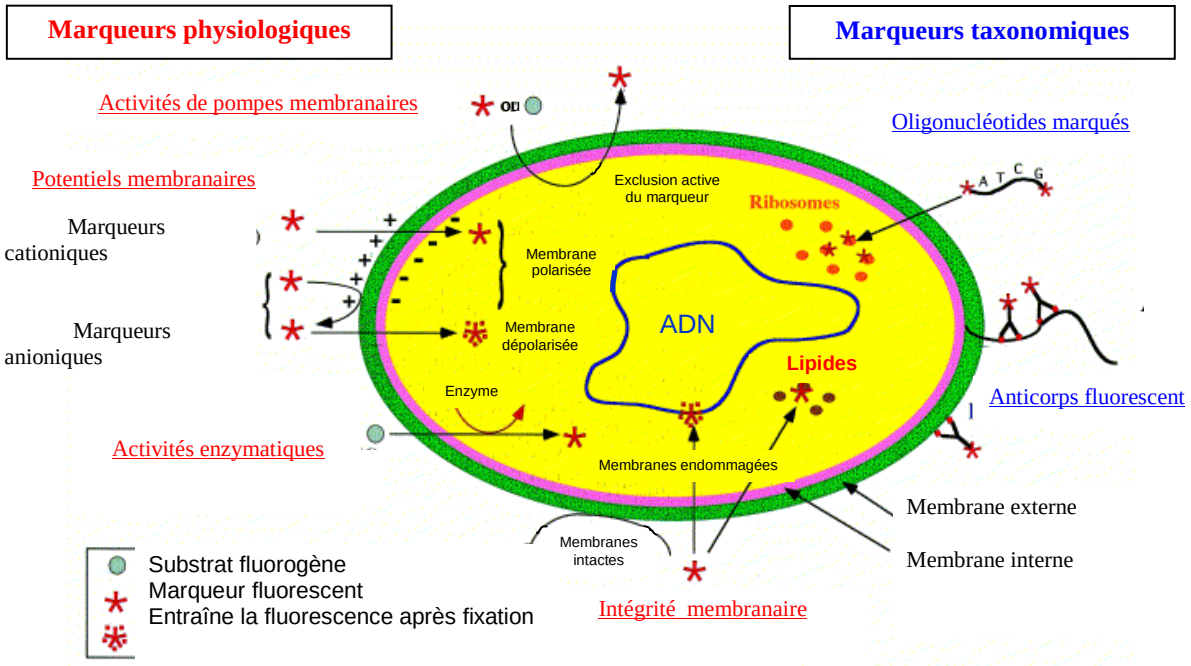


Figure 1-11 : Mode de fonctionnement des différents fluorochromes. D'après Trevors *et al.* [127]

Tableau 1-3 : Caractéristiques des fluorochromes les plus couramment utilisés (selon [127- 131])

Type de marqueur	Fluorochromes	λ excitation (nm)	λ émission (nm)	Cible	Mode d'action
Acides nucléiques et intégrité membranaire	Iodure de propidium	535	617	ADN	Pénètrent les cellules ayant une membrane endommagée : fixation aux acides nucléiques
	Bromure d'éthidium	518	605		
	$PO\text{-}PRO_3$	539	567		
	DAPI (diamidino-4',6-phénylindol-2 dichlorhydrate)	345	455	Préférentiellement l'ADN double brin et l'ARN	S'intercale entre les bases A, T et U en émettant une fluorescence bleue
	Acridine orange	503	530/640	ADN/ARN	Marque les acides nucléiques (ADN ou ARN). Si le rapport ARN/ADN est élevé, les bactéries sont actives→ coloration rouge ou orange Si le rapport ARN/ADN est faible, les bactéries sont mortes → coloration verte
	Chromomicyne A3	445	575	Bases G-C	S'intercale entre les bases G et C
	SYTOX vert SYTO 9	504	523	ADN	Pénètre dans toutes les cellules quelque soit leur état physiologique et se fixe aux acides nucléiques : coloration verte des cellules
Activité respiratoire	CTC (Chlorure de 5-cyano-2,3-ditolyl tetrazolium)	450	580-660	Agit comme substrat chromogène pour la déshydrogénase	Quand il est réduit en CTF (3-cyano-1,5-ditolyl formazan) il émet une fluorescence rouge : viabilité des cellules (activité respiratoire). Le CTC est souvent utilisé en complément du DAPI. Il présente un effet toxique sur le métabolisme des bactéries. Certaines bactéries, bien qu'elles soient viables, ne peuvent pas être marquées par le CTC parce que leur métabolisme respiratoire est faible.
Activité enzymatique	Fluorescéine diacétate (FDA) Carboxy-fluorescéine ChemChrom V6	473 492 488	514 517 520	Agit comme substrat chromogène pour l'estérase	La FDA est clivée en produits hydrophiles qui sont retenus dans la cellule. Seules les cellules ayant une membrane intacte et présentant une activité estérasique sont capables d'accumuler la fluorescéine
Potentiel membranaire	Rhodamine 123 DiOC6 Oxonol VI	507 484 599	529 501 634	Pompes membranaires	Les fluorochromes cationiques colorent les cellules présentant un potentiel membranaire négatif à l'intérieur en vert L'Oxonol VI étant un fluorochrome anionique, il s'accumule à l'intérieur de la cellule si la membrane est dépolarisée.

2.5.3. Le kit d'évaluation de la viabilité des micro-organismes : Live/Dead® Baclight™

Depuis sa mise sur le marché, il y a plus de 10 ans, le Live/Dead® BacLight™ a connu un énorme succès et a été utilisé dans divers domaines de recherche. La coloration avec le Live/Dead® Baclight™ Bacterial Viability Kit peut être utilisée pour estimer les bactéries viables et les bactéries totales d'un échantillon.

Ce kit est composé de deux fluorochromes : le SYTO 9 et l'Iodure de Propidium (IP) qui sont des marqueurs des acides nucléiques mais qui différent en leurs caractéristiques spectrales et leur capacité à pénétrer dans la cellule. Les deux colorants sont contenus dans une solution d'anhydride de diméthylsulfoxide (DMSO) [132].

Le SYTO 9 est un fluorochrome perméant qui est capable de pénétrer toutes les cellules quelque soit leur état physiologique puis de se fixer aux acides nucléiques et de colorer les cellules en vert. Ainsi, ce fluorochrome peut être utilisé pour le marquage et le dénombrement de la totalité des cellules présentes dans un échantillon donné. Plusieurs chercheurs ont utilisé le SYTO 9 dans leurs travaux et il a été montré que ce fluorochrome est plus efficace et donne de meilleurs résultats en milieu acide [131]. L'Iodure de Propidium (IP) est utilisé comme contre colorant du SYTO 9 car il permet de distinguer les cellules mortes des celles viables. En effet, l'IP étant un fluorochrome non perméant à cause de la taille et de la charge de la molécule de propidium, il est capable de pénétrer uniquement les bactéries dont la membrane cytoplasmique est endommagée pour se fixer aux acides nucléiques et colorer ainsi les cellules en rouge [133] (figure 1-12).

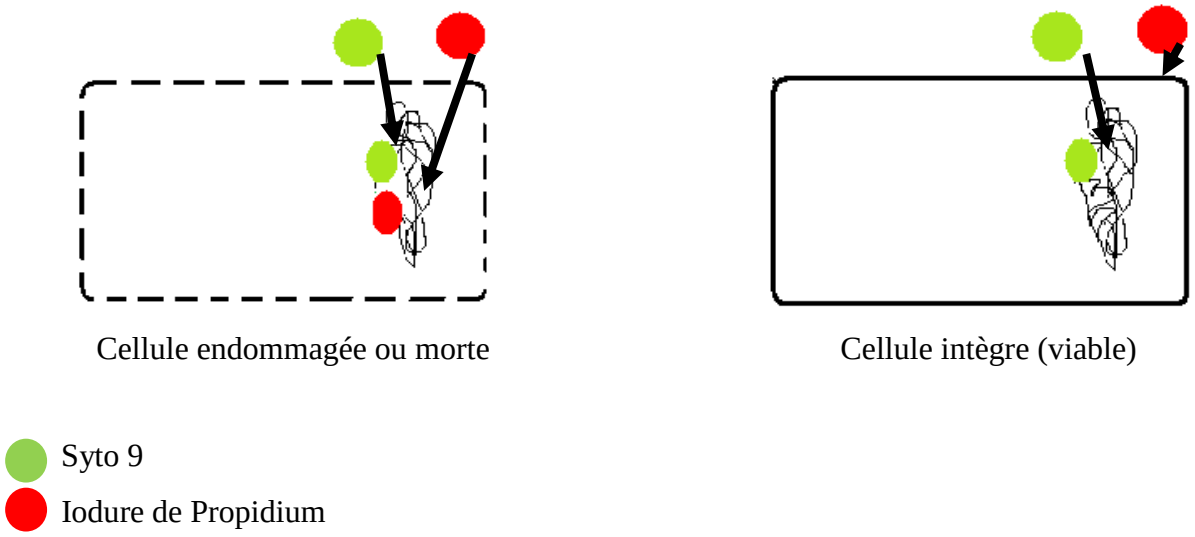


Figure 1-12 : Mode de fonctionnement des 2 fluorochromes du kit Live/Dead® BacLight™

L'intensité de la fluorescence obtenue avec ces deux fluorochromes est grande, avec un contraste important entre les cellules vertes et les cellules rouges et une fluorescence de fond minimale [132]. Contrairement au DAPI et à d'autres fluorochromes, les réactifs du kit Live/Dead® BacLight™ sont tolérés par plusieurs micro-organismes ce qui peut permettre une culture des bactéries après leur coloration. Comparé aux méthodes de dénombrement sur milieu, l'application du kit Live/Dead® BacLight™ en microscopie à épifluorescence permet de différencier les bactéries ayant une membrane endommagée et celles ayant une membrane intacte mais aussi de différencier les cellules actives et mortes puisqu'il a été montré que les cellules avec une membrane intacte ne sont pas toujours actives [134].

Cette méthode a été employée avec succès pour le dénombrement de cellules viables et de cellules totales en utilisant des membranes de filtration et la microscopie à épifluorescence dans l'eau courante [132]. Différentes applications de ce kit sont rapportées dans la littérature [135-137].

Dans l'étude d'Ercolini *et al.* [135], l'effet d'un film en polyéthylène fonctionnalisé par une bactériocine vis-à-vis de *L. monocytogenes* a été étudié. Dans ce but, les auteurs ont utilisé la microscopie à épifluorescence pour évaluer rapidement l'état des cellules après contact avec le film fonctionnalisé, grâce à l'utilisation du kit Live/Dead® BacLight™. Les auteurs ont ainsi pu mettre en évidence une partie du mode d'action de la bactériocine testée, c'est-à-dire l'implication de la membrane plasmique de *L. monocytogenes* en tant que cible de la molécule antimicrobienne. Pascaud *et al.* [137] ont utilisé le kit Live/Dead® BacLight™ pour évaluer la population de cellules viables dans le sol.

Dans l'étude de Kim *et al*. [136], l'effet de 3 antimicrobiens (chlore, ions argent et tobramycine) a été évalué sur des cellules de *P. aeruginosa* planctoniques et sur des cellules en biofilm. Le kit Live/Dead® BacLight™ et un autre fluorochrome (le CTC) ont été employés par microscopie à épifluorescence en association avec la cytométrie de flux. L'association de ces deux méthodes a permis de mettre en évidence des différences de mode d'action des antimicrobiens notamment avec le kit Live/Dead® BacLight™ qui permet de déterminer l'action au niveau de la membrane ou avec le CTC qui donne des informations sur la capacité des cellules à avoir une activité respiratoire.

La capacité à détecter les cellules viables mais non cultivables est un sujet très important en microbiologie. Les méthodes classiques de dénombrements sur milieux gélosés sous-estiment souvent la population microbienne réelle et de ce fait la microscopie à épifluorescence reste

une méthode de choix. Cependant, cette méthode peut présenter certains biais comme une mauvaise identification de la couleur des cellules ou encore un dénombrement qui dépend du manipulateur. Depuis peu, plusieurs chercheurs [138] ont démontré que la combinaison des 2 colorants ne produit pas deux groupes distincts de micro-organismes (vivants et morts) mais qu'il existe également un stade intermédiaire. Ce stade entraîne des difficultés d'interprétations. Il est donc important d'utiliser plusieurs indicateurs de viabilité afin de pouvoir donner une information fiable. Dans le cadre de ce travail, seul le kit Live/Dead® BacLight™ a été utilisé et les résultats ne donnent donc qu'une première information, à compléter avec d'autres méthodes d'évaluation de la viabilité des cellules. D'autres méthodes ont été employées, dans le cadre de ce travail, pour évaluer l'effet éventuel d'agents antimicrobiens sur les membranes des bactéries cibles :

- la spectrofluorimétrie en présence de marqueurs de fluidité membranaire ;
- la spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier pour évaluer les changements au niveau du micro-environnement de la membrane bactérienne.

2.6. Evaluation de la fluidité membranaire des micro-organismes par spectrofluorimétrie

Dans le cadre de ce travail, la spectrofluorimétrie en présence de marqueurs de fluidité membranaire a été utilisée pour évaluer la fluidité des membranes des bactéries après exposition à un stress. Cette méthode a été choisie car les biocides sélectionnés ont pour cible la membrane cytoplasmique.

2.6.1. La membrane cytoplasmique bactérienne : lipides et fluidité membranaire

Le modèle de mosaïque fluide dû à Singer et Nicholson [133] décrit à la fois la composition et le comportement dynamique des membranes biologiques. Le terme « mosaïque » a été employé car la composition de la membrane est très hétérogène à la fois dans l'espace et le temps.

Ainsi, l'existence de protéines membranaires, de lipides différents, de sucres complexes, presque indépendants les uns des autres, explique la dénomination de mosaïque. Les différents composants de la membrane sont représentés au niveau de la figure 1-13.

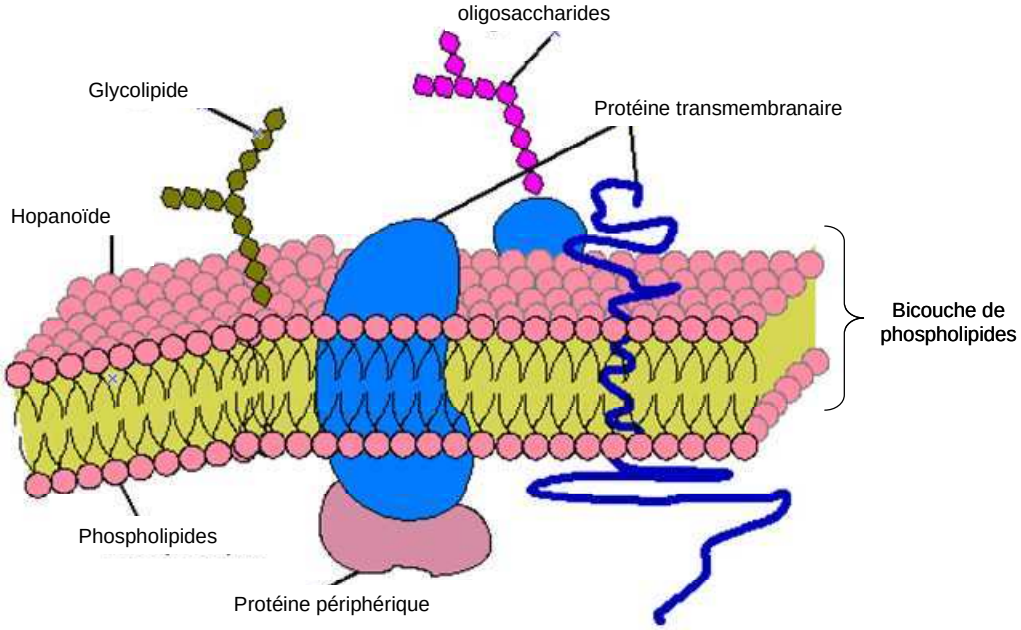


Figure 1-13 : Représentation schématique d'une membrane. D'après Prescott *et al.* [139]

Le terme « fluide » est employé car les phospholipides et les protéines membranaires peuvent bouger dans le plan de la membrane. De plus, la membrane est un corps parfaitement déformable dans les 3 directions de l'espace. Par exemple, la membrane peut onduler : les phospholipides peuvent en effet exécuter trois mouvements : par diffusion latérale, par rotation, et par diffusion transversale (flip-flop). C'est grâce à ces différents mouvements, que la membrane peut adopter différents états en fonction de la température et de la pression. Par exemple, une membrane de phospholipides purs forme une phase liquide-cristalline à 20°C et à 1 bar de pression tandis qu'à -20°C, elle forme plutôt une phase gel.
Les changements de fluidité membranaire peuvent être dûs aux interactions physiques ou chimiques des lipides membranaires avec des facteurs environnementaux tels que le pH, la pression, la présence d'ions… Le maintien de l'intégrité membranaire est un point critique pour la viabilité des cellules.

La compréhension de la dynamique des membranes cellulaires a considérablement avancé depuis le modèle de la mosaïque fluide de Singer et Nicolson [140]. Il est admis que la membrane est un point central pour la survie des micro-organismes car elle est en constant contact avec l'environnement. Les lipides membranaires sont les molécules qui s'adaptent le mieux en réponses à des perturbations de l'environnement. Dans des conditions physiologiques normales, la majorité des phospholipides de la membrane sont sous forme de

bicouches formant donc un stade lamellaire considéré comme le stade actif de la membrane [141].

La fluidité membranaire est une expression combinée des effets de la conformation, des diffusions rotationnelles et latérales et de la résistance de la membrane aux forces [142]. Le terme de fluidité membranaire englobe le type et le positionnement des lipides contenus dans cette membrane. Des changements de fluidité de la membrane peuvent se produire après différentes interactions entre les lipides membranaires et des facteurs de l'environnement tels que la température, le pH, la pression, les ions présents, la disponibilité de l'eau, les nutriments ou encore d'autres composés chimiques.

Pour comprendre ce mécanisme de fluidité membranaire, il est important d'étudier ce phénomène *in vivo*. Différentes recherches ont été réalisées directement sur les lipides ou sur des membranes reconstituées mais les membranes *in vivo* peuvent se comporter différemment vis-à-vis du stress.

2.6.2. La polarisation de fluorescence et les marqueurs utilisés

La polarisation de fluorescence a été utilisée dans le cadre de l'étude de modèles ou de systèmes de lipides extraits d'une membrane mais peu d'études ont concerné des membranes intactes ou les cellules entières vivantes. Dans le cadre de ce travail, elle est utilisée pour évaluer les changements de fluidité membranaire après contact avec un agent antimicrobien. Dans un premier temps, une explication de la méthode sera présentée pour ensuite présenter différentes études sur les stress subis par les membranes et les changements correspondants de fluidité membranaire en réponse.

L'analyse de la polarisation de fluorescence est réalisée en utilisant des sondes ou marqueurs fluorescents. Dans le cadre de notre étude, il s'agit de molécules fluorescentes capables de s'insérer dans la membrane.

La polarisation de fluorescence (ou anisotropie de fluorescence) est mesurée à l'aide d'un spectrofluorimètre équipé de polariseurs [141]. La source de lumière est une lumière UV le plus souvent une lampe au Xénon de 75 à 150 W. Cette lampe produit une longueur d'onde d'excitation qui est polarisée verticalement avant d'entrer dans la cuve de mesure. L'intensité d'émission de la lumière qui passe à travers l'échantillon est ensuite collectée par un ou 2 polariseurs d'émission qui dans le dernier cas sont orientés soit verticalement, soit

horizontalement. La lumière est ensuite transmise grâce à un photomultiplicateur et enregistrée via un ordinateur.

Dans une membrane de phase rigide, la sonde ne tourne pas librement à cause d'interactions augmentées entre les chaînes d'acides gras. Dans la membrane liquide cristalline, les interactions entre les chaînes d'acides gras sont réduites, ce qui permet plus de mouvement des chaînes, et donc plus de rotation de la sonde. Quand la sonde tourne librement, la fluorescence devient dépolarisée et la lumière est émise dans toutes les directions [143].
La relation théorique qui quantifie le degré de dépolarisation de la lumière émise par la membrane dans laquelle se trouve la sonde correspond au stade dans lequel se trouve la membrane au niveau fluidité. Le degré de polarisation est défini par 2 paramètres que sont le ratio de polarisation (P) et l'anisotropie de polarisation (r) qui est le plus utilisé et a été décrit par Shinitzky *et al.* [144].

$$r = \frac{I_{vv} - (GF \cdot I_{vh})}{I_{vv} + (2 \cdot GF \cdot I_{vh})}$$

Où :

- G correspond au facteur correctif instrumental,
- I_{vv} correspond à l'intensité d'émission transmise par la direction verticale,
- I_{vh} correspond à l'intensité d'émission transmise par la direction horizontale lorsque le faisceau d'excitation est orienté verticalement.

Le rapport entre la polarisation de la sonde et la fluidité de la membrane cytoplasmique est inverse. Quand la fluidité de la membrane cytoplasmique diminue, la valeur de polarisation augmente, et inversement. La rotation de la sonde fluorescente dans la membrane cytoplasmique dépend de la structure de la membrane. Trevors [143] a démontré que le degré de polarisation est inversement proportionnel à la fluidité membranaire lorsque la membrane est dans un stade liquide cristallin avec des interactions faibles au niveau des chaînes lipidiques, ce qui facilite la rotation du fluorochrome qui va émettre de la lumière dans toutes les directions ce qui entraîne une polarisation faible.

Pour réaliser ces mesures, l'utilisation de sondes fluorescentes est indispensable et ces sondes sont totalement ou partiellement lipophiles. Leur incorporation ne dépend pas d'une liaison

spécifique à la membrane et ne nécessite pas de prétraitement des cellules. Plusieurs types de fluorochromes ont été mis au point. Les principaux marqueurs utilisés pour l'étude des membranes sont présentés dans le tableau 1-4.

Tableau 1-4 : Marqueurs de fluorescence utilisés pour l'étude des membranes [143]

Nom du marqueur		**Exemples d'utilisation**
1,6-diphényl-1,3,5-hexatriène	DPH	Fluidité membranaire et température de transition
1-[4-(triméthyl-amino)-phényl]-6-phénylhexa-1,3,5-triène	TMA-DPH	Fluidité membranaire et température de transition; organisation lipidique membranaire de *Bacillus subtilis*
Acide 3-[4-(6-phényl)-1,3,5-hexatriényl]phényl propionique	DPH-PA	Fluidité membranaire et température de transition
N- phényl- naphthylamine	NPN	Marqueur hydrophobe utilisé pour l'analyse de la perméabilité membranaire des bactéries Gram négatif.
Iodure de 3,3'-dipropyl thiacarbocyanine	$DiSC_3$	Etude de la perméabilisation membranaire
Bis-(acide 1,3-dibutybarbiturique) triméthine oxonol	$DiBaC_4$	Mesure du changement du potentiel membranaire

Le plus couramment utilisé est le DPH (1,6-diphényl-1,3,5-héxatriène), fluorochrome très hydrophobe, symétrique qui pénètre dans la région hydrophobe de la membrane et s'oriente parallèlement à la chaîne de phospholipides [145, 146]. Le DPH émettant très peu de fluorescence dans l'eau, lorsqu'on mesure son l'intensité de fluorescence, celle-ci est essentiellement associée à la fluorescence du DPH inclus dans les membranes [144]. Son analogue, le TMA-DPH (1-[4-(triméthyl-amino)-phényl]-6-phénylhexa-1,3,5-triène) est un fluorochrome amphiphile, qui s'insère en surface de la membrane plasmique, entre les têtes hydrophiles des phospholipides en contact avec le milieu extérieur.

Ces deux marqueurs, très utilisés dans la littérature, ont été aussi choisis dans le cadre de ce travail car ils possèdent une intensité d'émission et d'excitation similaire, ce qui rend leur utilisation pratique. Ils sont sensibles à l'altération de la fluidité membranaire résultant de changements structuraux. Une fois insérés dans la bicouche lipidique, l'interaction avec les chaînes acylées des lipides membranaires peut gêner leur mouvement de rotation, et affecter la dépolarisation de la lumière d'excitation. C'est ce phénomène, impliquant une modification de l'anisotropie, qui nous indique une altération de la fluidité membranaire.

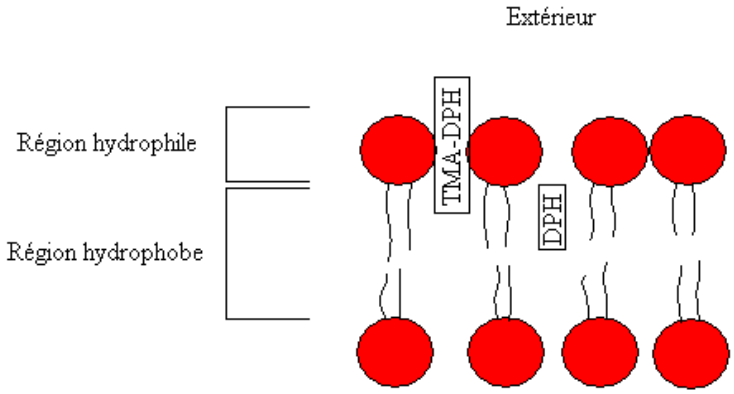


Figure 1-14 : Positionnement des sondes DPH et TMA-DPH dans la bicouche phospholipidique [143]

L'étude de Beranova *et al*. [147] a eu pour but d'étudier l'effet de la composition du milieu sur les adaptations de la membrane pour différentes températures de culture de *Bacillus subtilis*. Les techniques utilisées s'appliquent essentiellement à des membranes et des lipides isolés. Il en est de même dans l'étude de Konopasek *et al*. [145] où la mesure d'anisotropie de fluorescence est réalisée sur des modèles de vésicules de phospholipides. Dans cette étude, les auteurs définissent 2 régions où peut se localiser le DPH : l'intérieur de la membrane et la zone proche de la double couche de phospholipides (figure 1-14).

Différentes études utilisant ces 2 marqueurs seront présentées dans le paragraphe 2-6-3. L'utilisation de la spectroscopie de fluorescence ou encore fluorimétrie ou spectrofluorimétrie est intéressante pour l'étude de la fluidité membranaire et présente donc plusieurs avantages [141], notamment le fait de pouvoir travailler sur des cellules vivantes et de pouvoir les soumettre à différents stress. Les avantages des sondes lipidiques fluorescentes pour l'étude des membranes sont les suivants [141] :

- les sondes lipidiques fluorescentes sont intéressantes pour comprendre le fonctionnement des membranes dans différentes conditions de croissance ;
- les fluorochromes ont des spectres d'absorption et d'émission spécifiques pour faciliter leur quantification ;
- détection de faibles signaux avec des instruments de qualité et détection d'un signal d'émission de cellules seules ;
- les sondes fluorescentes sont très intéressantes pour une utilisation sur des cellules vivantes ;
- la fluorescence est cyclique, par conséquent un même fluorochrome peut être excité et détecté plusieurs fois ;

- les fluorochromes ont une bonne résolution spatiale au niveau des membranes ;
- très peu d'auto-fluorescence ou de fluorescence résiduelle due à la sonde non fixée ;
- des sondes sont disponibles pour des structures spécifiques ;
- il est possible de réaliser des mesures en temps réel avec des délais entre excitation et émission de 8 à 10 secondes ou moins ;
- il existe une bonne corrélation entre l'incorporation des sondes au niveau de la membrane et la mobilité ou fluidité des lipides ;
- 50 000 cellules bactériennes sont suffisantes pour l'analyse ;
- les sondes sont faciles à quantifier, stables, peu dangereuses et de prix raisonnable.

L'utilisation de cette méthode pour l'étude des changements membranaires lors de différents stress est donc pertinente.

2.6.3. Effet de différents stress sur la fluidité de la membrane cytoplasmique des bactéries

Dans un premier temps, les différents stress pouvant modifier la fluidité membranaire (tableau 1-5) seront présentés de façon générale. L'effet des composés antimicrobiens sur la fluidité des membranes des micro-organismes cibles sera ensuite présenté de façon plus détaillée. En effet dans le cadre de ce travail, l'étude du mode d'action du PHMB a été réalisée en utilisant la spectrofluorimétrie de fluorescence en présence de sondes de polarisation de fluorescence de la membrane.

Tableau 1-5 : Effets de différents stress sur la fluidité des membranes bactériennes

Stress	Références	Etudes
Température	Vincent *et al.* [124]	Etude de l'effet de la température (10-50°C) sur la polarisation de fluorescence de plusieurs espèces bactériennes → diminution de fluidité membranaire (augmentation de la polarisation de fluorescence) avec une augmentation de la température
Force ionique	Jack *et al.* [125]	Environnement fortement ionisé → forte charge négative des lipides membranaires, la charge négative de la membrane agit comme un site de fixation de cations et entraîne une répulsion électrostatique et une augmentation de la rigidité de la membrane
Dépression, vide partiel	Pokorny *et al.* [126]	Etude de l'effet d'une pression hypobare sur la fluidité membranaire de 2 souches (*Escherichia coli* et *Bacillus subtilis*) par la mesure de la dépolarisation du DPH Les bactéries ont été exposées à des pressions absolues de 67 et 33 kPa sur 19 jours → Pour *B. subtilis*, une pression de 33 kPa entraîne une diminution de la fluidité membranaire
Stress combinés	Chu-Ky *et al.* [127]	Etude de l'effet combiné de différents stress tels que le froid, l'éthanol et des chocs acides sur la fluidité membranaire d'*Oenococcus oeni*. Exposition combinée à l'éthanol et au froid → augmentation de la rigidité de la membrane et les cellules survivent mieux à l'exposition au froid.

La présence d'agents antimicrobiens est également un facteur faisant varier la fluidité des membranes bactériennes. Ikeda *et al*. [148] ont cherché à préciser le mécanisme d'action du PHMB au niveau moléculaire. Dans ce but, les auteurs ont utilisé le DPH (1,6-diphényl-1,3,5-hexatriène) comme sonde de polarisation de fluorescence pour évaluer sa polarisation de fluorescence au sein de la membrane par spectrofluorimétrie et la DSC (Differential Scanning Calorimetry). Ces 2 méthodes ont été employées pour évaluer les interactions du PHMB avec les phospholipides membranaires. La mesure de la polarisation de fluorescence (P), indique la fluidité de la membrane dans laquelle la sonde fluorescente (DPH) est enchâssée. Il est également possible de mesurer l'anisotropie de fluorescence qui donne la même information. Une diminution de polarisation indique une plus grande rotation de la sonde et donc une fluidité plus importante de la membrane. Les résultats obtenus par ces auteurs montrent que le PHMB a un effet plus important sur les charges négatives des lipides de la double couche que sur les lipides neutres comme la phosphatidylcholine (PC) ou la phosphatidyléthanolamine (PE). Un des effets mis en évidence dans cette étude est une diminution de la polarisation à faible température et une augmentation de la polarisation à forte température, soit une membrane plus fluide lorsque la température est plus faible. Plus la polarisation est haute, moins les molécules de DPH sont mobiles donc moins la membrane est fluide.

Jasniewski *et al.* [149] ont étudié le mode d'action de la mésenterocine 52 A, une bactériocine produite par *Leuconostoc mesenteroides* active vis-à-vis de différentes espèces de *Listeria*. Le degré d'insertion de cette molécule dans la membrane a été étudié par mesure de l'anisotropie de fluorescence de 2 sondes fluorescentes : le DPH et le TMA-DPH (1-[4-(triméthyl-amino)-phényl]-6-phénylhexa-1,3,5-triène). La bactériocine testée semble affecter la membrane de *Listeria ivanovii* seulement en surface car seule une augmentation de l'anisotropie de fluorescence du TMA-DPH a été mise en évidence.

Dans une étude d'Ulrich *et al.* [150], l'effet de flavonoïdes sur la fluidité de liposomes ou de membranes reconstituées a été évalué. Deux méthodes ont été utilisées : la spectroscopie de résonance magnétique et la spectrofluorimétrie avec l'utilisation du DPH.

L'ajout de flavonoïdes à une suspension de liposomes entraîne une augmentation de la polarisation du DPH (de 0,02 à 0,05). Ces résultats montrent que l'ajout de flavonoïdes augmente l'ordre mais diminue la dynamique des chaînes de phospholipides aux alentours du DPH. Ceci veut donc dire que la membrane devient moins fluide au contact du flavonoïde testé. Dans cette étude, les auteurs ont montré un effet de flavonoïdes sur une membrane reconstituée.

La spectroscopie de fluorescence utilisant le DPH a également été employée pour connaître l'influence de désinfectants chimiques sur la fluidité des membranes des bactéries visées avec comme but la compréhension de leurs mécanismes d'adaptation à ces molécules [151]. Les résultats obtenus par ces auteurs montrent qu'une exposition à des concentrations sub-létales de désinfectants acides entraîne une augmentation de la rigidité membranaire de *Salmonella* et *Listeria* de 4 à 40 %. Les changements de fluidité membranaire auraient joué un rôle significatif dans l'adaptation de ces 2 espèces aux désinfectants acides mais pas aux désinfectants alcalins et chlorés.

Il est donc intéressant d'utiliser la spectroscopie de fluorescence pour étudier l'action de molécules antimicrobiennes sur des cellules entières [149], ou sur des liposomes ou membranes reconstituées [150, 151].

2.7. Etude de la membrane des micro-organismes par spectroscopie Infrarouge à Transformée de Fourier (IRTF)

Dans le cadre de cette étude, la spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier (IRTF) a été utilisée dans le but de comprendre le mécanisme d'action du PHMB. La spectroscopie IRTF est basée sur l'absorption d'un rayonnement infrarouge par le matériau analysé. Elle permet *via* la détection des vibrations caractéristiques des liaisons chimiques d'effectuer l'analyse des fonctions chimiques présentes dans le matériau.

Lorsque la longueur d'onde (l'énergie) apportée par le faisceau lumineux est voisine de l'énergie de vibration de la molécule, cette dernière va absorber le rayonnement et on enregistrera une diminution de l'intensité réfléchie ou transmise. Le domaine moyen infrarouge entre 4000 cm^{-1} et 400 cm^{-1} correspond au domaine d'énergie de vibration des molécules. Toutes les vibrations ne donnent pas lieu à une absorption, cela dépend également de la géométrie de la molécule et en particulier de sa symétrie. La position de ces bandes d'absorption va dépendre en particulier de la différence d'électronégativité des atomes et de leur masse. Par conséquent à un matériau de composition chimique et de structure donnée va correspondre un ensemble de bandes d'absorption caractéristiques permettant d'identifier le matériau. La spectroscopie IRTF est une technique de mesure pour l'acquisition de spectres infrarouges. Au lieu d'enregistrer la quantité d'énergie absorbée lorsque la fréquence de lumière infrarouge varie (monochromateur), la lumière infrarouge passe au travers d'un interféromètre. Après avoir traversé l'échantillon, le signal mesuré est un interférogramme.

Une fois que le signal a subi une transformée de Fourier, on obtient un spectre identique à celui obtenu par une spectroscopie infrarouge conventionnelle (dispersive). Cette méthode d'analyse est simple à mettre en œuvre et non destructrice. Elle permet d'analyser aussi bien les matériaux organiques que les matériaux inorganiques. La grande diversité des montages expérimentaux permet la caractérisation de pratiquement tout type d'échantillon, quel que soit leur état physique ou de surface.

La spectroscopie IRTF est une des méthodes les mieux adaptées pour enregistrer des spectres IR de matériel biologique en particulier pour les membranes [152]. Il s'agit d'une méthode rapide et capable d'enregistrer un fort signal avec une quantité très faible de micro-organismes, de plus, cette méthode permet d'obtenir des informations sur l'orientation des différentes parties d'une molécule. Un des avantages de cette méthode est qu'elle permet une étude de la structure des lipides et des protéines dans des membranes biologiques intactes sans insérer de marqueurs qui pourraient perturber l'analyse. C'est pour cette raison, que dans le cadre de ce travail, plusieurs méthodes (la microscopie à épifluorescence et la spectrofluorimétrie en présence de sondes fluorescentes et la spectroscopie IRTF) ont été employées en parallèle pour une meilleure compréhension du mécanisme d'action du PHMB.

La spectroscopie IRTF va donc nous permettre d'obtenir une information directe sur la composition et la structure de bactéries entières et non fixées [153]. Au cours des 15 dernières années, de nombreuses études ont montré les potentialités de la spectroscopie IRTF comme étant une méthode rapide et peu coûteuse pour notamment différencier les bactéries entre elles [154, 155]. Le spectre IR de bactéries intactes apporte donc des informations sur le contenu de la bactérie et est composé de multiples bandes. Un des avantages de cette technique est qu'elle permet également d'avoir des informations sur l'état physiologique des souches bactériennes testées [156].

Cette méthode peut donc être un outil intéressant pour comprendre le mode d'action d'agents antimicrobiens. Par exemple, Zeroual *et al.* [157] ont étudié les effets de différents antibiotiques sur *E. coli* grâce à la spectroscopie IRTF. Giudici *et al.* [158] ont quant à eux utilisé la spectroscopie IRTF et la spectrofluorimétrie pour étudier les effets de la viscotoxine (une protéine qui interagit avec les membranes bactériennes et qui entraîne des effets toxiques) sur des membranes modèles. Les auteurs ont pu montrer que cette molécule interagissait avec les phospholipides de la membrane et également qu'il existait des changements de fluidité de la membrane. Huleihel *et al.* [159] ont utilisé la spectroscopie

IRTF dans le but d'évaluer l'activité d'agents antimicrobiens. Les résultats présentés dans cette étude montrent la potentialité d'utiliser la spectroscopie IRTF pour évaluer l'activité d'agents antimicrobiens de façon rapide et répétable. Il a été montré que les différences entre les spectres IR des échantillons pouvaient être un excellent biomarqueur pour évaluer l'efficacité de certaines drogues.

3. Conclusion

La création de textiles antimicrobiens pour le secteur agro-alimentaire ou hospitalier apparait donc comme une réponse à un besoin. En effet, les contaminations croisées et les flores d'altération rencontrées notamment dans les industries agro-alimentaires entrainent chaque année de nombreuses TIAC entrainant dans certains cas la mort et un coût certain lié aux soins.

Des textiles antimicrobiens fonctionnalisés avec de l'argent ou du PHMB sont déjà commercialisés avec des applications essentiellement médicales (bandes, pansements…). Ces agents antimicrobiens se sont avérés être actifs sur plusieurs souches bactériennes et sont référencés dans la directive Biocide. La cytotoxicité de ces molécules reste cependant un point important qu'il est nécessaire de vérifier avant leur application.

L'objectif de ce travail de thèse est, en collaboration avec différents partenaires, d'évaluer l'activité antimicrobienne de textiles fonctionnalisés par traitement plasma et voie sol-gel à l'argent ou au PHMB pour une application agro-alimentaire (vêtements de travail essentiellement). Afin de déterminer si les fonctionnalisations appliquées sur le textile entrainent une inhibition des souches bactériennes testées, le LRGIA a utilisé une méthode normalisée, la norme ISO 20743/2005. Le fait de travailler en collaboration avec le Laboratoire de Sciences Analytiques à Lyon nous a permis de pouvoir relier les activités antimicrobiennes aux analyses des traitements de surface réalisées sur textiles. En effet, l'étroite collaboration entre nos 2 laboratoires durant le projet a permis de décrire les différents traitements de façon précise grâce à l'analyse de surface mais a également permis d'expliquer le comportement des souches cibles sur les textiles traités.

Ce test, permettant de définir si un textile est actif vis-à-vis de la souche testée ne permet cependant pas de détecter la présence d'éventuelles cellules viables mais non cultivables pouvant entraîner des contaminations et si les conditions de température, nutriments et pH les rendent à nouveau cultivables. C'est dans cet objectif que la microscopie à épifluorescence a été utilisée. La viabilité des cellules après contact avec un textile traité a été comparée avec

des résultats de dénombrements sur milieu gélosé. Le but de cette comparaison était de mettre en évidence d'éventuelles cellules viables mais non cultivables. Le choix de cette méthode s'est basé sur la littérature avec l'emploi d'un kit permettant de détecter les cellules dont la membrane est endommagée : le kit Live/Dead® Baclight™.

Par la suite, le mécanisme d'action du PHMB sur une souche de *L. innocua* a été étudié. En effet, 2 méthodes ont été choisies pour évaluer l'action du PHMB sur cette souche : l'étude de la fluidité de la membrane après contact avec l'agent antimicrobien en présence de sondes fluorescentes et la spectroscopie IRTF pour évaluer les changements de conformation de la membrane notamment étudier les modifications au niveau des liaisons des lipides de la membrane de *L. innocua*.

4. Références Bibliographiques

[1] http://aida.ineris.fr/bref/bref_text/breftext/francais/bref/chap_02_06.htm. INERIS : Institut National de l'EnviRonnement industriel et des rISques, consulté le 23 juillet 2010.

[2] http://www.insee.fr/sessi/publications/dossiers_sect/pdf/textile2007.pdf. Le textile en chiffres - Editions 2007 - Protection industrielle hors série - Ministère de l'Economie des Finances et de l'Industrie. Consulté le 12 mars 2009.

[3]http://europa.eu/legislation_summaries/employment_and_social_policy/health_hygiene_safety_at_work/c11117_fr.htm#AMENDINGACT, consulté le 15 Juin 2010.

[4]http://europa.eu/rapid/pressReleasesAction.do?reference=IP/08/12&format=HTML&aged=1&language=FR&guiLanguage=fr. Consulté le 12 février 2010.

[5] http://www.industrie.gouv.fr/biblioth/docu/dossiers/sect/pdf/textiles6pages.pdf. Étude réalisée par Développement & Conseil Pour le compte de la DGE. Etude sur les textiles techniques, consulté le 10 février 2010.

[6] http://conseils.xpair.com/, consulté le 02 septembre 2010.

[7] J. R. Babb, J. G. Davies, G. A. J. Ayliffe. Contamination of protective clothing and nurses' uniforms in an isolation ward. *Journal of Hospital Infection* (1983) **4**: pp. 149-157.

[8] A. Hambraeus, S. Bengtsson, A.D. G. Laurell. Bacterial contamination in a modern operating suite.4. Bacterial contamination of clothes worn in the suite. *Journal of Hygiene* (1978) **80**: pp. 175-181.

[9] F. Renaud, J. Doré, H. A. Mayer & J. Freney. Les textiles antibactériens. *La Revue Trimestrielle du Réseau ECRIN* (2004) **56**: p. 3.

[10]http://guidance.echa.europa.eu/docs/guidance_document/articles_fr.pdf. ECHA European Chemicals agency. REACH - Guide des exigences relatives aux substances contenues dans les articles, consulté le 10 mai 2008.

[11] K. Hiyama, N. Moriyasu, T. Omori, O. Miyagawa, Y. Seino, Y. Goto. Antibacterial efficiency of Ag- and Zn-zeolites and the bactericidal action of Ag- and Zn-zeolite-kneaded polyethylene films. *Journal of Antibacterial and Antifungal Agents* (1995) **23 (4)**: pp. 197-203.

[12] R. D. Jones, H. B. Jampani, J. L. Newman, A. S. Lee. Triclosan: A review of effectiveness and safety in health care settings. *American Journal of Infection Control* (2000) **28 (2)**: pp. 184-196.

[13] B. D. Kalyon, U. Olgun. Antimicrobial efficacy of tricolsan-incorporeted polymers. *Journal of Infection Control* (2001) **29**: pp. 124-125.

[14] B. Goerzendorf-Grabowska, H. Krolikowska, M. Gadsinowski. Polymer Microspheres as carriers of antimicrobial properties of textiles: a preliminary study. *Fibers and Textiles in Eastern Europe* (2004) **12**: pp. 62-64.

[15] F. N. R. Renaud, J. Freney. Les textiles antimicrobiens. *Pour la Science* (1999) **266**: pp. 134-140.

[16] P. Gilbert, D. Pemberton, D. E. Wilkinson. Barrier properties of the Gram-negative cell envelope towards high molecular weight polyhexamethylene biguanides. *Journal of Applied Microbiology* (1990) **69 (4)**: pp. 585-592.

[17] G. McDonnell, A. Russel. antiseptics and disinfectants: activity, action, and resistance. *Clinical Microbiology Reviews* (1999) **12**: pp. 147-179.

[18] J. D. Payne. Antimicrobial treatment of textile materials. *United States Patent no 5700742* (1997).

[19] J. D. Payne, J. E. Yates. Fibers treated with antimicrobial agents. *European Patent Office Publication n° EP1697577 (A1)* (2006).

[20] M. L. Wallace. Testing the efficacy of polyhexamethylene biguanide as an antimicrobial treatment for cotton fabric. *AATCC Review* (2001) **1**: pp. 18-20.

[21] R. Purwar, M. Joshi. Recent developments in antimicrobial finishing-A review. *AATCC Review* (2004) **4**: pp. 22-26.

[22] M. A. Buktus, L. Edling, M. P. Labare. The efficacy of silver as a bactericidal agent: advantages, limitations and considerations for future use. *Journal of Water Supply: Research and Technology* (2003) **52 (6)**: pp. 407-416.

[23] K. H. Hong, J. L. Park, I. H. Sul, J. H. Youk, T. J. Kang. Preparation of antimicrobial poly(vinyl alcohol) nanofibers containing silver nanoparticles. *Journal of Polymer Science part B Polymer Physics* (2006) **44**: pp. 2468-2474.

[24] W. J. Schreurs, H. Rosenberg. Effect of silver ions on transport and retention of phosphate by *Escherichia coli*. *Journal of bacteriology* (1982) **152 (1)**: pp. 7-13.

[25] R. M. Richards, H. A. Odelola, B. Anderson. Effect of silver on whole cells and spheroplasts of a silver resistant *Pseudomonas aeruginosa*. *Microbios* (1984) **39**: pp. 157-158.

[26] A. D. Russell. Bacterial adaptation and resistance to antiseptics, disinfectants and preservatives is not a new phenomenon. *Journal of Hospital Infection* (2004) **57**: pp. 97-104.

[27] Y. A. Son, G. Sun. Durable antimicrobial nylon 66 fabrics: ionic interactions with quaternary ammonium salts. *Journal of Applied Polymer Science* (2003) **90**: pp. 2194-2199.

[28] Y. A. Son, B. S. Kim, K. Ravikumar, S. G. Lee. Imparting durable antimicrobial properties to cotton fabrics using quaternary ammonium salts through 4-aminobenzenesulfonic acid–chloro–triazine adduct. *European Polymer Journal* (2006) **42 (11)**: pp. 3059-3067.

[29] P. Gilbert, L. Moore. Cationic antiseptics: diversity of action under a common epithet. *Journal of Applied Microbiolgy* (2005) **99**: pp. 703-715.

[30] Y. H. Kim. Dye molecules as bridges for functional modifications of nylon: antimicrobial functions. *Textile Research Journal* (2000) **70 (8)**: pp. 728-733.

[31] L. Vermeiren, F. Devlieghere, J. Debevere. Effectiveness of some recent antimicrobial packaging concepts. *Food Additives and Contaminants* (2002) **19**: pp. 163-171.

[32] Q. L. Feng, J. Wu, G. Q. Chen, F. Z. Cui, T. N. Kim, J. O. Kim. A mechanistic study of the antibacterial effect of silver ions on *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus*. *Journal of Biomedical Materials Research Part A* (2000) **52**: pp. 662-668.

[33] M. Rai, A. Yadav, A. Gade. Silver nanoparticles as a new generation of antimicrobial. *Biotechnology Advances* (2009) **27**: pp. 76-83.

[34] R. Kumar, S. Howdle, H. Münstedt. Polyamide/silver antimicrobials: effect of filler types on the silver ion release. *Journal of Biomedical Materials Research part A* (2005) **75**: pp. 311-319.

[35] K. I. Batarseh. Anomaly and correlation of killing in the therapeutic properties of silver (I) chelation with glutamic and tartaric acids. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* (2004) **54**: pp. 546-548.

[36] S. Silver, L. T. Phung, G. Silver. Silver as biocides in burn and wound dressings and bacterial resistance to silver compounds. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology* (2006) **33**: pp. 627-634.

[37] G. L. McHugh, R. C. Moellering, C. C. Hopkins, M. N. Swartz. *Salmonella typhimurium* resistant to silver nitrate, chloramphenicol, and ampicillin. *Lancet* (1975) **1 (7901)**: pp. 235-240.

[38] M. Yamanaka, K. Hara, J. Kudo. Bactericidal actions of a silver ion solution on *Escherichia coli*, studied by energy-filtering transmission electron microscopy and proteomic analysis. *Applied and Environmental Microbiology* (2005) **71**: pp. 7589-7593.

[39] S. Pal, Y. K. Tak, J. M. Song. Does the antibacterial activity of silver nanoparticles depend on the shape of the nanoparticle? A study of the gram-negative bacterium *Escherichia coli*. *Applied and Environmental Microbiology* (2007) **73**: pp. 1712-1720.

[40] G. Nelson. Application of microencapsulation in textiles. *International Journal of Pharmaceutics* (2002) **242**: pp. 55-62.

[41] S. T. Dubas, K. Panittamat, P. Pranut. Layer-by-layer deposition of antimicrobial silver nanoparticles on textile fibers. *Colloids and Surfaces A* (2006) **289**: pp. 105-109.

[42] Y. Matsumura, K. Yoshikata, S. Kunisaki, T. Tsuchido. Mode of bactericidal action of silver zeolite and its comparison with that of silver nitrate. *Applied and Environmental Microbiology* (2003) **69**: pp. 4278-4281.

[43] K. C. Chaw, M. Manimaran, F. E. H. Tay. Role of silver ions in destabilization of intermolecular adhesion forces measured by atomic force microscopy in *Staphylococcus epidermidis* biofilms. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, (2005) **49**: pp. 4853-4859.

[44] C. Saulou. Evaluation des propriétés anti-adhésives et biocides de films nanocomposites avec inclusions d'argent déposés sur acier inoxydable par procédé plasma . *Thèse de doctorat de l'université de Toulouse* (2009).

[45] M. R. J. Salton. Lytic agents, cell permeability, and monolayer penetrability. *The Journal of General Physiology* (1968) **52 (1)**: p. 227–252.

[46] J.Y. Maillard. Bacterial target sites for biocide action. *Journal of Applied Microbiology* (2002) **92**: p. 16S-27S.

[47] K. Chanawanno, S. Chantrapromma, T. Anantapong, A. Kanjana-Opas, H. K. Fun. Synthesis, structure and in vitro antibacterial activities of new hybrid disinfectants quaternary ammonium compounds: pyridinium and quinolinium stilbene benzenesulfonates. *European Journal of Medicinal Chemistry* (2010) **45 (9)**: pp. 4199-4208.

[48] M. Marini, M. Bondi, R. Iseppi, M. Toselli, F. Pilati. Preparation and antibacterial activity of hybrid materials containing quaternary ammonium salts via sol–gel process. *European Polymer Journal* (2007) **43**: pp. 3621-3628 .

[49] B. Meyer. Does microbial resistance to biocides create a hazard to food hygiene?. *International Journal of Food Microbiology* (2006) **112 (3)**: pp. 275-279.

[50] B. Thomas, D. J. Stickler. Chlorhexidine resistance and the lipids of *Providencia stuartii*. *Microbios* (1979) **24**: pp. 141-150.

[51] T. J. Marrie JWC. Prolonged survival of *Serratia marcescens* in chlorhexidine. *Applied and Environmental Microbiology* (1981) **42 (6)**: pp. 1093-1102.

[52] M. J. Allen, A. P. Morby, G. F. White. Cooperativity in the binding of the cationic biocide polyhexamethylene biguanide to nucleic acids. *Biochemical and Biophysical Research Communications* (2004) **318**: pp. 397-404.

[53] M. J. Allen, G. F. White, A. P. Morby. The response of *Escherichia coli* to exposure to the biocide polyhexamethylene biguanide. *Microbiology* (2006) **152**: pp. 989-1000.

[54] P. Broxton, P.M. Woodcock, P. Gilbert. A study of the antibacterial activity of some polyhexamethylene biguanides towards *Escherichia coli* ATCC 8739. *Journal of Applied Microbiology* (1983) **54 (3)**: pp. 345-353.

[55] N. O. Hübner, A. Kramer. Review on the efficacy, safety and clinical applications of polihexanide, a modern wound antiseptic. *Skin Pharmacology and Physiology* (2010) **23**: pp. 17-27.

[56] T. Ramachandran, K. Rajendrakumar, R. Rajendran. Antimicrobial Textiles - an Overview. *IE Journal* (2004) **84**: pp. 42-47.

[57] http://tri-sis.ca/infections.html. *Consulté le 21 09 10*.

[58] N Carneiro, A. P. Souto, E. Silva, A. Marimba, B. Tena, H. Ferreira, V. Magalhães. Dyeability of corona-treated fabrics. *Coloration Technology* (2006) **117**: pp. 298-302.

[59] J. Rech. Contribution à la compréhension des modes d'actions tribiologiques et thermiques des revêtements en usinage - application au cas du taillage de dentures à la

fraise-mère à grande vitesse. *Ecole Nationale Supérieure d'Arts et Métiers* (2002) Thèse de doctorat **N° d'ordre : 2002 - 23**.

[60] P. Lucchese, M. Jeandin. La projection plasma. *La gazette du laboratoire* (2001) **54**.

[61] http://python.rice.edu/~arb/Courses/Images/360_02_handout9.jpg. *Consulté le 21 09 10*.

[62] A. Ewald, S. K Glückermann, R. Thull, U. Gbureck. Antimicrobial titanium/silver PVD coatings on titanium. *Biomedical Engineering Online* (2006) **5**: p. 22.

[63] C. Saulou, B. Despax, P. Raynaud, S. Zanna, P. Marcus, M. Mercier-Bonin. Plasma deposition of organosilicon polymer thin films with embedded nanosilver for prevention of microbial adhesion. *Applied Surface Science* (2009) **256 (3)**: p. S35-S39.

[64] T. P. Martin, S. E. Kooi, S. H. Chang, K. L. Sedransk, K. K. Gleason. Initiated chemical vapor deposition of antimicrobial polymer coatings. *Biomaterials* (2007) **28 (6)**: pp. 909-915.

[65] H. Szymanowski, A. Sobczyk, M. Gazicki-Lipman, W. Jakubowski, L. Klimek. Plasma enhanced CVD deposition of titanium oxide for biomedical applications. *Surface and Coatings Technology* (2005) **200 (1-4)**: pp. 1036-1040.

[66] C. Saulou, B. Despax, P. Raynaud, S. Zanna, P. Marcus, M. Mercier-Bonin. Plasma-mediated modification of austenitic stainless steel: application to the prevention of yeast adhesion. *Plasma Processes and Polymers* (2009) **6**: pp. 813-824.

[67] S. Zanna, C. Saulou, M. Mercier-Bonin, B. Despax, P. Raynaud, A. Seyeux, P. Marcus. Ageing of plasma-mediated coatings with embedded silver nanoparticles on stainless steel: an XPS and ToF-SIMS investigation. *Applied Surface Science* (2010) **256 (22)**: pp. 6499-6505.

[68] J. Mungkalasiria, L. Bedel, F. Emieux, J. Doré, F.N.R. Renaud, F. Maury. DLI-CVD of TiO_2–Cu antibacterial thin films: Growth and characterization. *Surface and Coatings Technology* (2009) **204 (6-7)**: pp. 887-892.

[69] C. Saulou, B. Despax, P. Raynaud, S. Zanna, P. Marcus, M. Mercier-Bonin. Plasma-engineered polymer thin films with embedded nanosilver for prevention of microbial adhesion. *Diffusion and Defect Data. Solid State Data. Part B, Solid State Phenomena* (2009) **151**: pp.95-100.

[70] R. Morent, N. De Geyte, J. Verschuren, K. De Clerck, P. Kiekens, C. Leys. Non-thermal plasma treatment of textiles. *Surface and Coating Technology* (2008) **202**: pp. 3427-3449.

[71] O.V. Abramov, A. Gedanken, Y. Koltypin, N. Perkas, I. Perelshtein, E. Joyce, T.J. Mason. Pilot scale sonochemical coating of nanoparticles onto textiles to produce biocidal fabrics . *Surface and Coatings Technology* (2009) **204 (5)**: pp. 718-722.

[72] A. Torres, C. Ruales, C. Pulgarin, A. Aimable, P. Bowen, V. Sarria, J. Kiwi. Innovative high-surface-area CuO pretreated cotton effective in bacterial inactivation under visible light. *Applied Materials and Interfaces* (2010) **2 (9)**: pp. 2547–2552.

[73] M. Kostic, N. Radic, B. M. Obradovic, S. Dimitrijevic, M. M. Kuraica, P. Skundric. Silver-loaded cotton/polyester fabric modified by dielectric barrier discharge treatment. *Plasma Processes and Polymer* (2009) **6 (1)**: pp. 58-67.

[74] H. Wang, J. Wang, J. Hong, Q. Wei, W. Gao, Z. Zhu. Preparation and characterization of silver nanocomposite textile. *Journal of Coatings Technology and Research* (2007) **4**: pp. 101-106.

[75] B. Dong, H. Jiang, S. Manolache, A. C. Lee Wong, F. S. Denes. Plasma-mediated grafting of poly(ethylene glycol) on polyamide and polyester surfaces and evaluation of antifouling ability of modified substrates. *Langmuir* (2008) **23 (13)**: pp. 7306-7313.

[76] C. J. Brinker, G. W. Scherer. The physics and chemistry of sol-gel processing. *Sol - Gel Science* (1990). Academic Press Inc, San Diego.

[77] H. Haufe, K. Muschter, J. Siegert, H. Böttcher. Bioactive textiles by sol–gel immobilised natural active agents. *Journal of Sol-Gel Science and Technology* (2008) **45**: pp. 97-101.

[78] H. Floch, P. Belleville. Procédé de fabrication de couches minces présentant des propriétés optiques. *Brevet français n° 92 08 524, déposé par le CEA* (1993).

[79] T. Textor, B. Mahltig. A sol–gel based surface treatment for preparation of water repellent antistatic textiles. *Applied Surface Science* (2010) **256 (6)**: pp. 1668-1674.

[80] W. A. Daoud, J. H. Xin. Low temperature sol-gel processed photocatalytic titania coating. *Journal of Sol-Gel Science and Technology* (2004) **29 (1)**: pp. 25-29.

[81] B. Mahltig, D. Fiedler, A. Fischer, P. Simon. Antimicrobial coatings on textiles–modification of sol–gel layers with organic and inorganic biocides. *Journal of Sol-Gel Science and Technology* (2010) **55 (3)**: pp. 269-277.

[82] S. Tarimala, N. Kothari, N. Abidi, E. Hequet, J. Fralick, L. Dai. New approach to antibacterial treatment of cotton fabric with silver nanoparticle–doped silica using sol–gel process. *Journal of Applied Polymer Science* (2006) **101 (5)**: pp. 2938-2943.

[83] A. Vilcnik, I. Jerman, A. Surca Vuk, M. Kozelj, B. Orel, B.Tomsic, B. Simoncic, J. Kovac. Structural properties and antibacterial effects of hydrophobic and oleophobic sol-gel coatings for cotton fabrics. *Langmuir* (2009) **25 (10)**: pp. 5869-5880.

[84] M. Yu, G. Gu, W. D. Meng, F. L. Qing. Superhydrophobic cotton fabric coating based on a complex layer of silica nanoparticles and perfluorooctylated quaternary ammonium silane coupling agent. *Applied Surface Science* (2007) **253**: pp. 3669-3673.

[85] B. Mahltig, H. Haufe, H. Bottcher. Functionalisation of textiles by inorganic sol–gel coatings. *Journal of Materials Chemistry* (2005) **15**: pp. 2385-4398.

[86] L. Bai, L. Zhu, S. Min, L. Liu, Y. Cai, J. Yao. Surface modification and properties of Bombyx mori silk fibroin films by antimicrobial peptide. *Applied Surface Science* (2008) **254 (10)**: pp. 2988-2995.

[87] N. Brack, R. Lamb, D. Pham, P. Turner. Nonionic surfactants and the wool fibre surface. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects* (1999) **146 (1-3)**: pp. 405-415.

[88] J. Shao, J. Liu, J. Zheng, C. M. Carr. X-ray photoelectron spectroscopic study of silk fibroin surface. *Polymer International* (2002) **51 (12)**: pp. 1479-1483.

[89] S. K. Chettra. Microscopy and surface chemical investigations of dyed cellulose textiles. 259 p. Thèse : pharmacie , Université de Nottingham. 2006, n°237.

[90] T. Pongprayoon, N. Yanumet, E. A. O'Rear, W. E. Alvarez, D.E. Resasco. Surface characterization of cotton coated by a thin film of polystyrene with and without a cross-linking agent. *Journal of Colloid and Interface Science* (2005) **281 (2)**: pp. 307-315.

[91] Y. Xing, X. Yang, J. Dai. Antimicrobial finishing of cotton textile based on water glass by sol-gel method. *Journal of Sol-Gel Science and Technology* (2007) **43**: pp. 187-192.

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

[93] Y. Liu, X. Wang, F. Yang, X. Yang. Excellent antimicrobial properties of mesoporous anatase TiO_2 and Ag/TiO_2 composite films. *Microporous and Mesoporous Materials* (2008) **114 (1-3)**: pp. 431-439.

[94] L. Bai, L. Zhu, S. Min, L. Liu, Y. Cai, J. Yao. Surface modification and properties of Bombyx mori silk fibroin films by antimicrobial peptide. *Applied Surface Science* (2008) **254 (10)**: pp. 2988-2995.

[95] D. Chen, L. Tan, H. Liu, J. Hu, Y. Li, F. Tang. Fabricating superhydrophilic wool fabrics. *Langmuir* (2010) **26 (7)**: pp. 4675-4679.

[96] S. Arunyadej, R. Mitchell, J. Walton, C. Carr. An investigation into the effect of laundering on the repellency behaviour of a fluorochemical-treated cotton fabric. *Journal of the Textile Institute. Part 1, Fibre Science and Textile Technology* (1998) **89 (4)**: pp. 696-702.

[97] Y. Gao, R. Cranston. Recent advances in antimicrobial treatments of textiles. *Textile Research Journal* (2008) **78**: pp. 60-72.

[98] N. Kitahara, T. Sato, H. Isogawa, Y. Ohgoe, S. Masuko, F. Shizuku, K.K. Hirakuri. Antibacterial property of DLC film coated on textile material. *Diamond and Related Materials* (2010) **19 (7-9)**: pp. 690-694.

[99] C. Ringot, V. Sol, R. Granet, P. Krausz. Porphyrin-grafted cellulose fabric: New photobactericidal material obtained by "Click-Chemistry" reaction. *Materials Letters* (2009) **63 (21)**: pp. 1889-1891.

[100] M. W. Reij, E. D. Den Aantrekker, ILSI Europe Risk Analysis in Microbiology Task Force. Recontamination as a source of pathogens in processed foods. *International Journal of Food Microbiology* (2004) **91**: pp. 1-11.

[101] G. A. O'Toole, R. Kolter. Flagellar and twitching motility are necessary for *Pseudomonas aeruginosa* biofilm development. *Molecular Microbiology* (1998) **30**: pp. 295-304.

[102] J. W. Costerton, P. S. Stewart, E. P. Greenberg. Bacterial biofilms: a common cause of persistent infections. *Science* (1999) **284**: pp. 1318-1322.

[103] Microbiochimie et alimentation. *Editions Educagri* (2007).

[104] S. Baillif, E. Casoli, K. Marion, C. Roques, G. Pellon, D. J. Hartmann, J. Freney, C. Burillon, L. Kodjikian. A novel *in vitro* model to study staphylococcal biofilm formation on intraocular lenses under hydrodynamic conditions. *Investigative Ophthalmology and Visual Science* (2006) **47**: pp. 3410-3416.

[105] R. Gamble, P. M. Muriana. Microplate fluorescence assay for measurement of the ability of strains of *Listeria monocytogenes* from meat and meat-processing plants to adhere to abiotic surfaces. *Applied and Environmental Microbiology* (2007) **73**: pp. 5235-5244.

[106] Y. Pan, F. Breidt Jr., S. Kathariou. Resistance of *Listeria monocytogenes* biofilms to sanitizing agents in a simulated food processing environment. *Applied and Environmental Microbiology* (2006) **72**: pp. 7711-7717.

[107] A. C. Lee Wong. Biofilms in food processing environments. *Journal of Dairy Science* (1998) **81**: pp. 2765-2770.

[108] B. Carpentier, O. Cerf. Biofilms and their consequences with particular reference to hygiene in the food industry. *Journal of Applied Bacteriology* (1993) **75**: pp. 499-511.

[109] D. R. Korber, J. R. Lawrence, H. M. Lappin-Scott, J. W. Costerton. Growth of microorganismes on surfaces. *Lappin-Scott HM, Costerton JW,* editors. *Microbial Biofilms*. Cambridge: Cambridge University Press; 1995. pp. 15-45.

[110] S. B. I. Luppens, M. W. Reij, R. W. L. Van der Heijden, F. M. Rombouts, T. Abee. Development of a standard test to assess the resistance of *Staphylococcus aureus* biofilm cells to disinfectants . *Applied and Environmental Microbiology* (2002) **68**: pp. 4194-4200.

[111] A. C. Lee Wong. Biofilms in food processing environments. *Journal of Dairy Science* (1998) **81**: pp. 2765-2770.

[112] G. R. Newman, M. Walker, J. A. Hobot, P. G. Bowler. Visualisation of bacterial sequestration and bactericidal activity within hydrating Hydrofiber® wound dressings. *Biomaterials* (2006) **27**: pp. 1129-1139.

[113] S. L. Percival, P. Bowler, E. J. Woods. Assessing the effect of an antimicrobial wound dressing on biofilms. *Wound Repair and Regeneration* (2008) **16**: pp. 52-57.

[114] P. S. Stewart, J. Rayner, F. Roe, W. M. Rees. Biofilm penetration and disinfection efficacy of alkaline hypochlorite and chlorosulfamates. *Journal of Applied Microbiology* (2001) **91 (3)**: pp. 525-532.

[115] M. N. Bellon-Fontaine, J. Rault, C. J. Van Oss. Microbial adhesion to solvents: a novel method to determine the electron-donor/electron-acceptor or lewis acid-base properties of microbial cells. *Colloids and Surfaces. B, Biointerfaces* (1996) **7**: pp. 47-53.

[116] R. Briandet, T. Meylheuc, C. Maher, M. N. Bellon-Fontaine. *Listeria monocytogenes* scott A: cell surface charge, hydrophobicity, and electron donor and acceptor characteristics under different environmental growth conditions. *Applied and Environmental Microbiology* (1999) **65**: pp. 5328-5333.

[117] S. Planchon, B. Gaillard-Martinie, E. Dordet-Frisoni, M.N. Bellon-Fontaine, S. Leroy, J. Labadie, M. Hébraud, R. Talon. Formation of biofilm by *Staphylococcus xylosus*. *International Journal of Food Microbiology* (2006) **109 (1-2)**: pp. 88-96.

[118] J. F. Heidelberg, M. Shahamat, M. Levin, I. Rahman, G. Stelma, C. Grim, R. R. Colwell. Effect of aerosolization on culturability and viability of Gram-negative bacteria. *Applied and Environmental Microbiology* (1997) **63**: pp. 3585-3588.

[119] J. D. Oliver. The viable but nonculturable state in bacteria. *The Journal of Microbiology* (2005) **43**: pp. 93-100.

[120] H. Yamamoto. Viable but non culturable state as a general phenomenon of non-spore-forming bacteria, and its modeling. *Journal of Infectiology Chemotherapy* (2000) **6**: pp. 112-114.

[121] D. McDouglas, S. A. Rice, D. Weichart, S. Kjelleberg. Nonculturability: adaptation or debilitation? *FEMS Microbiology Ecology* (1998) **25**: pp. 1-9.

[122] S. Peneau, D. Chassaing, B. Carpentier. First evidence of division and accumulation of viable but non culturable *Pseudomonas fluorescens* cells on surface subjected to conditions encountered at meat processing premises. *Applied and Environmental Microbiology* (2007) **73**: pp. 2839-2846.

[123] M. M. Khan, B. H. Pyle, A. K. Camper. Specific and rapid enumeration of viable but nonculturable and viable-culturable gram-negative bacteria by using flow cytometry. *Applied and Environmental Microbiology* (2010) **76 (15)**: pp. 5088-5096.

[124] C. Lopeza, M.N. Pons, E. Morgenroth. Evaluation of microscopic techniques (epifluorescence microscopy, CLSM, TPE-LSM) as a basis for the quantitative image analysis of activated sludge. *Water research* (2005) **39 (2-3)**: pp. 456-468.

[125] P. Delgado-Viscogliosi, T. Simonart, V. Parent, G. Marchand, M. Dobbelaere, E. Pierlot, V. Pierzo, F. Menard-Szczebara, E. Gaudard-Ferveur, K. Delabre, J. Marie Delattre. Rapid method for enumeration of viable *Legionella pneumophila* and other *Legionella spp*. in water. *Applied and Environmental Microbiology* (2005) **71**: pp. 4086-4096.

[126] M. Felip, S. Andreatta, R. Sommaruga, V. Straskrábová, J. Catalan. Suitability of flow cytometry for estimating bacterial biovolume in natural plankton samples: comparison with microscopy data. *Applied and Environmental Microbiology* (2007) **73**: pp. 4508-4514.

[127] F. Joux, P. Lebaron. Use of fluorescent probes to assess physiological functions of bacteria at single-cell level. *Microbes and Infection* (2000) **2**: pp. 1523-1535.

[128] B. Breeuwer, T. Abee. Assessment of viability of microorganisms employing fluorescence techniques. *International Journal of Food Microbiology* (2000) **55**: pp. 193-200.

[129] S. Ullrich, B. Karrasch, H. Hoppe, K. Jeskulke, M. Mehrens. Toxic effects on bacterial metabolism of the redox dye 5-cyano-2,3-ditolyl tetrazolium chloride. *Applied Environmental Microbiology* (1996) **62**: pp. 4587-4593.

[130] B. F. Sherrll, P. Del Giorgio, E. B. Sherr. Estimating abundance and single-cell characteristics of respiring bacteria via the redox dye CTC. *Aquatic Microbial Ecology* (1999) **18**: pp. 117-131.

[131] S. Leuko, A. Legat, S. Fendrihan, H. Stan-Lotter. Evaluation of the Live/Dead BacLight kit for detection of extremophilic archaea and visualization of microorganisms in environmental hypersaline samples. *Applied and Environmental Microbiology* (2004) **70**: pp. 6884-6886.

[132] L. Boulos, M. Prévost, B. Barbeau, J. Coallier, R. Desjardins. Live/Dead® BacLight™: application of a new rapid staining method for direct enumeration of viable and total bacteria in drinking water. *Journal of Microbiological Methods* (1999) **37**: pp. 77-86.

[133] S. J.Singer, G. Nicolson. The fluid mosaic model of the structure of cell membranes. *Science* (1972) **175**: pp. 720-731.

[134] M. Berney, F. Hammes, F. Brosshard, H. U. Weilenmann, T. Egli. Assessment and interpretation of bacterial viability by using the Live/Dead BacLight Kit in combination with flow cytometry. *Applied and Environmental Microbiology* (2007) **73**: pp. 3283-3290.

[135] D. Ercolini, A. La Storia, F. Villani, G. Mauriello. Effect of a bacteriocin-activated polythene film on *Listeria monocytogenes* as evaluated by viable staining and epifluorescence microscopy. *Journal of Applied Microbiology* (2006) **100**: pp. 765-772.

[136] J. Kim, B. Pitts, P. S. Stewart, A. Camper, J. Yoon. Comparison of the antimicrobial effects of chlorine, silver ion, and tobramycin on biofilm. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* (2008) **52**: pp. 1446-1453.

[137] A. Pascaud, S. Amellal, M. L. Soulas, G. Soulas. A fluorescence based assay for measuring the viable cell concentration of mixed microbial communities in soil. *Journal of Microbiological Methods* (2009) **76**: pp. 81-87.

[138] M. Berney, F. Hammes, F. Bosshard, H.U. Weilenmann, T. Egli. Assessment and interpretation of bacterial viability by using the Live/Dead BacLight Kit in Combination with flow cytometry. *Applied and Environmental Microbiology* (2007) **73**: pp. 3283-3290.

[139] Prescott, Harley, Klein. Microbiologie. Editions De boeck. Mc Graw-Hill, 2003.

[140] S. J. Singer, G. Nicolson. The fluid mosaic model of the structure of cell membranes. *Science* (1972) **18**: pp. 720-731.

[141] T. J. Denich, L. A. Beaudette, H. Lee, J. T. Trevors. Effect of selected environmental and physico-chemical factors on bacterial cytoplasmic membranes. *Journal of Microbiological Methods* (2003) **52**: pp. 149-182.

[142] M. M. Sperotto, J. H. Ipsen, O. G.vMouritsen. Theory of protein-induced lateral phase separation in lipid membranes. *Cell Biochemistry and Biophysics* (1989) **14**: pp. 79-95.

[143] J. T. Trevors. Fluorescent probes for bacterial cytoplasmic membrane research. *Journal of Biochemical and Biophysical Methods* (2003) **57**: pp. 87-103.

[144] M. Shinitzky, Y. Barenholz. Fluidity parameters of lipid regions determined by fluorescence polarization. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Reviews on Biomembranes* (1978) **515**: pp. 367-394.

[145] I. Konopasek, J. Vecer, K. Strzalta, E. Amler. Short live fluorescence component of DPH reports on lipid water interface of biological membranes. *Chemistry and Physics of Lipids* (2004) **130**: pp. 135-144.

[146] N. C. S. Mykytczuk, J. T. Trevors, L. G. Leduc, G. D. Ferroni. Fluorescence polarization in studies of bacterial cytoplasmic membrane fluidity under environmental stress. *Progress in Biophysics and Molecular Biology* (2007) **95**: pp. 60-82.

[147] J. Beranova, M. Jemiola-Rzeminska, D. Elhottova, K. Strzalka, I. Konopasek. Metabolic control of the membrane fluidity in *Bacillus subtilis* during cold adaptation. *Biochimica et Biophysica Acta* (2008) **1778**: pp. 445-453.

[148] T. Ikeda, A. Ledwith, C. H. Bamford, R. A. Hann. Interaction of a polymeric biguanide biocide with phospholipid membranes. *Biochimica et Biophysica Acta* (1984) **769**: pp. 57-66.

[149] J. Jasniewski, C. Cailliez-Grimal, M. Younsi, J. B. Millière, A. M. Revol-Junelles. Fluorescence anisotropy analysis of the mechanism of action of mesenterocin 52A: speculations on antimicrobial mechanism. *Applied and Environmental Biotechnology* (2008) **81**: pp. 339-347.

[150] N. P. Ulrih, A. Ota, M. Šentjurc, S. Kure, V. Abram. Flavonoids and cell membrane fluidity . *Food Chemistry* (2010) **121 (1)**: pp. 78-84.

[151] A. Alonso-Hernando, C. Alonso-Callej, R. Capita. Effects of exposure to poultry chemical decontaminants on the membrane fluidity of *Listeria monocytogenes* and *Salmonella enterica* strains. *International Journal of Food Microbiology* (2010) **137 (2-3)**: pp. 130-136.

[152] E. Goormaghtigh, V. Raussens, J. M. Ruysschaert. Attenuated total reflection infrared spectroscopy of proteins and lipids in biological membranes. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Reviews on Biomembranes* (1999) **1422 (2)**: pp. 105-185.

[153] K. M. Gough, D. Zelinski, R. Wiens, M. Rak, I. M. C. Dixon. Fourier transform infrared evaluation of microscopic scarring in the cardiomyopathic heart: Effect of chronic AT1suppression . *Analytical Biochemistry* (2003) **316**: pp. 232-242.

[154] D. Naumann, D. Helm, H. Labischinski. Microbiological characterizations by FT-IR spectroscopy. *Nature* (1991) **351**: pp. 81-82.

[155] C. Amiel, L. Mariey, M. C. Curk-Daubie, P. Pichon, J. Travert. Potentiality of Fourier transform infrared spectroscopy (FTIR) for discrimination and identification of dairy lactic acid bacteria. *Le lait* (2000) **80 (4)**: pp. 445-459.

[156] N. Boudaud, M. Coton, E. Coton, S. Pineau, J. Travert, C. Amiel. Biodiversity analysis by polyphasic study of marine bacteria associated with biocorrosion phenomena. *Journal of Applied Microbiology* (2010) **109** : pp. 166-179.

[157] W. Zeroual, M. Manfait, C. Choisy. FT-IR spectroscopy study of perturbations induced by antibiotic on bacteria (*Escherichia coli*). *Pathology- Biology* (1995) **43 (4)**: pp. 300-305.

[158] M. Giudici, R. Pascual, L. de la Canal, K. Pfuller,U. Pfuller, J. Villalain. Interaction of viscotoxins A3 and B with membrane model systems: implications to their mechanism of action. *Biophysical Journal* (2003) **85**: pp. 971-981.

[159] M. Huleihel, V. Pavlov, V. Erukhimovitch. The use of FTIR microscopy for the evaluation of anti-bacterial agents activity. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology* (2009) **96**: pp. 17-23.

Chapitre 2 : Matériels et Méthodes

Chapitre 2 : Matériels et Méthodes

1. Fonctionnalisation des textiles et caractérisation des surfaces 102
1.1. Nature des textiles, mode de préparation et lavages 102
1.1.1. Nature des textiles utilisés 102
1.1.2. Textiles fonctionnalisés par de l'argent déposé par traitement plasma (par la société HEF)..... 103
1.1.3. Textiles fonctionnalisés avec du PHMB par l'IFTH 107
1.1.4. Textiles fonctionnalisés avec de l'argent et du TiO_2 par sol-gel par le LMGP..... 109
1.1.5. Lavages réalisés 111
1.2. Caractérisation de la composition chimique de surface des textiles après traitement 112
1.2.1. Caractérisation par XPS (réalisée au LSA, Université Lyon 1)..... 112
1.2.2. Caractérisation par spectrométrie de masse des ions secondaires à temps de vol (ToF-SIMS) (réalisée au LSA, Université Lyon 1) 115

2. Caractéristiques des souches bactériennes testées 116
2.1. Description et conservation des souches 116
2.2. Caractérisation de la surface des cellules bactériennes par la méthode MATS (Microbial Adhesion to Solvents)..... 118
2.2.1. Culture des souches pour la méthode MATS 118
2.2.2. Protocole de la méthode MATS..... 118

3. Etude de l'effet des agents antimicrobiens sur les souches bactériennes en solution ou après dépôt sur textile 120
3.1. Culture des souches bactériennes 120
3.2. Les antimicrobiens employés 121
3.3. Détermination des concentrations minimales inhibitrices (CMI) du PHMB..... 122
3.4. Textiles non traités en conditions différentes d'humidités relative de l'air 124
3.4.1. Préparation des textiles 125
3.4.2. Ensemencement des éprouvettes 125
3.5. Détermination de l'activité antimicrobienne adapté de la norme ISO 20743/2005..... 127
3.6. Observation des textiles par microscopie électronique à balayage (MEB) 128

4. Etude de la viabilité des bactéries par microscopie à épifluorescence 130
4.1. Après contact avec les antimicrobiens en milieu liquide..... 130
4.2. Après contact avec les textiles antimicrobiens 131

5. Etude de la membrane bactérienne après contact avec des molécules antimicrobiennes par spectrofluorimétrie en présence de sondes fluorescentes pour évaluer la fluidité membranaire et par spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier 134
5.1. Etude de la fluidité des membranes bactériennes après contact avec le PHMB par spectrofluorimétrie en présence de sondes fluorescentes 134
5.2. Etude des modifications de la membrane bactérienne après contact avec le PHMB par spectroscopie infrarouge à transformé de Fourier..... 136

6. Références bibliographiques 137

Chapitre 2 : Matériels et Méthodes

Ce chapitre est consacré aux méthodes employées dans le cadre de ce travail de thèse. Dans une première partie, les méthodes de fonctionnalisation des textiles seront présentées avec une description de chaque méthode employée par les offreurs de technologie que sont la société HEF pour le traitement plasma à l'argent, l'IFTH pour la fonctionnalisation des textiles avec du PHMB et le LMGP pour le dépôt d'argent par voie sol-gel dans le cadre de la thèse de Mouna Messaoud. Dans cette même partie les techniques de caractérisation de la composition chimique de surface des textiles après leur fonctionnalisation seront décrites. Les caractérisations de surface ont été réalisées au LSA dans le cadre du travail collaboratif et dans le cadre de la thèse de Céline Brunon (doctorante du LSA).

Dans une seconde partie, les différentes souches sélectionnées dans le cadre du projet Actiprotex seront présentées ainsi que les méthodes de caractérisation de leurs propriétés de surface. Dans cette même partie, les méthodes d'étude des effets des agents antimicrobiens sur les souches bactériennes sélectionnées en milieu liquide et après contact avec un textile fonctionnalisé seront également présentées. Les méthodes utilisées sont notamment la détermination de la Concentration Minimale Inhibitrice (CMI), l'évaluation de l'activité antimicrobienne selon la norme ISO 20743/2005, la microscopie à épifluorescence pour évaluer l'état physiologique des cellules, la spectrofluorimétrie pour évaluer la fluidité des membranes à l'aide de marqueurs fluorescents (DPH et TMA-DPH) et la spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier pour comprendre les changements de conformation de la membrane après contact des cellules bactériennes avec le PHMB.

1. Fonctionnalisation des textiles et caractérisation des surfaces

La fonctionnalisation des textiles a eu lieu au sein de différentes sociétés, centres techniques et laboratoires de recherche partenaires du projet Actiprotex. Trois grands types de traitements ont été utilisés dans le projet Actiprotex : le traitement plasma, le traitement par voie sol-gel et l'imprégnation par bain suivie d'un foulardage. Les molécules utilisées pour le traitement des textiles sont l'argent et le PHMB. L'argent a été appliqué sous différentes formes : métallique, d'ions ou en association avec des céramiques (cas du sol-gel et du plasma). Après ces différents traitements (tableau 2-1), dans certains cas, des lavages ont été réalisés dans le but de vérifier la tenue aux lavages des principes actifs développés.

Tableau 2-1 : Récapitulatif des méthodes de dépôt et des agents antimicrobiens employés

Méthode employée pour la fonctionnalisation	**Molécule utilisée**	**société ou laboratoire**
Plasma PVD et PVD/PECVD	argent	HEF, Andrézieux-Bouthéon (42)
Sol-gel	argent	LMGP, INP Grenoble (38)
Foulardage (Brevet EP n° 0955069)	PHMB	IFTH, Ecully (69)

1.1. Nature des textiles, mode de préparation et lavages

1.1.1. Nature des textiles utilisés

La société TDV (Laval, France) a fourni 2 types de textiles qui représentent la gamme de textiles retrouvés le plus fréquemment dans la fabrication de vêtements professionnels notamment dans le domaine de l'agro-alimentaire. On retrouve des textiles 65% coton / 35% polyester (C/P) avec un grammage de 250g / m^2 blancs et des textiles 65% polyester / 35% coton (P/C) avec un grammage de 230g / m^2 blancs (figure 2-1).

Figure 2-1 : Textiles témoins non traités C/P et P/C blancs fournis par la société TDV, Laval

1.1.2. Textiles fonctionnalisés par de l'argent déposé par traitement plasma (par la société HEF)

1.1.2.1. Références des textiles fonctionnalisés par plasma

Les traitements plasma ont été réalisés par la société HEF. Il s'agit d'une société située à Andrézieux-Bouthéon (42) spécialiste du traitement plasma. Ces textiles ont été rendus antimicrobiens par dépôt d'argent. Le récapitulatif des différents essais ainsi que leurs différences apparaissent dans le tableau 2-2.

Les textiles 65 % coton - 35 % polyester (C/P) sont codés par la lettre C- et les textiles 65 % polyester -35 % coton sont codés par la lettre P-. Différentes méthodologies ont pu être testées et seront détaillées par la suite. On distinguera les dépôts suivants :

- Dépôt plasma PVD simple couche d'argent allant de 10 à 400 Å sur textiles C- et P- c'est-à-dire dépôt d'une couche d'argent seul,
- Dépôt plasma PVD/PECVD avec dépôt simultané argent / SiOCH / argent sur P- c'est-à-dire un dépôt au même moment de SiOCH et d'argent,
- Dépôt plasma PVD/PECVD avec dépôt simultané SiOCH / argent en faisant varier les puissances de dépôt (quantités d'argent déposées variables) et le débit d'argon sur textiles P-,
- Dépôt plasma PVD/PECVD SiOCH / argent avec une couche d'encapsulation Al_2O_3 ou SiOCH sur textiles P- c'est-à-dire dépôt d'une couche antimicrobienne associant l'argent et le SiOCH et une couche par-dessus de SiOCH ou Al_2O_3.

La société HEF a réalisé différents dépôts pour, dans un premier temps maîtriser la quantité d'argent déposé à la surface du textile.

Le fait de rajouter un dépôt simultané d'argent et de SiOCH à l'aide de 2 sources PVD/PECVD a permis de réduire la quantité d'argent déposée par rapport à un dépôt simple couche d'argent utilisant une seul source par PVD.

Dans un second temps, la société HEF a fait varier les puissances de dépôt et les débits d'argon dans le but de réduire la quantité d'argent déposée.

Et enfin, une « encapsulation » SiOCH ou Al_2O_3 a été réalisée c'est-à-dire le dépôt d'une couche « protectrice » de la couche antimicrobienne contenant l'argent et le SiOCH dans le but de protéger le dépôt d'argent pour une meilleure tenue au lavage ou une diffusion progressive de l'argent à travers la couche d'encapsulation.

Tableau 2-2 : Textiles fonctionnalisés par la société HEF (C/P et P/C blancs) avec de l'argent comme antimicrobien déposé par technologie plasma (PVD ou PVD/PECVD). * estimation de la couche d'argent.

Référence du textile	**Elément déposé**	**Type ou conditions de dépôt**	**caractéristiques du dépôt***
C-Acti-15	Argent seul	simple couche d'argent PVD	Couche d'argent **10 Å**
C-Acti-13	Argent seul	simple couche d'argent PVD	Couche d'argent **20 Å**
C-Acti-09/10	Argent seul	simple couche d'argent PVD	Couche d'argent **100 Å**
C-Acti-07/08	Argent seul	simple couche d'argent PVD	Couche d'argent **200 Å**
C-Acti-05/06	Argent seul	simple couche d'argent PVD	Couche d'argent **400 Å**
P-Acti-14	Argent seul	simple couche d'argent PVD	Couche d'argent **10 Å**
P-Acti-11/12	Argent seul	simple couche d'argent PVD	Couche d'argent **50 Å**
P-Acti-09/10	Argent seul	simple couche d'argent PVD	Couche d'argent **100 Å**
P-Acti-07/08	Argent seul	simple couche d'argent PVD	Couche d'argent **200 Å**
P-Acti-05/06	Argent seul	simple couche d'argent PVD	Couche d'argent **400 Å**
P-Acti 17	Ag/SiOCH/Ag	PVD PECVD	Couches simultanées
P-Acti 18	Ag/SiOCH/Ag	PVD PECVD	Couches simultanées
P-Acti 19	Ag/SiOCH/Ag	PVD PECVD	Couches simultanées
P-Acti 20	Ag/SiOCH/Ag	PVD PECVD	Couches simultanées
P-Acti 040900	SiOCH	**Témoin sans argent**	Couches simultanées
P-Acti 040901	Ag-SiOCH	**puissance 500 W** - débit d'argon 140 cm^3/min PVD PECVD	Couches simultanées
P-Acti 040902	Ag-SiOCH	**puissance 400 W** - débit d'argon 140 cm^3/min PVD PECVD	Couches simultanées
P-Acti 040903	Ag-SiOCH	**puissance 100 W** - débit d'argon 140 cm^3/min PVD PECVD	Couches simultanées
P-Acti 040904	Ag-SiOCH	**puissance 200 W** - débit d'argon 140 cm^3/min PVD PECVD	Couches simultanées
P-Acti 040905	Ag-SiOCH	**puissance 300 W** - débit d'argon 140 cm^3/min PVD PECVD	Couches simultanées
P-Acti 040906	Ag-SiOCH	puissance 300 W - **débit d'argon 560 cm^3/min** PVD PECVD	Couches simultanées
P-Acti 040907	Ag-SiOCH	puissance 300 W - **débit d'argon 1220 cm^3/min** PVD PECVD	Couches simultanées
P-Acti 040908	Ag-SiOCH encapsulé SiOCH	**puissance 300 W** - débit d'argon 140 cm^3/min PVD PECVD	Encapsulation SiOCH 50 nm
P-Acti 040909	Ag-SiOCH encapsulé SiOCH	**puissance 300 W** - débit d'argon 140 cm^3/min PVD PECVD	Encapsulation SiOCH 200 nm
P-Acti 040910	Ag-SiOCH encapsulé SiOCH	**puissance 300 W** - débit d'argon 140 cm^3/min PVD PECVD	Encapsulation SiOCH 1000 nm
P-Acti 021014	Ag-SiOCH encapsulé SiOCH	**puissance 100 W** - débit d'argon 140 cm^3/min PVD PECVD	Encapsulation de SiOCH 50 nm
P-Acti 021015	Ag-SiOCH encapsulé SiOCH	**puissance 100 W** - débit d'argon 140 cm^3/min PVD PECVD	Encapsulation SiOCH 200 nm
P-Acti 021016	Ag-SiOCH encapsulé SiOCH	**puissance 100 W** - débit d'argon 140 cm^3/min PVD PECVD	Encapsulation SiOCH 1000 nm
P-Acti 040912	Ag-SiOCH encapsulé / Al_2O_3	**puissance 100 W** - débit d'argon 140 cm^3/min PVD PECVD	Encapsulation Al_2O_3 60 nm
P-Acti 040911	Ag-SiOCH encapsulé / Al_2O_3	**puissance 100 W** - débit d'argon 140 cm^3/min PVD PECVD	Encapsulation Al_2O_3 150 nm
P-Acti 040913	Ag-SiOCH encapsulé / Al_2O_3	**puissance 100 W** - débit d'argon 140 cm^3/min PVD PECVD	Encapsulation Al_2O_3 320 nm
P-Acti 021017	Ag-SiOCH encapsulé Al_2O_3	**puissance 300 W** - débit d'argon 140 cm^3/min PVD PECVD	Encapsulation Al_2O_3 60 nm
P-Acti 021018	Ag-SiOCH encapsulé Al_2O_3	**puissance 300 W** - débit d'argon 140 cm^3/min PVD PECVD	Encapsulation Al_2O_3 150 nm
P-Acti 021019	Ag-SiOCH encapsulé Al_2O_3	**puissance 300 W** - débit d'argon 140 cm^3/min PVD PECVD	Encapsulation Al_2O_3 320 nm

1.1.2.2. Méthode de fonctionnalisation des textiles par procédé Plasma par HEF

- Matériel utilisé

Le procédé HEF® est basé sur des dépôts PVD (Physical Vapor Deposition) ou mixtes PVD / PECVD (Plasma-Enhanced Chemical Vapor Deposition) pour obtenir des dépôts Argent ou SiOCH/Argent. La différence entre ces 2 types de dépôt repose sur l'utilisation d'une source de dépôt dans le cas de la méthode PVD et de 2 sources de dépôt dans le cas de la méthode PVD/PECVD. Le but de la seconde méthode étant de pouvoir déposer 2 matériaux de façon simultanée pour réduire par exemple la quantité déposée d'argent.

Les échantillons de textiles sont traités avec la technologie pulvérisation magnétron dans le cas des 2 techniques employées (PVD et PVD/PECVD). L'enceinte à vide utilisée pour les dépôts est composée d'acier inoxydable et a un volume de 350 L. La pression minimale nécessaire pour réaliser des dépôts est de 1.10^{-6} mbar. La cible d'argent de dimension 15 cm x 40 cm est installée sur une cathode en face du champ magnétique dans l'objectif d'améliorer le taux de pulvérisation. La chambre à vide qui est à température ambiante est soumise à un flux d'argon (pression de $2x10^{-3}$ mbar), d'oxygène et d'un précurseur organosiliconé : le HMDSO (hexaméthyldisiloxane ($O-(Si-(CH_3)_3)_2$).

Les couches minces organiques, obtenues par dépôt chimique en phase vapeur assisté par plasma (PECVD) à partir de précurseurs organiques sont souvent utilisées et le HMDSO est certainement le plus utilisé du fait de sa stabilité, de son faible coût et de sa facilité d'emploi (pression de vapeur élevée à pression et température ambiante).

Les textiles sont placés sur un rouleau en aluminium (d'un diamètre de 50 cm) ayant une vitesse de rotation de 4 révolutions par minute et situé à une distance de 100 mm de la cible. Une décharge électrique est générée par l'application du courant sur la cathode. Les ions accélérés dans le plasma ont suffisamment d'énergie pour pulvériser les atomes d'argent de la cible. Un fin film d'argent est ainsi déposé sur la surface des fibres textiles. Pendant la pulvérisation, les ions du plasma fortement énergétiques frappent la cible (dans ce cas l'argent), composée du matériau que l'on souhaite déposer. Des atomes de la cible sont alors éjectés avec une énergie suffisante pour venir se déposer en surface du substrat (ici les textiles C/P et P/C). L'enceinte à vide utilisée est un équipement industriel d'un diamètre interne de 700 mm et d'une capacité de 350 L et la figure 2-2 présente les différents éléments du système de dépôt : le porte substrat est constitué d'un cylindre métallique évidé positionné sur un support rotatif. Les échantillons fixés verticalement défilent devant les sources plasma qui peuvent être soit des cathodes magnétrons, soit une électrode PECVD. Cette configuration est

très intéressante puisqu'elle est similaire à un dispositif de production où le substrat (le tissu dans notre cas) disposé sur des rouleaux défilerait devant le système de traitement et ce pour un échantillon de grande taille. Les hauteurs de traitement de 500 mm sont couvertes par les cathodes magnétrons standards et l'électrode PECVD.

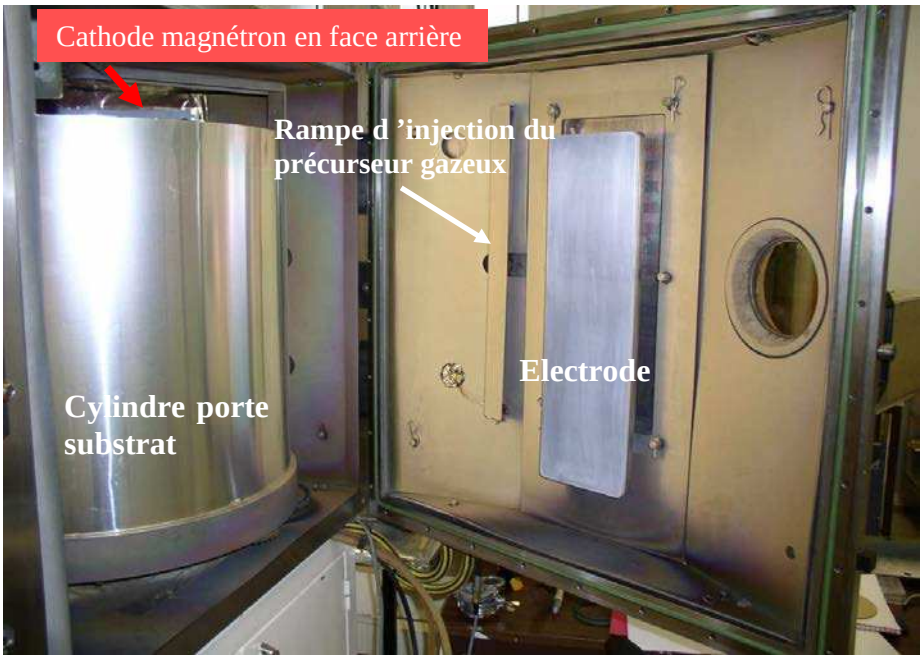


Figure 2-2 : Photographie du système de dépôt par méthode plasma employé pour la fonctionnalisation des textiles (HEF, Andrézieux-Bouthéon, France)

Un support de cathode spécifique a été réalisé pour le projet afin de pouvoir installer 2 cathodes sur un même emplacement de l'enceinte à vide et réaliser des dépôts simultanés de 2 matériaux comme le montre la figure 2-3.

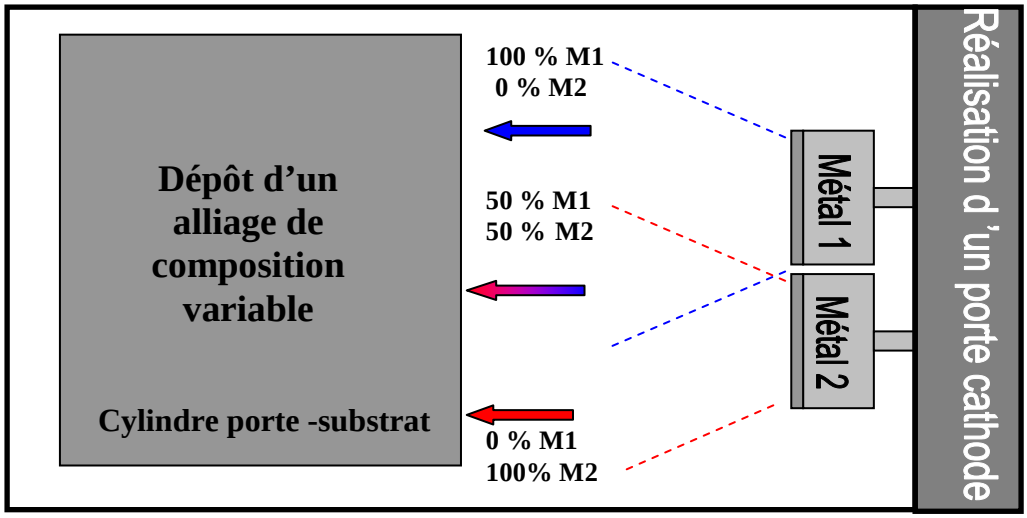


Figure 2-3 : Schéma du dispositif de co-pulvérisation plasma

Ce dispositif de co-pulvérisation a été utilisé pour réaliser des combinaisons de métaux ou réaliser des co-pulvérisations d'un métal et d'une céramique donnant forme à un nanomatériau. Dans notre cas, ce dispositif a été utilisé pour déposer de l'argent (le métal) et du SiOCH (la céramique) de façon simultanée. L'intérêt d'un tel dispositif est d'obtenir rapidement un gradient de composition allant de 100 % du métal 1 à 100 % du métal 2 ou 10 % du métal 1 à 100% de la céramique. Un dispositif particulier a été réalisé par la société HEF dans le but de réaliser des films ultra minces et nanostructurés.

- **Conditions de dépôt**

Dans un premier temps des dépôts d'un seul métal (argent) ont été réalisés et les échantillons sont présentés dans le tableau 2-2 (échantillons référencés C ou P-Acti 05-06, 07-08, 09-10, 11-12 et 14). Différentes couches d'épaisseurs variables de 10 à 400 Å (d'après le tableau 2-2) sont déposées sur les 2 types de textiles : C/P et P/C.

Par la suite, différents types de fonctionnalisation avec dépôt simultané de plusieurs composés (Argent-SiOCH ou Argent-Al_2O_3) ont été réalisés sur les textiles comme le montre la figure 2-4. Le dépôt a été réalisé sur un seul côté du textile et donc sur un seul côté de la fibre.

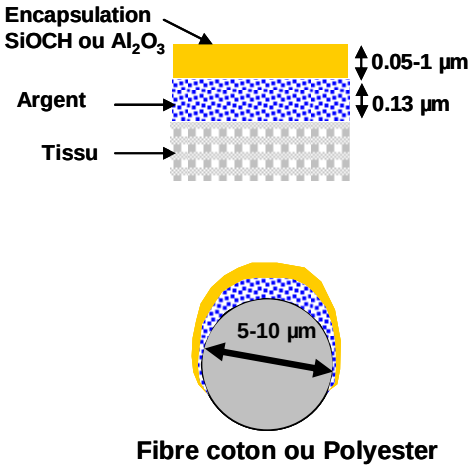


Figure 2-4 : Conditions de dépôt par méthodologie plasma

1.1.3. Textiles fonctionnalisés avec du PHMB par l'IFTH

1.1.3.1. Fonctionnalisation des textiles avec du PHMB

Il s'agit d'un centre technique situé sur le site d'Ecully (69, France) de l'IFTH et spécialiste du textile. Dans le cadre de ce travail, seul le polyhexaméthylène biguanide (PHMB, fourni par l'IFTH à 20 % m/v) sera présenté.

La fonctionnalisation de ces textiles a été réalisée en employant la méthodologie décrite dans le brevet mis au point par l'IFTH n° EP 0955069 (« Procédé pour conférer à un matériau des propriétés biocides et/ou biostatiques stables ») [1], qui associe un polymère ionique antibactérien (le PolyHexaMéthylène Biguanide : PHMB, figure 2-5 a) et un agent précipitant (le LaurylSulfate : LS, figure 2-5 b) pour obtenir un dépôt insoluble. Cette fonctionnalisation a été faite à l'IFTH.

(a) (b)

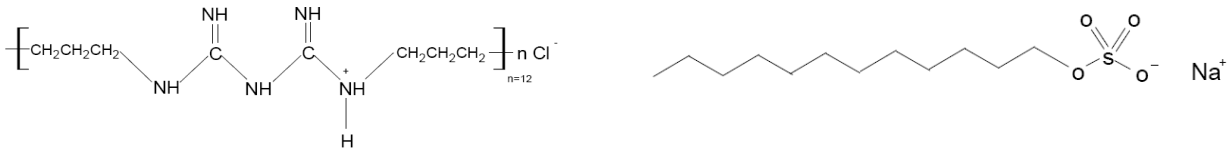


Figure 2-5 : Formules chimiques du polyhexaméthylène (PHMB) (a) et du laurylsulfate (LS) (b) [2]

Um mélange de 1% de PHMB et de 1% de LS (v/v) pour un volume final de 70 mL ont été mis en contact dans le but d'obtenir un précipité insoluble. Le textile a ensuite été trempé dans ce mélange puis passé dans un foulard de 40 cm de largeur (dimensions laboratoire) à environ 1 à 4 m/min. Ce procédé est appelé le foulardage (figure 2-6), il s'agit d'une technique très utilisée dans l'industrie textile. Elle permet l'imprégnation d'un textile par un liquide, le textile passe ensuite à une pression choisie entre des rouleaux, le nombre de fois désiré. Dans notre cas le textile passe une fois entre les rouleaux à une pression de 1 bar, on dit que le textile est exprimé et ensuite séché à 100°C. Cette technique permet une imprégnation en « profondeur » et évite que le textile ne s'égoutte à la sortie.

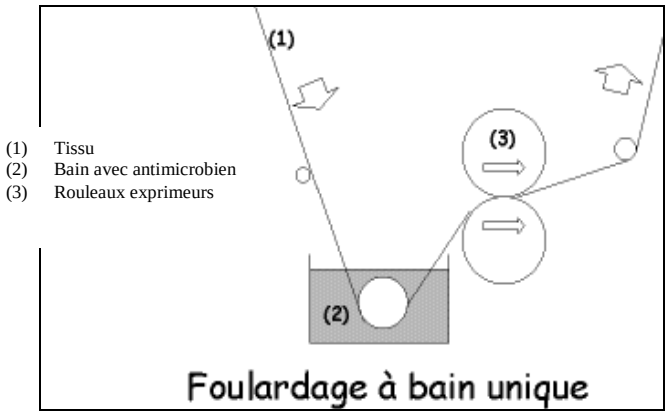


Figure 2-6 : Shématisation de la technique de foulardage [3]

1.1.4. Textiles fonctionnalisés avec de l'argent et du TiO_2 par sol-gel par le LMGP

1.1.4.1. Références des textiles fonctionnalisés par voie sol-gel

Le LMGP situé à Grenoble (38) est spécialiste du sol-gel. Des dépôts d'argent et de TiO_2 ont été réalisés dans le but de fonctionnaliser les textiles pour les rendre antimicrobiens. Le dioxyde de titane (TiO_2) est un composé stable chimiquement et peu coûteux. Il possède une grande affinité avec de nombreuses molécules ce qui permet de fonctionnaliser facilement sa surface notamment avec de l'argent. Différentes concentrations en argent-TiO_2 ont été déposées par méthodologie sol-gel (tableau 2-3).

Tableau 2-3 : Textiles fonctionnalisés par le Laboratoire des Matériaux Génie Physique (C/P blancs).

Référence	Principe actif retenu	conditions ou dépôt
C-A1	Argent-TiO_2	foulardage
C-A2	Argent-TiO_2	foulardage
C-A3	Argent-TiO_2	foulardage
C-TiO_2	TiO_2	foulardage

1.1.4.2. Fonctionnalisation des textiles par voie Sol-Gel par le LMGP

Dans un premier temps, le LMGP a caractérisé les solutions sol-gel d'un point de vue chimique et stabilité. Les solutions étudiées ont ensuite été déposées sur des supports en silicium ou en verre et celles présentant un intérêt d'un point de vue activité antimicrobienne et stabilité chimique ont ensuite été sélectionnées pour réaliser des tests d'imprégnation sur textile. Le LMGP était au stade de développement sur textiles. De ce fait, seuls quelques échantillons ont été fournis au LRGIA pour analyse.

Des solutions à base d'argent ont été préparées : les cations argent sont en effet connus pour leur activité biocide et également pour leur biocompatibilité. Ces cations argent peuvent être générés directement en utilisant des sels d'argent, mais la stabilité chimique de ces derniers est extrêmement faible. Différentes formulations de suspensions liquides à base de nanoparticules d'argent métallique ont été étudiées, les cations argent étant formés dans la couche d'oxyde natif encapsulant naturellement les particules métalliques. La formation de particules d'argent ne relève pas du procédé sol-gel c'est la raison pour laquelle des méthodes de réduction photochimique ont été utilisées.

1.1.4.3. Elaboration de nanoparticules d'argent métallique en solution liquide

Une suspension liquide de nanoparticules d'argent a été préparée par réduction photocatalytique (photochimie) d'$AgNO_3$ en présence de cristallites TiO_2 formés par voie Sol-Gel (figure 2-7).

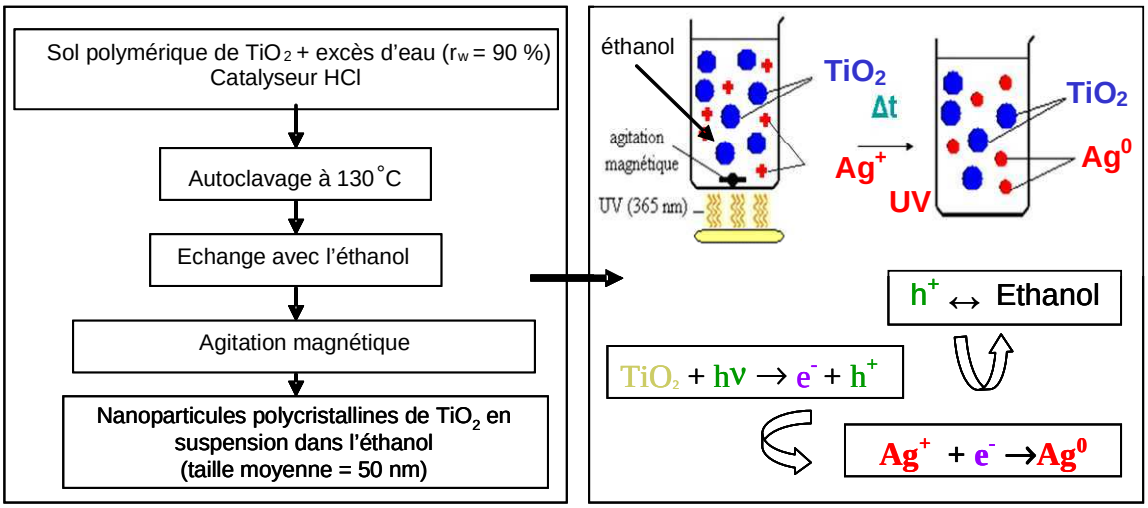


Figure 2-7 : Méthodologie d'obtention de nanoparticules d'argent en suspension par réduction photocatalytique – Figure fournie par le LMGP. r_w humidité relative de 90 %

La suspension de TiO_2 a été diluée dans l'éthanol absolu à une concentration de $2{,}4.10^{-3}$ mol/L, de façon à permettre une pénétration efficace du rayonnement UV dans la solution, mais également pour minimiser l'absorption des UV par les particules de TiO_2.

1.1.4.4. Fonctionnalisation des textiles avec la solution Sol-Gel

Trois concentrations : $0{,}5.10^{-3}$ mol/L $AgNO_3$ et $2{,}4.10^{-3}$ mol/L TiO_2 et cette même suspension diluée 5 et 10 fois dans l'éthanol de la suspension précédente sont appliquées par foulardage sur les textiles C/P fournis par la société TDV et de dimension 30 x 7 cm (figure 2-8). La vitesse de tirage utilisée est de 5 m/min sur la base du dépôt fait par l'IFTH lors de ces fonctionnalisations par foulardage. Par la suite, les textiles ont été séchés à 110°C pendant 5 minutes dans le but d'évaporer le solvant et de fixer le dépôt.

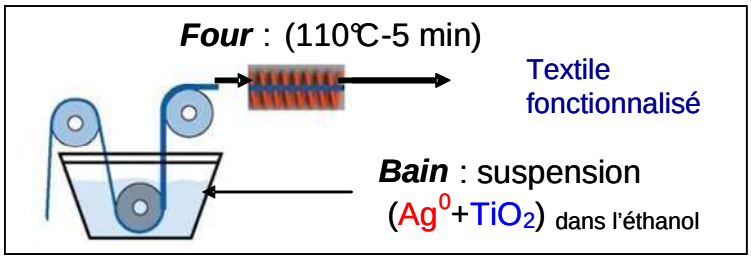


Figure 2-8 : Méthodologie de fonctionnalisation de textiles par imprégnation dans un bain de particules d'argent et de TiO_2 en suspension dans l'éthanol puis dépôt par foulardage

Ce procédé est donc réalisé à l'échelle du laboratoire afin de comprendre les différents traitements avant de pouvoir l'appliquer à plus grande échelle.

1.1.5. Lavages réalisés

Avant chaque traitement de fonctionnalisation, un lavage ménagé à 40°C en eau dure (machine à laver) avec de la lessive normée à 0,5 g/L a systématiquement été réalisé dans le but d'éliminer les impuretés qui subsistent sur le tissu après le tissage du textile (silicone, apprêt).

Différents types de lavages ont été réalisés après fonctionnalisation : des lavages ménagés et des lavages industriels. Les lavages ménagés sont beaucoup moins drastiques et permettent dans un premier temps de vérifier la tenue du traitement au lavage. Ces lavages ménagés ont été réalisés par la société TDV (Laval, France) avec de la lessive Bahia (lessive industrielle) à 90°C. La composition de la lessive Bahia est présentée dans le tableau 2-4.

Tableau 2-4 : Composition de la lessive industrielle Bahia utilisée par la société TDV.

(Composition fournie par la société TDV)

Composition nominale	Pourcentage en masse
Alcool (C10-C15) éthoxylé	5
Alcool benzylique	<0,05
Alcool (C12-C15) éthoxylé	5
Butylphénylméthylpropional	<0,05
Carbonate de sodium	30
Disilicate de sodium	5
Dodécylbenzène sulfonate, sel sodique	5
Hexyl cinnamal	<0,05
Métasilicate de sodium	5
Perborate de sodium	30
Eau restant de la matière brute	14,85

Les lavages industriels sont, eux, plus drastiques pour le textile mais ce sont ces lavages qui sont préconisés en industries agro-alimentaires ou en secteur hospitalier. Le cahier des charges mis en place dans le cadre du projet Actiprotex demande une tenue du traitement antimicrobien après 40 lavages industriels. Pour les lavages industriels, la norme ISO 15797/2002 a été utilisée par le Centre Technique de la Teinture et du Nettoyage (CTTN, Ecully). Brièvement, le cycle de lavage comprend un cycle lessiviel à 85°C de 20 minutes suivi d'un rinçage de 3 minutes, d'une javellisation de 3 minutes avec une solution d'hypochlorite de sodium (NaOCl) et d'une neutralisation avec du bisulfite de soude ($NaHSO_3$) et de l'acide acétique pendant 3 minutes et enfin un essorage final de 3 minutes.

Par la suite, le textile subit une finition en cabine avec une température d'entrée de l'air à 155°C. Le textile atteint alors 135-140°C pendant 11 minutes. Le détergent de référence qu'utilise le CTTN répond à la norme ISO 15797 et sa composition est présentée dans le tableau 2-5.

Tableau 2-5 : Composition de la lessive industrielle utilisée par le CTTN – D'après la norme ISO 15797/2002

Composition nominale en pourcentage en masse	Pourcentage en masse
Na (chaîne en C-12)	0,425
Tensioactif non ionique (C13/15 7EO ou C12/14 7EO)	6,0
Citrate sodique dihydraté	5,0
Sel de sodium de l'acide di-phosphorique hydroxy-éthane (HEDP)	1,0
Métasilicate anhydre	42,3
Polymère (acide polymaléique)	2,0
Agent antimousse (ester d'acide phosphorique)	3,0
Carbonate de sodium	39,5
Azurant optique	0,3
Eau restant de la matière brute	0,475

1.2. Caractérisation de la composition chimique de surface des textiles après traitement

Les caractérisations physico-chimiques des textiles après fonctionnalisation ont été réalisées pour la plupart au LSA (Laboratoire des Sciences Analytiques, Villeurbanne, France) ou au sein de la société Sciences et Surfaces (Ecully) dans le cadre de la thèse de Céline Brunon.

1.2.1. Caractérisation par XPS (réalisée au LSA, Université Lyon 1)

La spectroscopie photoélectronique par rayons X ou XPS (X-Ray Photoelectron Spectroscopy) appelée également ESCA (Electron Spectroscopy for Chemical Analysis) est une analyse élémentaire qualitative et semi-quantitive basée sur l'effet photoélectrique suite au bombardement par rayons X.

Lorsque l'échantillon est irradié par des rayons X ($K\alpha$ de l'aluminium (1486,6 eV) ou $K\alpha$ du magnésium (1253,6 eV)), l'ionisation des atomes constitutifs du matériau peut avoir lieu par effet photoélectrique, ce qui entraîne l'éjection d'électrons : les photoélectrons et les électrons Auger (Figure 2-9). Chaque élément chimique est caractérisé par des orbitales électroniques d'une certaine énergie. Les couches électroniques s'appelant K, L, M, N, la transition L→K est traditionnellement appelée Kα.

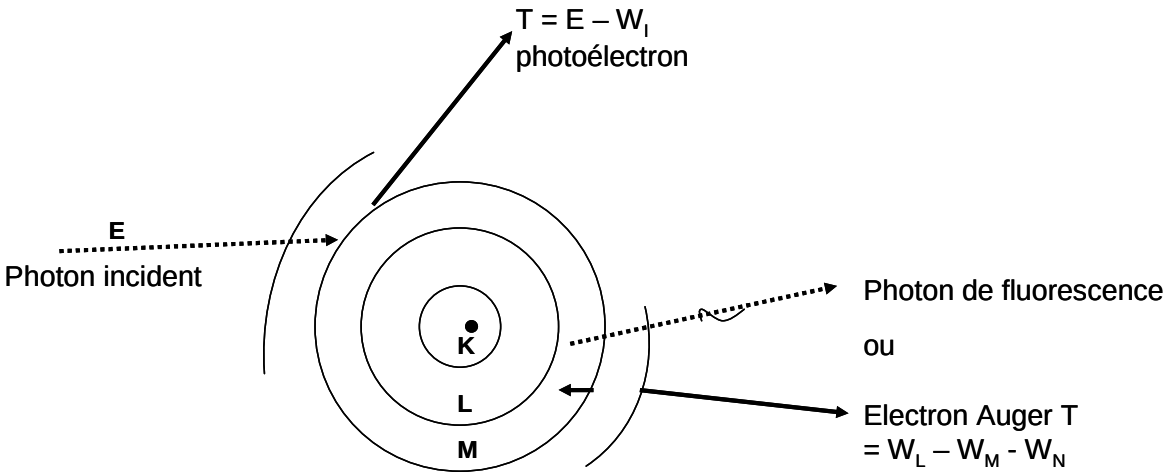


Figure 2-9 : Schéma de principe de l'effet photoélectrique [4]

La détection des photoélectrons est une détection en énergie effectuée à l'aide d'un analyseur électrostatique. Cette technique d'analyse ne permet pas de détecter l'hydrogène et l'hélium car la probabilité qu'il y ait une ionisation (donc création de photoélectrons) par $Al_{K\alpha}$ ($K\alpha$ de l'aluminium) ou $Mg_{K\alpha}$ ($K\alpha$ du magnésium) est très faible, les sources ayant été choisies pour assurer la meilleure résolution en énergie de la détection. L'instrumentation XPS est constituée d'une chambre d'analyse sous ultravide, d'un système d'introduction et de manipulation de l'échantillon, d'une source de rayons X (anticathodes Al et/ou Mg), d'un analyseur d'énergie des électrons (ex : analyseur hémisphérique), d'un système de détection d'électrons (détecteur multi-channel) et d'un système d'acquisition de données.

Un exemple de spectre XPS est représenté sur la figure 2-10. Le spectre XPS présente une succession de pics qui correspondent à des photoélectrons spécifiques (par exemple, le pic C 1s correspond à l'excitation des électrons de la couche 1s ou K du carbone), d'où la possibilité d'identifier les éléments présents (analyse élémentaire).

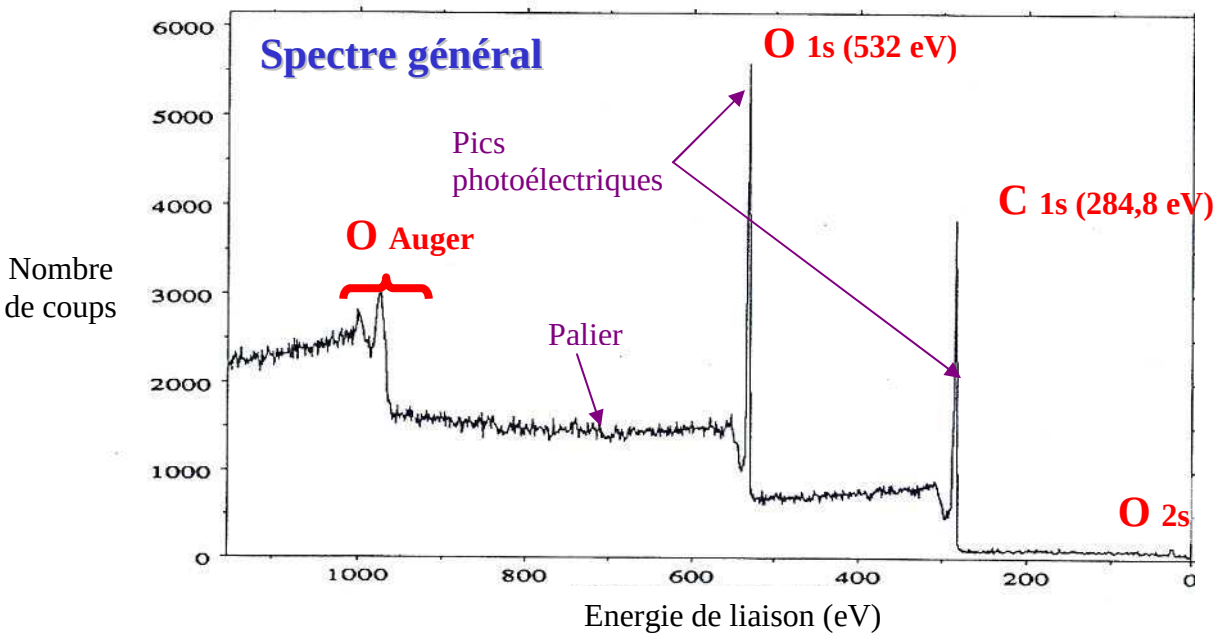


Figure 2-10: Spectre général du Polyéthylène Téréphtalate (PET) - Excitation Al Kα

L'information obtenue *via* les pics photoélectroniques correspond aux premiers nanomètres de la surface de l'échantillon. Il est également possible de réaliser des profils en profondeur. Le profil en profondeur est basé sur un bombardement ionique de l'échantillon (par exemple *via* des ions Ar^+) permettant le décapage couche par couche de l'échantillon.
Le nombre de photoélectrons étant proportionnel au nombre d'atomes des éléments, l'analyse XPS donne également une information quantitative ou plutôt semi-quantitative.

La caractérisation XPS des échantillons a été réalisée avec un spectroscope PHI Quantera SXM de l'entreprise Science et Surface à Ecully (69). Cet appareil est équipé d'un analyseur d'énergie d'électrons hémisphérique à 180° et d'une source monochromatique (Al Kα (1486.6 eV, 15 kV et 4 mA). La zone d'analyse est de 200 µm x 200 µm et l'angle de détection relatif à la surface du substrat est de 45°. La compensation de charge a été réalisée à l'aide d'un appareil d'auto-compensation utilisant un champ émettant des électrons de faible énergie de façon à ajuster la composante principale C-C à 285 eV. Le décapage a été réalisé par des ions Ar^+ d'énergie 1 keV et la calibration de l'abrasion ionique a été réalisée sur un Wafer de Silicium de 100 nm (un wafer de silicium étant un disque très fin et très pur de silicium). Les données ont été analysées avec le logiciel PHI MultiPak™. Les concentrations atomiques ont été déterminées en utilisant les facteurs de sensibilité fournis par le logiciel. Les données sur les déplacements chimiques et les paramètres Auger sont issues de la littérature [5].

1.2.2. Caractérisation par spectrométrie de masse des ions secondaires à temps de vol (ToF-SIMS) (réalisée au LSA, Université Lyon 1)

La spectrométrie de masse d'ions secondaires à temps de vol (ToF-SIMS) est une technique d'analyse extrêmement sensible qui permet de déterminer des structures chimiques des molécules en les fragmentant *via* la séparation en phase gazeuse d'ions atomiques et moléculaires en fonction de leur rapport masse/charge (*m/q*). Cette technique permet de détecter tous les éléments (H et He inclus).

Le spectromètre de masse comporte une source d'ionisation suivie d'un ou plusieurs analyseurs qui séparent les ions produits selon le rapport *m/q*, d'un détecteur qui compte les ions et amplifie le signal, et enfin d'un système de traitement du signal. Le spectre de masse obtenu présente les rapports *m/q* des ions détectés selon l'axe des abscisses et l'abondance relative de ces ions selon l'axe des ordonnées.

Le dispositif expérimental du spectromètre de masse se compose de plusieurs parties :

- un système de pompage permettant d'obtenir l'ultra vide : 10^{-8} à 10^{-10} Pa,
- un système d'introduction de l'échantillon : SAS d'introduction,
- une source d'ionisation. Elle consiste à vaporiser les molécules et à les ioniser. Plusieurs types de sources existent et sont utilisées en fonction du résultat recherché et des molécules à analyser,
- des analyseurs en masse. Ils permettent de séparer les ions en fonction de leur rapport masse/charge (*m/q*). Il existe des analyseurs basse résolution (quadripôle ou quadrupôle) et des analyseurs haute résolution (secteur magnétique et temps de vol),
- un détecteur,
- un système de traitement de données.

La spectrométrie de masse des ions secondaires (SIMS) est une technique qui repose sur l'analyse en masse de particules ionisées émises lorsqu'une surface est bombardée par un faisceau d'ions primaires (Ar^+, Cs^+, Ga^+, …) de faible énergie (10-50keV). Elle est basée sur l'interaction de pulvérisation ou sputtering (Figure 2-11).

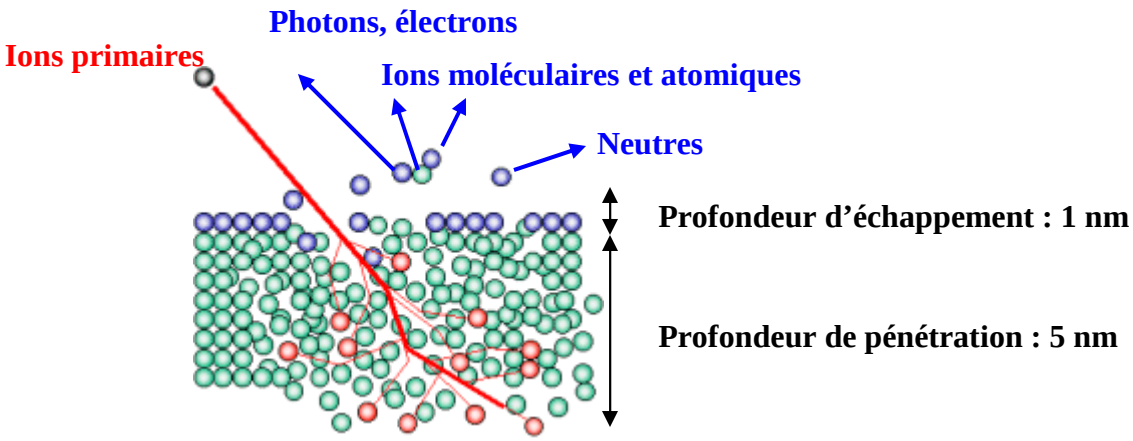


Figure 2-11: Schéma de principe des cascades de collisions isotropes et des particules éjectées après bombardement d'un substrat par des ions primaires. Figure fournie par le LSA

Tous les ions détectés par SIMS étant issus des premières couches atomiques de la cible, cette technique est une technique d'analyse de surface plus sensible que l'XPS (quelques nanomètres de profondeur d'information mais n'est pas quantitative).

L'instrumentation correspondante employée dans le cadre de ces travaux porte le nom de ToF-SIMS TRIFT III (Physical Electronics, Chanhassen, USA). Cet appareil est équipé d'un canon à ions pulsés de 22 keV (courant ionique de 2 nA) avec un raster de 212 µm x 212 µm. Un raster est une zone d'analyse qui a été définie au préalable. Un canon à électrons est utilisé en mode pulsé avec des électrons de faible énergie pour faire la compensation de charges. La dose ionique est gardée en dessous des conditions statiques limites. Les données sont analysées avec le logiciel WinCadence™. La calibration en masse est réalisée sur les ions secondaires hydrocarbonés.

2. Caractéristiques des souches bactériennes testées

2.1. Description et conservation des souches

Les micro-organismes testés sont présentés dans le tableau 2-6 ainsi que leurs principales caractéristiques. Ces espèces microbiennes peuvent représenter des espèces pathogènes ou d'altération dans l'environnement agro-alimentaire mais aussi hospitalier ou sont apparentées à ce type de souches. Comme indiqué dans le tableau 2-6, les travaux ont été réalisés avec 5 espèces bactériennes.

Tableau 2-6 : Caractéristiques et origine des souches bactériennes

Référence des souches	Origine de la souche ou collection	Principales caractéristiques
Listeria innocua LRGIA01	Environnement laitier	Bacille à Gram +, catalase +
Listeria monocytogenes AER102 serovar 1/2 a	Saumure de fromagerie Collection Aérial (Illkirch)	Bacille à Gram +, catalase +
Pseudomonas aeruginosa ATCC 15742	American Type Culture Collection (ATCC)	Bacille à Gram -, oxydase +
Escherichia coli XL1 blue	Souche de collection	Bacille à Gram -, oxydase +
Staphylococcus aureus méthi-R nosoco 3011	Environnement hospitalier (collection du RTI2B)	Coque à Gram +, Catalase +

Pseudomonas aeruginosa ATCC 15742, *Enterococcus faecium* 5255 et *Staphylococcus aureus* méthi-R 3011 ont été fournis par le laboratoire Réparation Tissulaire, Interactions Biologiques et Biomatériaux (RTI2B, Université Lyon 1, France), partenaire du projet Actiprotex. Ces trois souches représentent des souches de l'environnement hospitalier, elles ont été retenues car dans le contexte global du projet Actiprotex, une contribution de textiles antimicrobiens à une meilleure maîtrise des biocontaminations dans les secteurs hospitaliers et agro-alimentaires est recherchée. *Listeria monocytogenes* AER102 représente une souche responsable de contaminations pouvant entrainer des listérioses d'origine alimentaire. *Listeria innocua* LRGIA 01 est quant à elle une souche apparentée à *L. monocytogenes* mais non pathogène.

Pour les conserver, ces 5 souches bactériennes ont été stockées à -80°C en cryo-billes et en Bouillon Cœur Cervelle (BCC) contenant 15 % de glycérol (v/v) et à -20°C en BCC contenant 15 % de glycérol (v/v). Le stock a été réalisé par mise en suspension des micro-organismes dans du BCC (Bouillon Cœur Cervelle) puis incubation 24 h à 30°C avant étalement sur TSA (Tryptone Soy Agar) et incubation 24 h à 30°C pour vérification de la pureté. Les milieux utilisés sont présentés dans l'annexe 1.

La remise en culture des souches a été effectuée par ensemencement d'une colonie isolée dans un bouillon BCC incubé 24 heures à 30°C pour les 5 souches. Ce bouillon a ensuite été centrifugé et le culot repris dans le même volume de BCC contenant 15 % (v/v) de glycérol. Le tout a ensuite été réparti en aliquots de 1 mL en cryotubes avant stockage à -20°C et -80°C. Pour remettre en culture la souche, un cryotube à -20° C a été décongelé à température ambiante pendant 15 minutes et transféré dans 20 mL de BCC : le bouillon a ensuite été incubé 24h à 30°C. En parallèle, un isolement sur milieu TSA a été systématiquement effectué pour vérifier la pureté de la culture.

2.2. Caractérisation de la surface des cellules bactériennes par la méthode MATS (Microbial Adhesion to Solvents)

Dans le but de caractériser les différentes souches du projet Actiprotex, la méthode de MATS a été employée. La méthode est présentée dans ce paragraphe. Il s'agit d'une méthode de partage développée par Bellon-Fontaine *et al.* [6] qui permet de déterminer le caractère électron-accepteur / électron-donneur (acide/base au sens de Lewis) et le caractère hydrophile / hydrophobe des micro-organismes.

2.2.1. Culture des souches pour la méthode MATS

Pour la méthode de MATS, la culture des cellules a été réalisée de la façon suivante :

- Jour 1 : décongélation d'un cryotube contenant la souche considérée (1 mL) 15 min à température ambiante. Le contenu du cryotube décongelé a été placé dans 9 mL de BCC puis incubé 24 h à 30°C.
- Jour 2 : à partir de la suspension de la veille, un isolement sur TSA de la souche à tester a été réalisé puis incubé 24 h à 30°C.
- Jour 3 : à partir d'une colonie isolée, 4 tubes de 9 mL de BCC ont été ensemencés (chaque tube étant destiné à l'ajout d'un solvant) avec 1 colonie par tube puis incubé 24 h à 30°C.
- Jour 4 : - Les cellules (suspension du Jour 3) ont été centrifugées 15 minutes à 8500xg.

  - Le culot a ensuite été lavé 2 fois dans du tampon phosphate de sodium 0,1 mol/L pH 7,4 puis suspendu de nouveau dans 9 mL de ce même tampon.

  - Dans un premier temps, la Densité Optique (DO) a été ajustée à 0,4 à 400 nm pour les 5 souches de façon à avoir environ 10^9 UFC/mL dans le tampon phosphate de sodium utilisé précédemment. Cette DO correspond à « A_0 » (A pour Absorbance) soit la densité optique avant ajout de chaque solvant présenté dans le tableau 2-8. Il s'agit de la valeur de référence correspondant à la DO initiale de la suspension de cellules dans le tampon phosphate.

2.2.2. Protocole de la méthode MATS

Cette méthode repose sur l'affinité des micro-organismes pour différents solvants de propriétés physico-chimiques connues. Différents solvants ont été utilisés (Tableau 2-7) : un

solvant monopolaire acide : le chloroforme, un solvant monopolaire basique : l'éther et deux solvants apolaires : l'hexane et l'hexadécane.

Tableau 2-7 : Caractéristiques énergétiques (mJ/m^2 des solvants utilisés pour la méthode de MATS selon Bellon-Fontaine *et al.* [6] avec γ_L^{LW} composante de Lifshitz Van der Waals, γ^+_L composante électron-accepteur et γ^-_L composante électron-donneur

Nom du solvant	γ_L^{LW}	γ^+_L	γ^-_L	Caractère acide ou basique
hexadécane	27,7	0	0	-
chloroforme	27,2	3,8	0	acide
hexane	18,4	0	0	-
éther	16,7	0	16,4	basique

Ainsi, la différence d'affinité entre le chloroforme (solvant monopolaire acide) et l'hexadécane (solvant apolaire) nous renseigne sur le caractère électron-donneur (caractère base de Lewis) d'une souche bactérienne, puisque les composants de van der Waals des deux solvants sont identiques.

De même, la différence d'affinité entre l'éther et l'hexane (solvants apolaires) nous renseigne sur le caractère électron-accepteur (caractère acide de Lewis) de cette même souche bactérienne, les composants de van der Waals de ces deux solvants étant similaires.

L'estimation des caractères électron-donneur et électron-accepteur ainsi que l'affinité pour les solvants apolaires nous permet d'en déduire le caractère hydrophile/hydrophobe de la souche étudiée. Afin de s'affranchir des interactions électrostatiques entre micro-organismes et solvants, les cellules sont placées dans un liquide de force ionique élevée, tel que le tampon phosphate de sodium utilisé dans le cadre de cette étude.

Les différentes souches ont été remises en culture comme décrit dans le paragraphe 2-1. Par la suite, 0,2 mL de solvant (chloroforme, hexadécane, éther et héxane, pureté >99 %, Sigma-Aldrich, Saint-Quentin Fallavier, France) ont été ajoutés à 1,2 mL de suspension bactérienne dont la Densité Optique (DO) à 400 nm est ajustée à 0,4 (soit 10^9 UFC/mL). L'ensemble a ensuite été agité à l'aide d'un vortex pendant 90 secondes puis laissé 15 minutes à température ambiante dans le but de séparer les 2 phases : phase aqueuse et phase solvant. Ensuite, 1 mL de la phase aqueuse a été prélevé et la DO a été mesurée à 400 nm. Cette DO correspond à A_1 (figure 2-12).

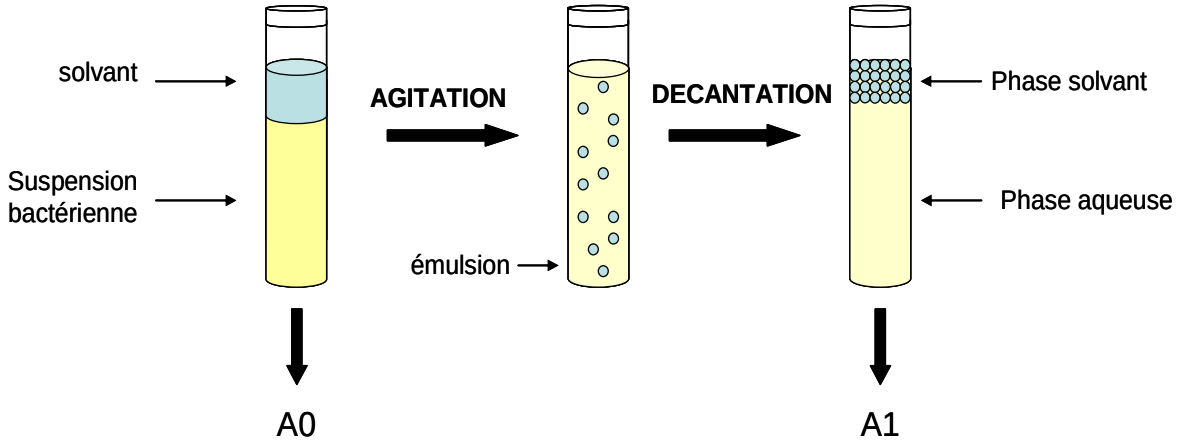


Figure 2-12 : Schéma du protocole expérimental de la méthode MATS.

Le pourcentage d'affinité des bactéries pour les différents solvants testés est donc calculé selon la formule suivante : **Affinité (%) =** $\left(1-\frac{A_1}{A_0}\right)\times 100$

Où :

- A_1 correspond à la DO de la phase aqueuse après ajout du solvant lue à 400 nm ;
- A_0 correspond à la DO avant ajout du solvant lue à 400 nm.

D'après Bertrand *et al*. [7], pour l'hexadécane, lorsque A est supérieur à 50%, la bactérie est dite hydrophobe. Si A est inférieur à 20%, la bactérie est dite hydrophile. Si A est compris entre les deux valeurs, la bactérie est dite moyennement hydrophobe [8, 9]. Si le pourcentage est faible, cela signifie que la souche testée possède une faible affinité (< 20 %) pour le solvant et qu'elle se trouve essentiellement dans la phase aqueuse et inversement si le pourcentage est élevé (> 20 %), la souche testée possède une forte affinité pour le solvant et se trouve donc essentiellement dans la phase solvant.

3. Etude de l'effet des agents antimicrobiens sur les souches bactériennes en solution ou après dépôt sur textile

3.1. Culture des souches bactériennes

Le contenu d'un cryotube conservé à -20° C (préparé selon le protocole décrit dans la partie 2) a été décongelé 15 minutes à température ambiante et transféré dans 20 mL de BCC : le bouillon a ensuite été incubé 24h à 30°C. Un isolement sur milieu TSA a été effectué pour s'assurer de la pureté de la culture.

A partir de cette culture bactérienne, différentes dilutions dans du Bouillon Tryptone Soja (TSB) dilué au 1/20^{éme} ont été réalisées successivement afin d'aboutir à une suspension contenant environ 10^5 UFC/mL :

- Dilution de la culture de départ jusqu'à l'obtention d'une DO de 0,3 à 630 nm correspondant à 10^8 UFC/mL pour toutes les souches.
- Dilution 1/5^{éme}, 1/10^{éme} et 1/20^{éme} → Suspension d'inoculum à environ 10^5 UFC/mL. Ces dilutions ont été réalisées successivement car sur un plan pratique il est plus précis de faire 3 dilutions en série qu'une seule dilution de 1/1000^{éme}. C'est d'ailleurs ce qui est préconisé dans la norme ISO 20743/2005.

A partir de cette suspension, des dénombrements sur gélose TSA ont été réalisés afin de déterminer la concentration précise de l'inoculum. Cet inoculum servira ensuite à ensemencer les textiles et à déterminer leur activité antimicrobienne selon la norme ISO 20743-2005.

La culture pour effectuer les observations au microscope à épifluorescence après contact des micro-organismes avec les textiles a été préparée en suivant le même protocole.

3.2. Les antimicrobiens employés

Différents antimicrobiens ont été utilisés dans le projet Actiprotex. En effet, dès le début du projet des agents antimicrobiens ont été sélectionnés pour la fonctionnalisation des textiles sur la base de leur application. Les agents antimicrobiens utilisés doivent répondre à certains critères et notamment être référencés dans le règlement REACH et dans la directive « biocides » que ce soit pour l'industrie agro-alimentaire ou pour le secteur hospitalier. Les deux principaux agents antimicrobiens utilisés dans le cadre du projet Actiprotex sont présentés dans le tableau 2-8.

Tableau 2-8 : Référence et origine du PHMB utilisé dans le projet Actiprotex

Nom de la molécule	Type de molécule	Fabricant	Origine, forme	Autorisé par
Argent	Métallique (plasma), nanoparticules (sol-gel), ions (plasma, sol-gel)	-	Argent, complexe de silicate d'argent, $AgNO_3$	Directive « biocides » 98/8 CE
Vantocil IB	chlorhydrate de polyhexaméthylène biguanide (PHMB)	Arch Chemical, France	IFTH, liquide	Directive « biocides » 98/8 CE

3.3. Détermination des concentrations minimales inhibitrices (CMI) du PHMB

L'argent a également été utilisé pour la fonctionnalisation des textiles mais la solution associée n'a pas pu être obtenue pour les essais *in vitro* sous forme liquide. Par conséquent, la détermination de la Concentration Minimale Inhibitrice (CMI) n'a pas été possible pour les 2 antimicrobiens sélectionnés. En effet, dans le cas du dépôt plasma, l'argent a été utilisé sous forme métallique et il n'a donc pas été possible de déterminer sa CMI. Dans le cas de la méthodologie sol-gel, l'argent à été utilisé sous forme d'$AgNO_3$ en suspension dans l'éthanol il a donc été également impossible de déterminer la CMI de la suspension utilisée pour fonctionnaliser les textiles par méthodologie sol-gel.

Les différentes concentrations en PHMB testées dans le but de déterminer la CMI de cette molécule vis-à-vis des souches bactériennes testées sont présentées dans le tableau 2-10. Ces solutions sont celles qui ont été employées par l'IFTH pour le traitement des textiles. Les dilutions de ces solutions ont été effectuées dans du TSB 1/20^{éme}. Le milieu TSB utilisé a été dilué au 1/20^{éme} de façon à être plus proche des conditions mises en place lors de la détermination de l'activité antimicrobienne de textiles où le milieu est également dilué au 1/20^{éme}.

Trois souches ont été sélectionnées pour la détermination des CMI : un bacille à Gram négatif (*P. aeruginosa*), un bacille à Gram positif (*L. innocua*) et un coque à Gram positif (*S. aureus*) afin d'avoir un panel de bactéries différentes pour leur comportement vis-à-vis des antimicrobiens.

Tableau 2-9 : Concentrations en PHMB testées sur les 3 souches sélectionnées

Souches	Concentrations en PHMB testées (mg/L)
Pseudomonas aeruginosa ATCC 15742	333,0 ; 285,0 ; 250,0 ; 200,0 ; 165,0 ; 142,5 ; 125,0 ; 121,0 ; 114,0 et 100,0
Listeria innocua LRGIA 01	33,3 ; 25,0 ; 22,2 ; 21,4 ; 20,0 ; 18,7 ; 16,5 ; 14,3 ; 12,5 et 10,0
Staphylococcus aureus Méthi-R nosoco 3011	

Dans un premier temps, des solutions 10 fois plus concentrées ont été préparées à partir de la solution de PHMB de départ. Dans un second temps, à partir de ces solutions, 1 mL a été

déposé dans une boite de Pétri où ont été ajoutés par la suite 9 mL de TSA en surfusion. Les concentrations finales présentées dans le tableau 2-9 sont ainsi obtenues [10].

Plusieurs essais ont été réalisés pour déterminer les concentrations à tester. Ces concentrations ont été choisies sur la base d'études bibliographiques qui mettent en évidence une résistance plus forte de *P. aeruginosa* au PHMB, c'est pour cette raison que les concentrations testées sur cette souche sont plus élevées que les concentrations testées sur les autres souches [2].

A partir des suspensions bactériennes (10^5 UFC/mL) préparées selon le paragraphe 2-1, une strie de 10 µL a été déposée à la surface du milieu (TSA + PHMB) à l'aide d'une oëse calibrée puis ces boîtes ont été incubées 24h à 30°C pour toutes les souches comme présenté dans la figure 2-13.

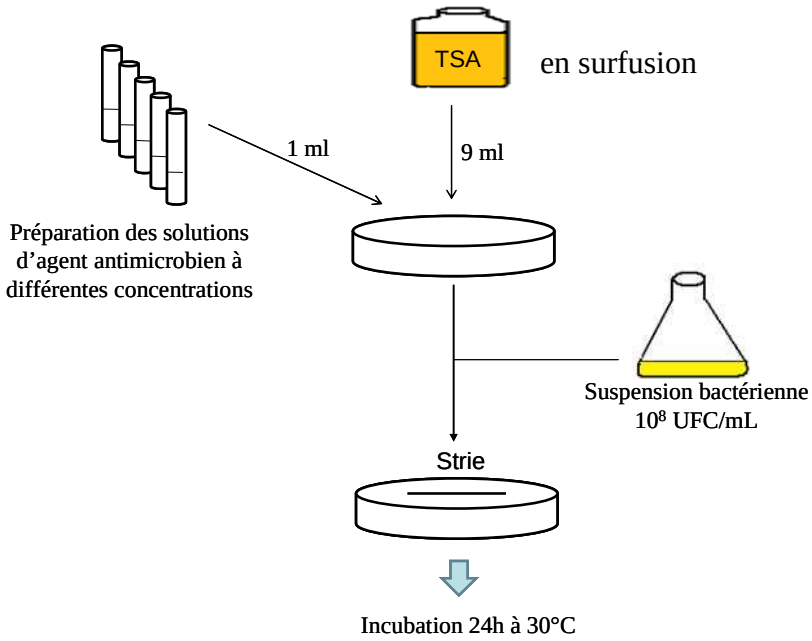


Figure 2-13 : Méthode d'ensemencement pour la détermination des CMI des agents antimicrobiens testés

La Concentration Minimale Inhibitrice (CMI) est la concentration la plus faible où la bactérie n'est plus capable de se multiplier c'est-à-dire la concentration pour laquelle on ne voit plus de colonie au niveau de la strie comme présenté dans l'exemple de la figure 2-14.

Concentration 1 Concentration 2 Concentration 3 Concentration 4

Figure 2-14 : Exemple de la détermination de la CMI du PHMB vis-à-vis de *P. aeruginosa* ATCC 15742

Dans l'exemple de la figure 2-14, la CMI est donc représentée par la concentration 4. Si les concentrations 3 et 4 sont assez différentes, c'est-à-dire éloignées, on considère alors que la CMI se situe entre la concentration 3 et la concentration 4.

3.4. Textiles non traités en conditions différentes d'humidités relative de l'air

Avant d'étudier le comportement des différentes souches sur textiles traités avec un agent antimicrobien, leur comportement sur textile témoin non traité a été évalué. Dans ce but, des échantillons de textiles ont été placés dans des bocaux à 30°C en présence de solutions salines présentant des humidités relatives à l'équilibre variant de 32 à 100 % (tableau 2-10). En industrie agro-alimentaire, les taux d'humidité relative de l'air sont souvent situés entre 40 et 90 % selon les secteurs [11]. Afin de mimer ces conditions, le développement microbien sur les textiles à différentes humidités relatives a été évalué.

Tableau 2-10 : Quantité des sels considérés à ajouter à 100 g d'eau pour obtenir une solution saturée en sel à 30°C

Humidité relative dans le bocal	Sel utilisé	Quantité de sel à peser pour 100 mL d'eau distillée
100%	-	100 mL d'eau
97%	K_2SO_4	15 g
90%	$BaCl_2$	60 g
84%	KCl	40 g
75%	NaCl	36 g
32%	$MgCl_2$	58 g

Des humidités relatives différentes ont été obtenues en dissolvant différents sels dans de l'eau distillée dans un bocal fermé de façon hermétique. Les quantités de sels utilisées pour arriver à saturation dans le bocal sont présentées dans le tableau 2-11. Tous ces sels ont été fournis par la société Sigma-Aldrich (Saint-Quentin Fallavier, France). Le système est présenté dans la figure 2-15.

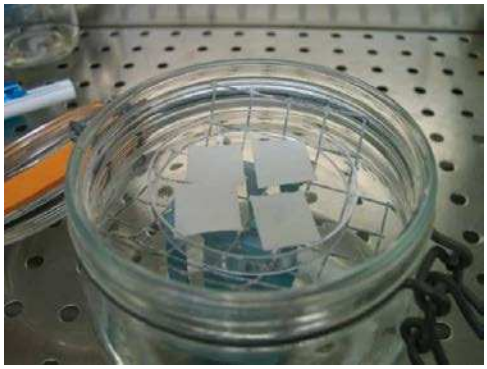


Figure 2-15 : Dispositif pour la mesure de la croissance des micro-organismes sur textiles en conditions différentes d'humidités relatives de l'air

Les 100 mL de solution saline ont été placés dans un bocal. Une grille a été placée à l'intérieur de chaque bocal contenant un sel en solution afin d'obtenir une humidité relative à l'équilibre définie. Les textiles ont été déposés sur un couvercle de boîte de Pétri de 45 mm de diamètre stérile sur la grille. Ensuite, le bocal a été fermé et l'équilibre en humidité a été atteint en environ 2 h dans une étuve à 30°C avant l'ensemencement avec les bactéries.

3.4.1. Préparation des textiles

Différentes humidités ont été choisies et le cas d'une humidité relative de 30 % est un cas extrême pour vérifier que la croissance va bien être ralentie voire inhibée. Par la suite l'humidité relative de 100 % sera choisie pour la détermination de l'activité antimicrobienne de textiles dans le but de mettre les micro-organismes dans des conditions où ils seront les plus aptes à croître. Des humidités intermédiaires ont également été testées. Des éprouvettes de textiles non traités 65% coton / 35% polyester d'environ 0,1 g chacune ont été découpées puis déposées dans un couvercle de boite de Pétri de 45 mm de diamètre, à l'intérieur d'un bocal préalablement stérilisé (figure 2-15).

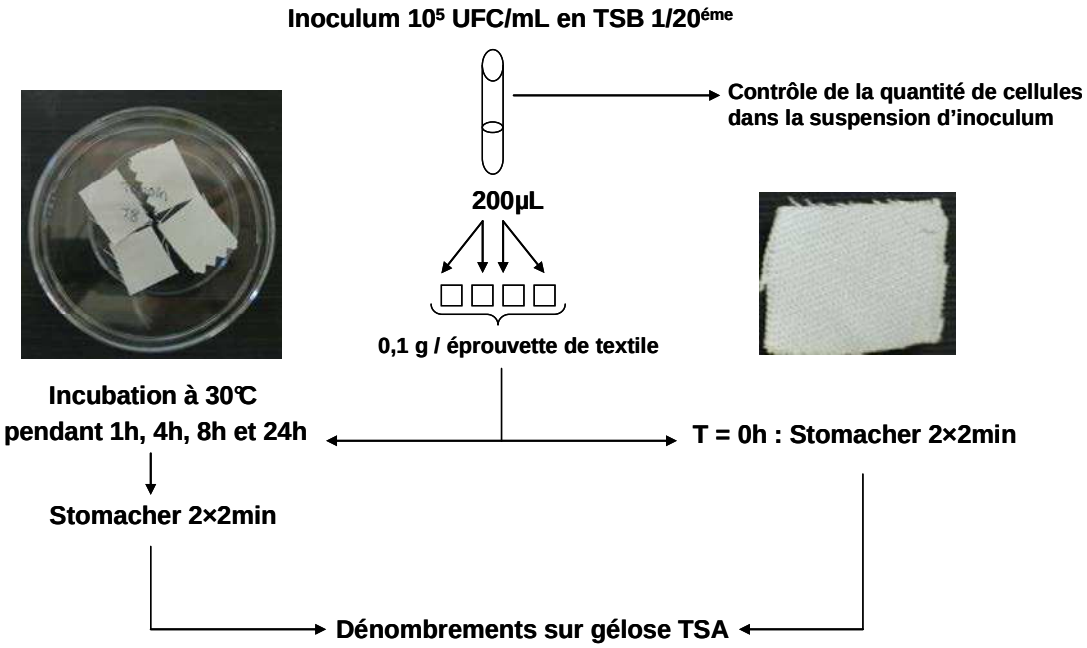
3.4.2. Ensemencement des éprouvettes

A partir de la culture bactérienne préparée comme dans le paragraphe 2-1 (10^5 UFC/mL), l'ensemencement des textiles a été réalisé pour la mesure de la croissance sur textiles témoins en présence d'humidités relatives différentes mais aussi pour la mesure de l'activité

antimicrobienne de textiles traités (ISO 20743-2005). La culture pour effectuer les observations au microscope à épifluorescence après contact des micro-organismes avec les textiles a également été réalisée de la même façon.

La figure 2-16 présente le protocole employé. Quatre éprouvettes de textiles de 0,1 g chacune ont été découpées par échantillon. Par la suite, 200 µL de la suspension d'inoculum préparée selon le paragraphe ci-dessus ont été répartis sur ces 4 éprouvettes. Les bocaux ont ensuite été incubés 1, 4, 8 et 24 heures à 30°C.

A chaque temps, 2 éprouvettes de textile ont été placées dans 20 mL de diluant pharmacopée contenant un neutralisant dans un sac à malaxer (Stomacher). Ce sac a ensuite été passé 2 minutes par face au Stomacher à puissance maximale. Un millilitre a ensuite été prélevé pour réaliser un dénombrement sur milieu gélosé TSA dans la masse après 24 h d'incubation à 30°C.



2-16 : Protocole d'ensemencement des éprouvettes de textiles pour la détermination de l'activité antimicrobienne de textiles adapté de la norme ISO 20743-2005

Pour les temps 4, 8 et 24 h, un rinçage à l'aide d'une seringue de 5 mL remplie d'eau distillée stérile ou de diluant pharmacopée a été réalisé dans le but de décrocher les bactéries qui n'ont pas adhéré. Des tests préalables n'ont montré aucune différence lors d'un rinçage avec le diluant pharmacopée ou de l'eau distillée. C'est donc l'eau distillée qui a été employée par la suite.

3.5. Détermination de l'activité antimicrobienne adapté de la norme ISO 20743/2005

Le protocole de détermination de l'activité antimicrobienne de textiles a été mis en place sur la base de la norme ISO 20743/ 2005. L'inoculum a été préparé comme décrit dans le paragraphe 2-1 (10^5 UFC/mL en TSB 1/20^{éme}). La préparation des textiles ainsi que leur ensemencement et le dénombrement après décrochage ont été réalisés de la même façon que dans le paragraphe 3-4-1 et 3-4-2 (dépôt de 200 µL de suspension d'inoculum à 10^5 UFC/mL en TSB 1/20^{éme} sur 4 éprouvettes de textiles de 0,1 g chacune).

La mesure de l'activité antimicrobienne à 24 heures a permis de déterminer si le textile possède une activité antibactérienne vis-à-vis de la souche testée (figure 2-17).

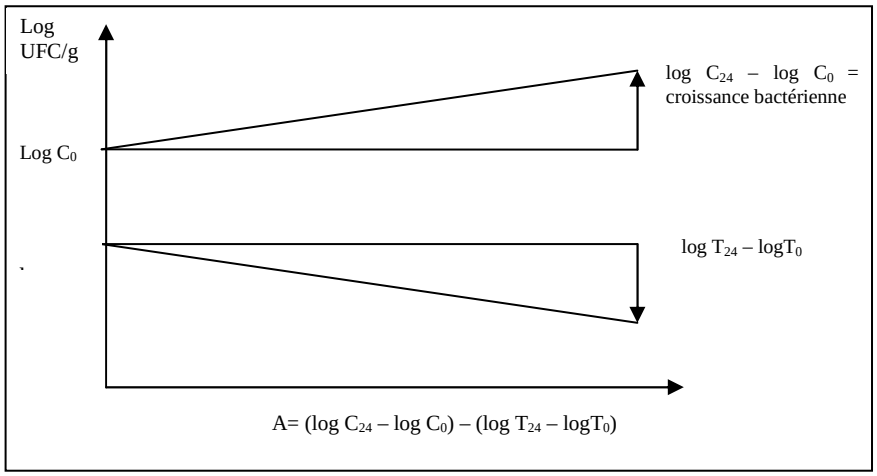


Figure 2-17 : Représentation schématique du calcul du coefficient mesurant l'activité antimicrobienne du textile

Le calcul de l'activité antimicrobienne à 24 heures est réalisé comme suit :

$$A = (\log C_{24} - \log C_0) - (\log T_{24} - \log T_0)$$

Avec :

A : activité antimicrobienne du textile testé à 24 heures

C_{24} : nombre de bactéries après 24 heures d'incubation sur le textile témoin en UFC/g de textile

C_0 : nombre de bactéries sur le textile témoin à t = 0 c'est-à-dire immédiatement après l'inoculation en UFC/g de textile

T_{24} : nombre de bactéries après 24 heures d'incubation sur le textile traité en UFC/g de textile

T_0 : nombre de bactéries sur le textile traité à t = 0 c'est à dire immédiatement après l'inoculation en UFC/g de textile.

D'après la norme ISO 20743/2005, la croissance sur textile témoin en 24 h doit être d'au moins 1 log UFC/g pour valider le test. Une fois le test validé, lorsque l'activité antimicrobienne en 24 h est supérieure à 2, on peut considérer le textile actif et on peut dire qu'il possède une activité bactériostatique. Lorsque, l'activité antimicrobienne calculée est inférieure à 2, le textile est considéré comme non actif vis-à-vis de la souche testée.
Lorsqu'une réduction décimale de la population microbienne déposée sur le textile est constatée dès la mise en contact des bactéries avec le textile traité (c'est-à-dire lorsque $T_0 = 0$), le textile est considéré comme bactéricide c'est-à-dire que la molécule déposée à sa surface est à une concentration telle que les bactéries sont incapables de se développer et sont tuées dès la mise en contact.

3.6. Observation des textiles par microscopie électronique à balayage (MEB)

Dans le but de visualiser la répartition des micro-organismes sur un textile non traité et sur les textiles traités par méthodologie plasma avec de l'argent ou par le brevet IFTH avec du PHMB, des observations au MEB ont été réalisées. Les micro-organismes ont été déposés sur le textile traité ou non comme décrit dans le paragraphe 3-4-1.

Deux protocoles ont été utilisés pour la préparation des échantillons en vue de leur observation au microscope électronique à balayage :

- Un premier protocole pour les textiles traités par la méthodologie plasma avec de l'argent simple couche et les textiles non traités. Les observations microscopiques correspondantes ont été réalisées au Centre Technologique des Microstructures (CTµ, Plateforme technologique de microscopie électronique et confocale de l'université Lyon 1).
- Un second protocole pour les textiles traités au PHMB/LS par l'IFTH et observés au Laboratoire de Tribologie et Dynamique des Systèmes à l'Ecole Centrale de Lyon en collaboration avec la société Sciences et Surface.

Ces 2 protocoles ont été utilisés car des premières analyses ont pu être faites au CTµ et la suite des analyses a été effectuée à l'Ecole Centrale de Lyon.

<u>Protocole 1 (Centre de microscopie de Lyon, Université Lyon 1, France)</u> :

- Immerger les éprouvettes de textile de 1 cm^2 dans 5 mL de liquide fixateur*.
- Laisser fixer 45 minutes à température ambiante.

- Eliminer le mélange fixateur sans sécher. Remplacer par 5 mL de tampon de rinçage. Faire 3 bains de rinçage** à température ambiante, 10 min minimum pour chaque bain.
- Stocker les échantillons fixés à 4°C.
- Faire parvenir dans le troisième bain de rinçage le plus rapidement possible (dans les 24 h qui suivent) les échantillons, en atmosphère refroidie (blocs réfrigérés par exemple) mais sans risque de congélation.

Les échantillons ont ensuite été observés à l'aide d'un microscope électronique à balayage (Hitachi S800 FEG, Japon) au CTµ de l'Université Lyon 1.

- Liquide fixateur* :

- Tampon cacodylate de sodium 0,2 mol/L. Peser 8,56g de cacodylate de sodium, ajouter 200 mL d'eau distillée, ajuster le pH à 7,3 avec du HCl 1 mol/L.
- Glutaraldéhyde 4 % (v/v). A mélanger extemporanément volume à volume. Pour le premier mélange, à 30°C, réchauffer le tampon et mélanger au fixateur qui est lui-même à température ambiante.

- Tampon de rinçage : tampon cacodylate de sodium 0,2 mol/L**

- Fixation des échantillons avec du tétraoxyde d'osmium (OsO_4) puis déshydratation par contournement du point critique.
- Recouvrir les échantillons par de l'or palladium à l'aide d'un évaporateur sous vide.

<u>Protocole 2</u> (Ecole Centrale de Lyon, Ecully, France):

- Immerger les éprouvettes de textile de 1 cm^2 dans le liquide fixateur (glutaraldéhyde à 2% (v/v) dans du tampon phosphate de sodium à 0,01 mol/L pH 7,3).
- Laisser fixer 2 h à température ambiante.
- Eliminer le mélange fixateur sans sécher. Remplacer par le tampon de rinçage (tampon phosphate de sodium 0,01 mol/L pH 7,3). Faire 2 bains de rinçage à température ambiante, 10 min minimum pour chaque bain.
- Réaliser différents bains d'alcool éthylique pour la déshydratation : 1 bain d'éthanol (v/v) à 30%, à 50%, à 80%, à 100% dans de l'eau distillée : 10 min par bain (avec 2 bains à 100%).
- Réaliser un bain à 50 % (v/v) d'HMDS (HexaMéthylDiSilazane) et 50 % (v/v) d'éthanol 100 % pendant 15 min.
- Réaliser 2 bains d'HMDS pur de 15 min et un dernier bain d'HMDS pur avec évaporation totale sur la nuit.

Les échantillons ont ensuite été métallisés au Laboratoire de Tribologie et Dynamique des Systèmes à l'Ecole Centrale de Lyon puis observés au microscope électronique à

balayage (PHILIPS, XL 20), équipé de détecteurs d'électrons secondaires, d'électrons rétrodiffusés et de photons X (détecteur EDX).

Pour ces 2 protocoles, les premières étapes de fixation ont sensiblement été les mêmes, seules les étapes de déshydratation et métallisation ont différé.

4. Etude de la viabilité des bactéries par microscopie à épifluorescence

Dans cette quatrième partie, les différentes méthodologies employées pour l'étude de l'état physiologique de *L. innocua* LRGIA 01 sont présentées. Dans un premier temps, la méthode d'étude de l'état physiologique de *L. innocua* LRGIA 01 en milieu liquide après contact avec le PHMB sera décrite puis, dans un second temps, c'est la méthodologie de l'étude de l'état physiologique de 3 souches (*L. innocua* LRGIA 01, *S. aureus* méthi-R nosoco 3011 et *P. aeruginosa* ATCC 15742) sélectionnées dans le projet Actiprotex après contact avec un textile traité au PHMB qui sera présentée.

4.1. Après contact avec les antimicrobiens en milieu liquide

Ce protocole a eu pour objectif d'évaluer l'état physiologique des micro-organismes mis en présence de PHMB à différentes concentrations et en milieu liquide.

Une suspension de cellules de *L. innocua* LRGIA 01 à 10^5 UFC.mL^{-1} a été mise en contact avec 5, 20 et 40 mg/L de PHMB en milieu liquide. Ces différentes suspensions ont ensuite été incubées 0, 6 et 24 heures à 30°C. En parallèle, un témoin sans PHMB a été incubé de la même façon. Un millilitre de ces suspensions bactériennes en présence de PHMB ou non a ensuite été prélevé puis placé en présence de fluorochromes qui sont des marqueurs de viabilité cellulaire et d'intégrité membranaire (Syto 9 et IP) selon la figure 2-18.

Le microscope à épifluorescence utilisé est un Axiovert 25 CFL (Carl Zeiss, Iena, Allemagne) équipé d'une lampe UV et d'un objectif de grossissement x100.

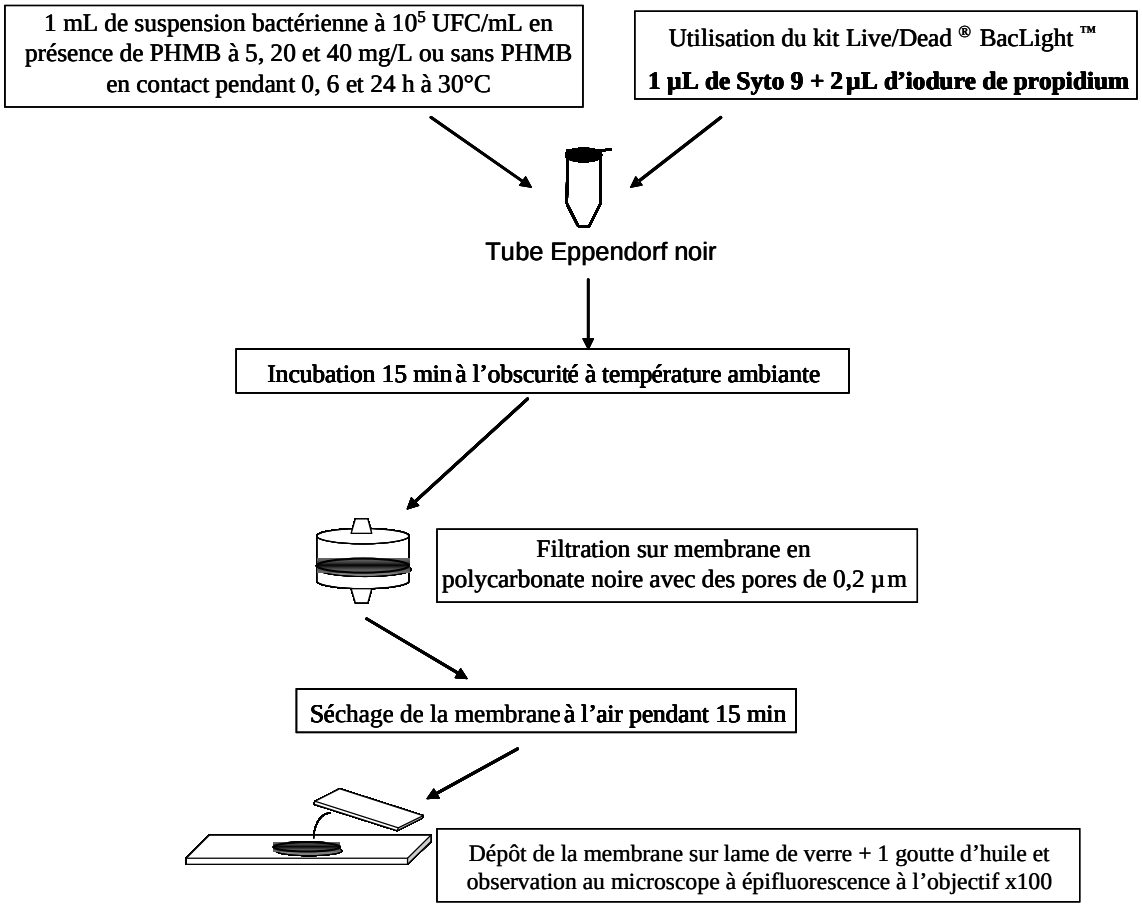


Figure 2-18 : Protocole de coloration des cellules pour l'étude de leur viabilité après contact avec du PHMB en milieu liquide (utilisation du kit Live/Dead® BacLight™, Invitrogen, France)

Le kit Live/Dead® BacLight™ (Invitrogen, Cergy Pontoise, France) a été utilisé dans le but de suivre l'état physiologique des micro-organismes et plus particulièrement l'état de leurs membranes après contact avec un agent antimicrobien. En effet, le kit est composé de 2 colorants ayant pour cible les acides nucléiques : le Syto 9 et l'iodure de propidium. Si la membrane plasmique est endommagée, les 2 colorants pénètrent dans la cellule et se fixent au niveau des acides nucléiques pour donner une coloration rouge. A l'inverse, si la membrane est intacte, seul le Syto 9 pénètre dans la cellule et la colore en vert. Il est donc ainsi possible de différencier les cellules viables colorées en vert et les cellules non viables colorées en rouge.

4.2. Après contact avec les textiles antimicrobiens

L'ensemencement des textiles et le décrochage des bactéries a été effectué comme décrit dans les paragraphes 3.4.1 et 3.4.2 pour la détermination de l'activité antimicrobienne de textiles.

Après décrochage des bactéries du textile, les 20 mL de diluant pharmacopée contenant les bactéries ont été centrifugés 10 minutes à 8500 g afin de concentrer les bactéries dans un volume plus faible (reprise du culot de centrifugation dans 1 mL de Ringer) pour pouvoir effectuer ensuite le marquage.

L'objectif de ce protocole a été de dénombrer la totalité des bactéries dans leurs différents états physiologiques (viables ou non viables) après contact avec un textile traité antimicrobien.

Le résultat est exprimé en logarithme du nombre de bactéries par gramme selon la formule suivante :

$$Log\left(Nb\ \ bactéries / g\right) = \log\left(\frac{Nb\ \ bactéries\ \ observées}{Nb\ \ champs}\right) \times \frac{S}{S'} \times 5^{*}$$

Avec :

Nb bactéries observées : Nombre de bactéries dénombrées sur la totalité des champs observés

Nb champs : Nombre de champs observés

S : Surface de la membrane de filtration (491 mm^2)

S' : Surface du champ microscopique (0,49 mm^2)

5 : Facteur de conversion en gramme*

* 20 mL de suspension de décrochage ont été mis en contact dans un sac Stomacher avec 2 éprouvettes de textiles de 0,1 g chacune. L'ensemble des bactéries décrochées à partir de ces 0,2 g de textiles a ensuite été repris dans un volume de 1 mL par remise en suspension du culot bactérien obtenu par centrifugation des 20 mL de suspension de décrochage. En conséquence pour remonter de la concentration en bactéries par millilitre à celle par gramme de textile, il faut donc la multiplier par 5.

La figure 2-19 présente les étapes de marquage à l'aide du kit Live/Dead® BacLight™ pour un dénombrement par épifluorescence.

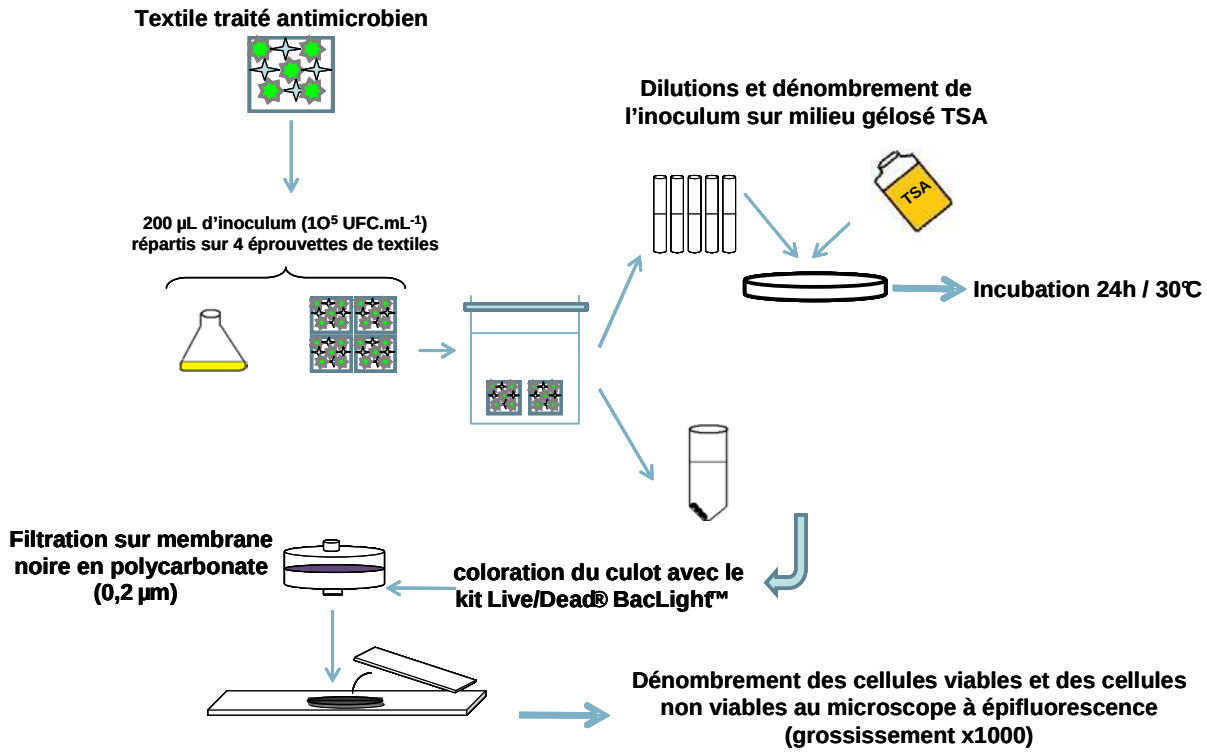


Figure 2-19 : Protocole de marquage des cellules avec kit Live/Dead® BacLight™ après contact avec un textile antimicrobien

Ce protocole a été mis en place au laboratoire et a été appliqué à différentes souches bactériennes : *L. innocua* LRGIA 01, *S. aureus* méthi-R nosoco 3011 et *P. aeruginosa* ATCC 15742.

En parallèle du dénombrement au microscope après coloration des cellules avec le kit Live/Dead® BacLight™, un dénombrement des cellules cultivables sur milieu gélosé a été réalisé dans le but de mettre en évidence la présence éventuelle de cellules viables non cultivables (VNC) après contact avec le textile traité. Ce dénombrement a été réalisé comme dans le cas de la détermination de l'activité antimicrobienne (paragraphe 3-5).

En effet, certaines cellules apparaissant vertes au microscope donc viables peuvent ne plus être capables de se multiplier sur milieu suite à différents stress subis par la cellule. Il est donc apparu important de pouvoir comparer les 2 méthodes de dénombrements.

5. Etude de la membrane bactérienne après contact avec des molécules antimicrobiennes par spectrofluorimétrie en présence de sondes fluorescentes pour évaluer la fluidité membranaire et par spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier

5.1. Etude de la fluidité des membranes bactériennes après contact avec le PHMB par spectrofluorimétrie en présence de sondes fluorescentes

La spectroscopie de fluorescence est une technique très utilisée pour évaluer la fluidité des membranes biologiques. Les mesures peuvent être réalisées *in situ* et des sondes sont disponibles pour l'étude de structures cellulaires spécifiques. Les sondes fluorescentes utilisées pour l'étude des membranes sont des sondes qui se localisent spécifiquement dans les doubles couches lipidiques membranaires. Elles sont sensibles aux altérations de la fluidité membranaire dues aux modifications structurales des lipides. Il existe de nombreuses sondes membranaires dont le DPH (1,6-DiPhényl-1,3,5-Hexatriène) et son homologue le TMA-DPH (TriMéthylAmmonium-DiPhénylHexatriène) employés dans le cadre de cette étude pour évaluer la fluidité membranaire de cellules de *L. innocua* en présence et en absence de PHMB.

Le principe de la mesure de la polarisation de fluorescence est le suivant : quand une lumière polarisée excite un fluorochrome, l'absorption de la lumière est maximale si la direction du vecteur électrique de la lumière est parallèle à la direction du moment d'excitation de la molécule. L'utilisation d'une lumière d'excitation orientée permet de créer une population de fluorochromes excités orientés dans une direction. Ce phénomène est appelé photo-sélection. Puisque l'émission d'un photon par un fluorochrome demande un temps plus long (qui dépend de la durée de la vie à l'état excité), le fluorochrome peut se réorienter avant l'émission. En effet, si le fluorochrome se réoriente, la lumière d'émission ne sera plus orientée parallèlement à la lumière d'excitation. La dépolarisation de la lumière qui en résulte est définie par l'anisotropie de fluorescence.

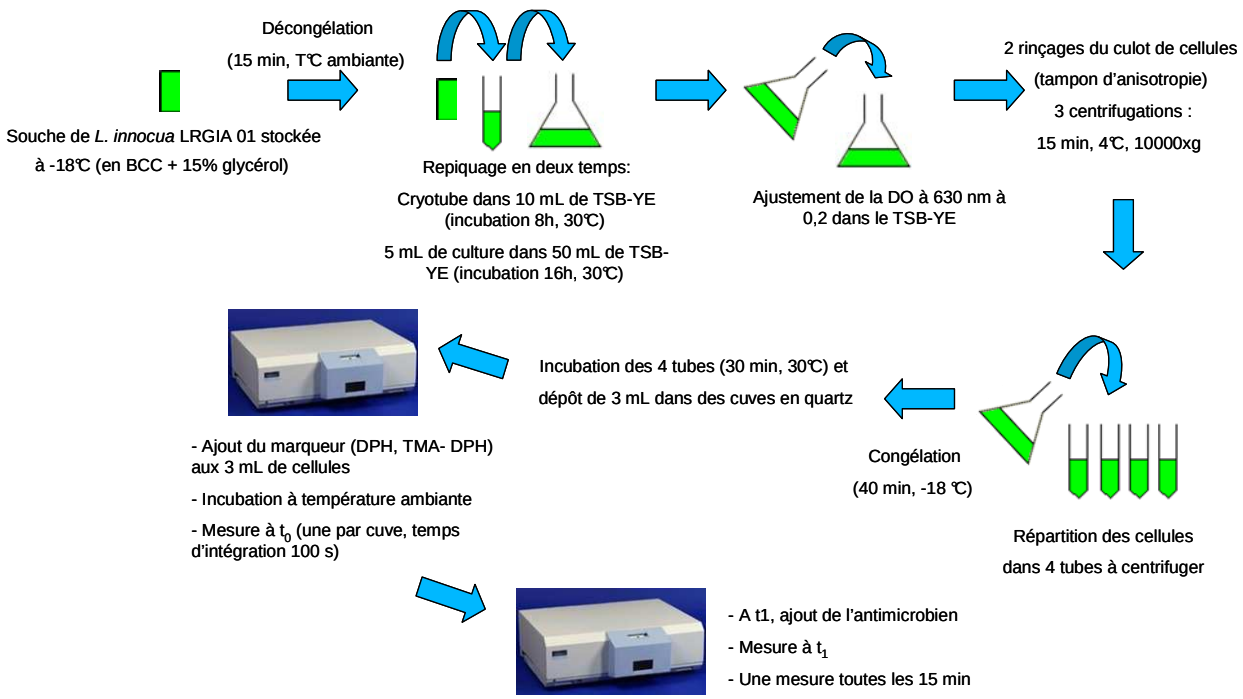


Figure 2-20 : Mode opératoire pour la mesure d'anisotropie de fluorescence des sondes de fluidité membranaire (DPH et TMA-DPH) par spectrofluorimétrie de *L. innocua* LRGIA 01 après contact avec un agent antimicrobien

La figure 2-20 présente le protocole expérimental adopté. L'utilisation du TSB-YE (Bouillon tryptone soja avec de l'extrait de levure) a permis une croissance plus rapide des cellules de *L. innocua* LRGIA 01. En effet, pour la mesure de l'anisotropie de fluorescence, les cellules doivent se trouver dans un milieu riche qui leur permet un bon développement en peu de temps.

La DO de la culture de 16 heures a ensuite été ajustée à 0,2 à 630 nm soit environ 10^8 UFC/mL dans le TSB-YE. Les cellules ont ensuite été rincées 2 fois avec du tampon d'anisotropie (Na_2HPO_4 : 3 g/L ; KH_2PO_4 : 6 g/L ; NaCl : 2 g/L ; $(NH_4)_2SO_4$: 8 g/L ; pH ajusté à 7,6) en réalisant 3 centrifugations de 15 minutes à 10000 x g à 4°C. Les cellules ont ensuite été congelées pendant 40 min à -18°C dans un souci de conservation et de comparaison. En effet, dans certains cas 2 manipulations sont réalisées dans la journée et les cellules utilisées dans l'après-midi doivent être congelées. Afin de pouvoir comparer les résultats obtenus le matin et les résultats obtenus l'après-midi les 2 pools de cellules ont été congelés et décongelés de la même façon.

Ces cellules ont ensuite été placées 30 minutes à 30°C pour stabiliser la température de mesure. Cinq microlitres de DPH ou de TMA-DPH à 2 mol/L ont été ajoutés à 3 mL de suspension cellulaire en eau physiologique et une concentration finale de 4 µmol/L a donc été

obtenue. Les cellules ont été mises en contact 7 min avec le TMA-DPH et 30 min avec le DPH à température ambiante et à l'obscurité.

Une première lecture a été réalisée avant l'ajout de l'agent antimicrobien. L'agent antimicrobien a été ajouté juste avant la seconde lecture et des mesures d'anisotropie de fluorescence du DPH ou du TMA-DPH ont ensuite été réalisées à l'aide d'un spectrofluorimètre LS 55 (Perkin Elmer, Courtaboeuf, France) après différents temps de contact avec l'antimicrobien testé. Ces manipulations ont été répétées trois fois chacune.

Les conditions de mesures qui ont été employées au cours des manipulations sont les suivantes :

- Longueur d'onde d'excitation : 350 nm (fente : 5)
- Longueur d'onde d'émission : 420 nm (fentes : 5)
- Temps d'intégration : 100 s.
- Agitation magnétique lente en continu

5.2. Etude des modifications de la membrane bactérienne après contact avec le PHMB par spectroscopie infrarouge à transformé de Fourier

La préparation des cellules bactériennes a été effectuée dans le milieu BCC de la même façon que pour la préparation des cellules pour les mesures d'anisotropie de fluorescence. *L. innocua* LRGIA 01 a été cultivée 16 h dans du BCC à 30°C dans le but de collecter des cellules en phase exponentielle de croissance. La DO à 630 nm a ensuite été ajustée à 0,2 dans le BCC puis les cellules ont été mises en contact avec du PHMB à 10 mg/L ou à 20 mg/L correspondant respectivement à la moitié de la Concentration Minimale Inhibitrice (CMI) ou à la CMI. Un témoin sans PHMB a également été réalisé en parallèle.

Après 1, 4 et 9 h de contact entre les cellules et la molécule antimicrobienne à 30°C, les cellules ont été centrifugées à 8500 x g pendant 10 min et rincées 2 fois dans une solution stérile d'eau physiologique (9 g/L de NaCl dans de l'eau distillée). Le culot a enfin été repris dans 100 µL d'eau physiologique et ces 100 µL de bactéries concentrées ont été déposés sur une fenêtre spectrale composée de CaF_2 et séchés 1 h à 25°C sous une hotte à flux laminaire.

Les spectres des bactéries ont été acquis à des nombres d'ondes compris entre 1000 et 4000 cm^{-1} à l'aide d'un spectromètre infrarouge Bomem FLTA 200–100 (ABB process, Montluel, France). Les spectres ont été mesurés à une résolution de 4 cm^{-1}. Une moyenne de 40 scans a été réalisée pour chaque échantillon. Les spectres ont ensuite été traités (correction de la ligne

de base, normalisation vectorielle) à l'aide du logiciel OPUS NT 5.1 (Bruker Optics, Wissembourg, France). Un spectre de base a été enregistré sur une fenêtre CaF_2 sans bactéries.

6. Références bibliographiques

[1] R. J. R. Chatelin, M. Bourgeois. Procédé pour rendre biostatique ou biocide un matériau. EP Patent 0 955 069 A1 (2006).

[2] G. McDonnell, A. Russel. Antiseptics and disinfectants: activity, action, and resistance. *Clinical Microbiology Reviews* (1999) **12**: pp. 147-179.

[3] http://memotextile.free.fr/, consulté le 13 mars 2009.

[4] H. Métivier, B. Lauwers, D. Paul, I. Aubineau-lanièce. Radioprotection et ingénierie nucléaire. *EDP Sciences Editions (*2006).

[5] D. Briggs G. Beamson. High resolution XPS of organic polymers: the Scienta ESCA300, *database*. (1992) 295.

[6] M. N. Bellon-Fontaine, J. Rault, C. J. Van Oss. Microbial adhesion to solvents: a novel method to determine the electron-donor/electron-acceptor or lewis acid-base properties of microbial cells. *Colloids and Surfaces. B, Biointerfaces* (1996) **7**: pp. 47-53.

[7] A. L. Bertrand, J. J. Morrier, G. Benay, M. Lissac, O. Barsotti. Etude "*in vitro*" de l'adhérence de "*Streptococcus mutans*" sur un alliage niti utilisé en orthodontie. *Les cahiers de l'ADF* (2003) **14-15**: pp. 50-55.

[8] J. Gibbons, I. Etherden. Comparative hydrophobicities of oral bacteria and their adherence to salivary pellicles. *Infection and Immunity* (1983) **41 (3)**: pp. 1190-1196.

[9] K. K. Lee, K. C. Yi. A comparison of three methods for assaying hydrophobicity of pathogenic vibrios. *Letters in Applied Microbiology* (1996) **23**: pp. 343-346.

[10] Clinical laboratory standards institute. Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically. *15th informational supplement, Wayne, PA: CLSI* (2003) 6th edition.

[11] http://www.waltermeier.com/fr/climat/fr/home.html, consulté le 12 mars 2009.

Chapitre 3 : Choix des micro-organismes cibles et adaptation du protocole de détermination de l'activité antimicrobienne pour des textiles

Chapitre 3 : Choix des micro-organismes cibles et adaptation du protocole de détermination de l'activité antimicrobienne pour des textiles

1. Choix et caractérisation des souches bactériennes 141
1.1. Choix des souches bactériennes 141
1.2. Détermination des propriétés de surface des bactéries par la méthode MATS 144
1.3. Détermination des concentrations minimales inhibitrices (CMI) du PHMB vis-à-vis de 3 souches bactériennes : *L. innocua* LRGIA 01, *S. aureus* méthi-R nosoco 3011, *P. aeruginosa* ATCC 15742 149
1.4. Etude de l'état physiologique de *Listeria innocua* LRGIA 01 après contact avec le PHMB en milieu liquide par microscopie à épifluorescence en présence de fluorochromes 151

2. Protocole de détermination de l'activité antimicrobienne : adaptation de la norme ISO 20743/2005 157
2.1. Présentation de la norme 158
2.2. Mise au point du protocole de détermination de l'activité antimicrobienne sur la base de la norme ISO 20743/2005 159
2.2.1. Conditions de dépôt des micro-organismes sur les textiles 159
2.2.2. Méthode de décrochage des micro-organismes des textiles 160
2.3. Etude de la croissance de différentes souches sur textiles témoin non traités 163
2.3.1. Etude de la croissance de *L. innocua* LRGIA 01, *S. aureus* méthi-R nosoco 3011, *P. aeruginosa* ATCC 15742 et *L. monocytogenes* AER 102 sur textiles témoins (C/P et P/C blancs) 164
2.3.2. Etude de la croissance de *L. innocua* LRGIA 01 et *P. aeruginosa* ATCC 15742 sur textiles témoins C/P blancs en conditions d'humidités différentes 167

3. Conclusion 171

4. Références bibliographiques 172

Chapitre 3 : Choix des micro-organismes cibles et adaptation du protocole de détermination de l'activité antimicrobienne pour des textiles

Ce chapitre fait office de chapitre « préliminaire » qui présentera le choix et la caractérisation des micro-organismes dans un premier temps et les protocoles mis au point dans un second temps. La première partie de ce chapitre sera consacrée au choix des souches bactériennes sélectionnées dans le cadre du projet Actiprotex et à la caractérisation de surface de ces dernières par la méthode MATS (Microbial Adhesion To Solvents). Une étude plus spécifique du PHMB (principale molécule utilisée dans le cadre de ce travail de thèse) sera réalisée avec la détermination de la CMI des 4 micro-organismes considérés et l'étude de l'état physiologique d'un de ces micro-organismes (*L. innocua* LRGIA 01) après contact avec le PHMB en milieu liquide grâce à la microscopie à épifluorescence en présence de fluorochromes. La caractérisation des micro-organismes a été réalisée dans l'objectif de mieux comprendre leurs adhésion aux textiles lors des chapitre suivants.

Dans une seconde partie, l'adaptation de la norme ISO 20743/2005 sera présentée avec les différents tests mis en place afin d'ajuster les modes opératoires. La méthode de dépôt des micro-organismes sur les textiles mais aussi la méthode de décrochage de ces derniers pour réaliser un dénombrement afin d'évaluer le comportement des micro-organismes sur les textiles antimicrobiens et témoins (sans traitement de dépôt d'agents antimicrobiens à leur surface) ont été mises au point.

Dans cette partie, les cinétiques de croissance sur textiles témoins non traités des souches bactériennes considérées dans le cadre de ce travail seront présentées mais également un suivi de croissance de *L. innocua* LRGIA 01 et *P. aeruginosa* ATCC 15742 sur textiles témoins à différentes humidités relatives.

1. Choix et caractérisation des souches bactériennes

Le choix des micro-organismes dans le projet Actiprotex a été fait en collaboration avec les différents partenaires du projet dans le but d'avoir un panel de micro-organismes représentatif de plusieurs espèces bactériennes. Les espèces sélectionnées peuvent être notamment responsables de contaminations de produits ou d'accidents de fabrication en industries agro-alimentaires ou encore d'infections nosocomiales dans le secteur hospitalier. En effet, dans le cadre du projet, les deux domaines d'application des textiles à visée antimicrobienne sont l'industrie agro-alimentaire et le domaine hospitalier.

La caractérisation des propriétés de surface des cellules bactériennes de chacun des micro-organismes choisis a été réalisée par la méthode de MATS (Microbial Adhesion To Solvents) dans l'objectif d'évaluer la contribution de ces propriétés de surface des bactéries (hydrophobie, caractère donneur ou accepteur d'électrons) à leur adhésion sur différents supports présentant eux-mêmes des propriétés de surface variables comme les textiles. En effet, la caractérisation des propriétés physico-chimiques de surface des microorganismes est un critère essentiel pour la compréhension des interactions bactérie-substrat, dans notre cas bactérie-textile.

1.1. Choix des souches bactériennes

Les cinq micro-organismes retenus sont les suivants :

- *Listeria innocua* LRGIA01 ;
- *Listeria monocytogenes* AER102 ;
- *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 15742 ;
- *Staphylococcus aureus* résistant à la méthicilline nosoco 3011 ;
- *Escherichia coli* XL1 blue.

En 2008, 1 124 foyers de toxi-infections alimentaires collectives (TIAC) ont été déclarés en France, affectant 12 549 personnes, dont 5 sont décédées [1]. Il existe donc un réel risque de transmission de bactéries pathogènes par des aliments contaminés.

Listeria monocytogenes est un bacille à Gram positif qui est responsable d'infections humaines et animales, les listérioses. Les listérioses humaines sont principalement liées à

l'ingestion d'aliments contaminés. Le taux de létalité estimé pour les listérioses est de 20 à 30 %. Ainsi, bien que le nombre de cas soit faible, la létalité élevée due aux listérioses fait de leur surveillance et de leur contrôle un des objectifs principaux en industries agro-alimentaires. *L. monocytogenes* est retrouvée dans diverses catégories de produits alimentaires et est responsable de TIAC. Parmi ces produits on retrouve notamment les produits de la mer avec 13,9 % des cas, les aliments d'origine animale avec 13,8 % des cas, les produits carnés avec 11,9 % des cas, les œufs et ovoproduits avec 8,6 % des cas, suivis par les produits laitiers avec 2,5 % des cas en 2007 en France [1]. Cette bactérie peut être trouvée au niveau de l'instrumentation (les couteaux par exemple), sur les surfaces de travail, sur les produits avant transformation et une fois transformés. Ainsi, la capacité de colonisation des surfaces par cette bactérie (résistance importante de *L. monocytogenes* au froid et à des conditions hostiles) avec la formation de biofilms résistants au nettoyage sur ces matériaux constitue un facteur à l'origine de la contamination de produits alimentaires. Le choix s'est porté sur *L. innocua* du fait de ses caractères proches de *L. monocytogenes* tout en étant non pathogène d'où une utilisation plus aisée au laboratoire. La souche de *L. monocytogenes* AER 102 sélectionnée ainsi que la souche de *L. innocua* LRGIA 01 proviennent toutes deux d'un environnent laitier.

P. aeruginosa (ou bacille pyocyanique) est une bactérie à Gram négatif du genre *Pseudomonas*, aérobie ubiquitaire de l'environnement (saprophyte de l'eau, des sols humides et des végétaux). Elle est responsable d'infections nosocomiales sévères survenant fréquemment chez des patients ayant des défenses immunitaires diminuées. L'émergence de nouveaux mécanismes de résistance, comme celui impliquant la carbapénémase VIM-2 (une enzyme appartenant à la famille des β lactamases) par exemple [2], rend les infections nosocomiales à *P. aeruginosa* de plus en plus difficiles à traiter. En effet, Carmeli *et al.* ont mis en évidence [3] que l'apparition de résistance chez cette souche était associée à une augmentation 3 fois plus importante de la mortalité par rapport à une souche non résistante. Par ailleurs, les infections à *P. aeruginosa* sont associées à une augmentation de la morbidité, de la mortalité et des coûts de prise en charge. De 2002 à 2005, la progression annuelle du nombre de signalements d'infections nosocomiales à *P. aeruginosa* était en constante augmentation passant de 58 à 80 cas par an en France [4]. Sur les 3 520 signalements reçus sur cette période, 332 (9 %) étaient des signalements d'infections nosocomiales à *P. aeruginosa*. Les infections respiratoires (29 %), les infections urinaires (21 %) et les bactériémies (20 %) représentaient près des trois quarts des localisations infectieuses. La

létalité associée à ces infections signalées était élevée (21 %). Un quart (24 %) des micro-organismes documentés par un antibiogramme étaient résistantes à tous les antibiotiques recommandés (ceftazidime, céfépime, ticarcilline/acide clavulanique, imipenème, ciprofloxacine) pour le traitement des infections nosocomiales à *P. aeruginosa* (sauf la colistine). Les infections nosocomiales engendrées par ce micro-organisme sont donc considérablement importantes, difficiles à traiter et le contrôle de cette souche paraît donc être une priorité dans le milieu hospitalier. Cette bactérie est également retrouvée au sein de biofilms notamment en industries agro-alimentaires où elle peut être responsable de contaminations des produits. En effet, elle se retrouve sous forme de biofilms où elle résiste plus facilement à la désinfection des surfaces lors des phases de nettoyage. Il en est de même dans le domaine hospitalier où les biofilms de *P. aeruginosa* sont capables de s'installer au niveau des cathéters par exemple et où ils apparaissent plus résistants. La souche de *P. aeruginosa* ATCC 15742 employée dans le cadre de ce travail est une souche provenant d'un environnement hospitalier.

Staphylococcus aureus résistant à la méthicilline (SARM) est une bactérie multirésistante aux antibiotiques et est fréquemment en cause dans les infections nosocomiales. Selon les dernières données nationales disponibles, la prévalence des patients infectés à SARM était de 0,39 % en 2006, soit 8 % des patients avec une infection nosocomiale [5]. L'incidence des infections à SARM dans les établissements de santé Français était de 0,48 cas pour 1 000 journées d'hospitalisation complète en 2007. La proportion de résistance à la méthicilline parmi les *S. aureus* isolés d'infections invasives était de 24 % en 2008 selon les données sur la résistance bactérienne aux antibiotiques de l'Observatoire National de l'Epidémiologie transmises au réseau européen [6]. Il s'agit une fois de plus d'un germe ayant un impact important dans le domaine hospitalier. Il est également retrouvé en industries agro-alimentaires où il peut être responsable de TIAC en produisant une entérotoxine. Dans le cadre de ce travail, la souche utilisée est une souche de *S. aureus* méthi-R nosoco 3011 provenant du milieu hospitalier.

Escherichia coli est une bactérie intestinale des mammifères très commune chez l'être humain. A ce titre, *E. coli* est dénombrée dans les aliments comme indicateur de contamination fécale : sa présence est un marqueur de l'éventuelle contamination de l'aliment par d'autres bactéries d'origine digestive qui pourraient être pathogènes. Certaines souches d'*E. coli* peuvent être pathogènes entraînant alors des gastro-entérites, infections urinaires,

méningites, ou septicémies. Parmi l'ensemble des souches d'*E. coli*, seules quelques souches sont susceptibles d'être pathogènes pour l'homme. C'est le cas des souches d'*E. coli* entérohémorragiques, dont la plus connue est *E. coli* O157:H7. Elles peuvent être responsables d'infections nosocomiales et la prévalence des infections nosocomiales à *E. Coli* a augmenté d'un tiers (34 %) en 2006 par rapport à l'année 2001, essentiellement du fait des infections urinaires associées [7]. Dans le cadre de ce travail, une souche de collection, *E. coli* XL1 blue a été utilisée. Cette souche n'est pas pathogène pour l'homme mais reste un modèle d'étude.

Dans la partie suivante, les micro-organismes retenus ont été caractérisés pour leurs caractères de surface par la méthode MATS.

1.2. Détermination des propriétés de surface des bactéries par la méthode MATS

Pour la détermination des propriétés de surface, seuls 4 des micro-organismes ont été testés : *L. innocua* LRGIA 01, *L. monocytogenes* AER 102, *S. aureus* méthi-R nosoco 3011 et *P. aeruginosa* ATCC 15742. En effet, ces 4 micro-organismes correspondent à des micro-organismes retrouvés dans un environnement industriel du secteur laitier pour les 2 premières et hospitalier pour les 2 suivantes. Ces 4 souches ont été utilisées par la suite pour la détermination des activités antimicrobiennes de textiles.

La caractérisation des propriétés physico-chimiques de surface des micro-organismes est essentielle pour comprendre les interactions bactérie-substrat. En effet, les propriétés de surface des micro-organismes jouent un rôle important dans les interactions entre les bactéries et l'environnement et ce plus particulièrement dans le cas de l'adhésion [8]. Il a été montré par Takahashi *et al.* [9] que l'hydrophobicité de surface jouait un rôle important dans la formation de biofilms de *L. monocytogenes* sur du PVC. Dans l'objectif de mieux comprendre l'adhésion des micro-organismes au support textile, les caractères hydrophile/hydrophobe et acide/base au sens de Lewis des 4 souches sélectionnées ont été déterminés à l'aide de la technique MATS (Microbial Adhesion To Solvents).

Les propriétés de surface des bactéries (caractère hydrophile/hydrophobe et donneur ou accepteur d'électrons) ont été déterminées selon une adaptation de la méthode MATS décrite par Bellon-Fontaine *et al.* [8]. Cette méthode est basée sur l'étude de l'affinité des micro-

organismes pour 4 solvants de propriétés physico-chimiques différentes et connues (cf. matériels et méthodes paragraphe 1.2.2).

Quatre solvants sont employés : deux solvants polaires et deux solvants apolaires de façon à disposer de deux couples de solvants « polaire-apolaire ». Les solvants polaires peuvent être accepteurs d'électrons (acides au sens de Lewis) ou donneurs d'électrons (basiques au sens de Lewis), mais les couples solvants « polaire-apolaire » doivent avoir la même énergie libre de surface liée au caractère de Lifshitz - Van der Waals. Pour les solvants utilisés dans cette étude, il faut noter que la composante de Lifshitz - Van der Waals de l'énergie de surface est à peu près égale pour le chloroforme et l'hexadécane d'une part (environ 27) ainsi que pour l'héxane et l'éther d'autre part (environ 18). Les résultats des pourcentages d'affinité de chaque souche testée pour chacun des 4 solvants utilisés pour la méthode MATS sont présentés dans la figure 3-1.

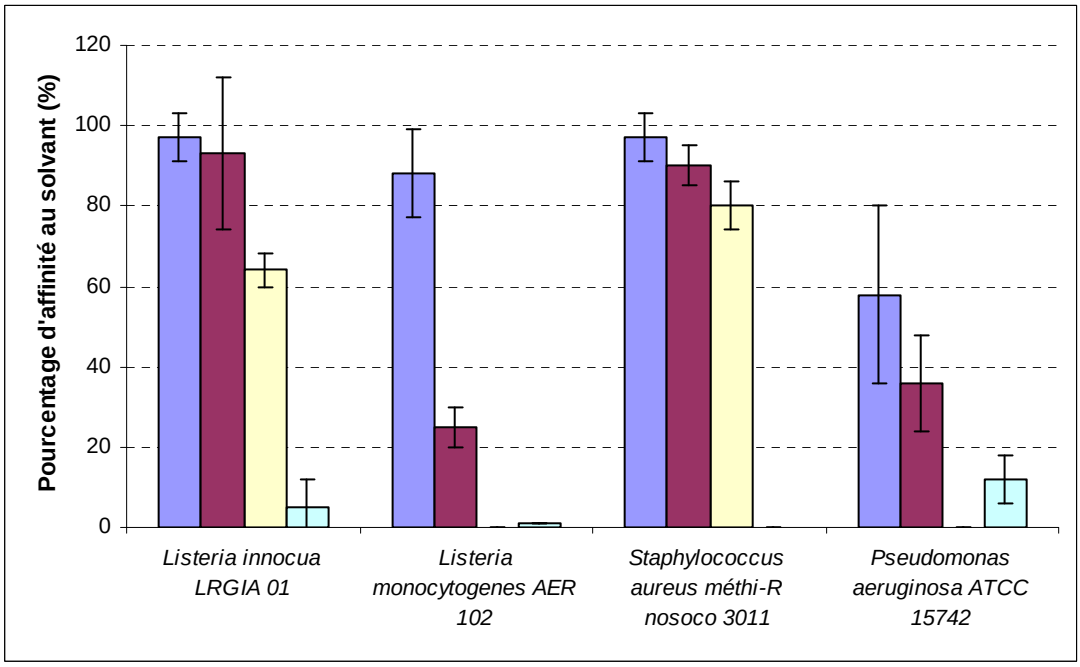


Figure 3-1 : Pourcentage d'affinité aux solvants : chloroforme (bleu), hexadécane (violet), hexane (jaune) et éther (vert) de 4 des souches étudiées

Le caractère base de Lewis (électron-donneur) du micro-organisme est déterminé par la comparaison des affinités avec le chloroforme et l'hexadécane.

Le caractère acide de Lewis (électron-accepteur) du micro-organisme est déterminé par la comparaison des affinités avec l'éther et l'hexane.

Le caractère hydrophile/hydrophobe du micro-organisme est déterminé par son affinité pour l'hexane et l'hexadécane.

Caractère hydrophobe/hydrophile

L'hydrophobicité se traduit par le pourcentage de cellules ayant adhéré aux deux solvants apolaires l'hexadécane et l'hexane [10]. La surface des cellules est considérée hydrophobe lorsque le pourcentage d'affinité pour ces 2 solvants est supérieur à 50 % et relativement hydrophile dans le cas contraire.

D'après la figure 3-1, on peut voir que *L. innocua* LRGIA 01, *S. aureus* méthi-R nosoco 3011 ont toutes deux une affinité supérieure à 50 % pour ces 2 solvants, avec 93 ± 19 % et 64 ± 4 % respectivement pour l'hexadécane et l'hexane pour *L. innocua* LRGIA 01 et 90 ± 5 % et 80 ± 6 % respectivement pour l'hexadécane et l'héxane pour *S. aureus* méthi-R nosoco 3011. Les pourcentages d'affinité de ces 2 micro-organismes étant supérieurs à 50 % pour l'hexadécane et l'hexane, ces 2 micro-organismes sont donc considérés comme hydrophobes.

Pour *P. aeruginosa* ATCC 15742 et *L. monocytogenes* AER 102, on remarque qu'elles possèdent toutes deux une affinité très faible pour ces 2 solvants avec 36 ± 12 % et 0 % respectivement pour l'hexadécane et l'hexane pour *P. aeruginosa* ATCC 15742 et 25 ± 5 % et 0 % pour les 2 mêmes solvants pour *L. monocytogenes* AER 102. Ces 2 souches sont donc considérées comme relativement hydrophiles.

La différence d'hydrophobicité entre ces bactéries peut être due à une différence de composition élémentaire, notamment au niveau des rapports N/C et O/C de la membrane. En effet, plusieurs auteurs [11-13] ont mis en évidence en se basant sur la technique XPS (spectroscopie de photoélectrons X), que l'hydrophobicité peut augmenter avec le taux de protéines membranaires (déduit du rapport N/C par méthode XPS) présentes à la surface de la bactérie, et diminuer par la présence de composés de nature polysaccharidique (représentés par le rapport O/C). Ce type de données a également été confirmé par Al-Qadiri *et al.* [14] par spectroscopie infrarouge. Ces auteurs ont observé des différences notables entre le spectre correspondant à *E. coli* et celui de *P. aeruginosa*. Les différences observées se trouvent notamment au niveau des bandes amide I et amide II représentées respectivement par les pics à 1650 cm^{-1} et 1540 cm^{-1} qui renseignent sur la composition en protéines au travers de leurs structures secondaires, au niveau des bandes correspondant aux acides nucléiques (ADN et ARN) visibles *via* les vibrations du groupement phosphodiester (1242 et 1080 cm^{-1}) et au niveau des bandes correspondant aux vibrations intra- et inter- cycliques des polysaccharides dans la région du spectre comprise entre 1050 cm^{-1} et 950 cm^{-1}. Ceci vient confirmer que les constituants de leur membrane cellulaire ne sont pas structuralement identiques, ceci pouvant expliquer des différences au niveau des caractères de surface d'une souche à l'autre.

Caractère acide (électron-accepteur) / basique (électron-donneur)

Le caractère base de Lewis (électron-donneur) du micro-organisme est déterminé par la comparaison des affinités avec le chloroforme et l'hexadécane et le caractère acide de Lewis (électron-accepteur) du micro-organisme est déterminé par la comparaison des affinités avec l'éther et l'hexane [15].

La détermination du caractère donneur/accepteur des électrons est basée sur la comparaison de l'affinité des cellules pour les solvants polaires et apolaires qui constituent chaque couple de solvants [8]. La différence entre le pourcentage d'adhésion au chloroforme (acide, accepteur d'électrons) et celui à l'hexadécane (apolaire) permet d'évaluer le caractère donneur d'électrons des cellules microbiennes ; si cette différence est positive, le caractère des souches étudiées est jugé basique. La différence entre le pourcentage d'adhésion au diéthyle éther (basique, donneur d'électrons) et celui d'hexane (apolaire) permet d'évaluer le caractère accepteur d'électrons des cellules microbiennes ; si cette différence est positive, le caractère des souches étudiées est jugé acide.

Pour les 4 micro-organismes étudiés, une plus forte affinité pour le chloroforme que pour l'hexadécane, plus marquée pour les souches de *L. monocytogenes* AER 102 et *P. aeruginosa* ATCC 15742, montre qu'elles sont toutes les 4 donneuses d'électrons. Ceci est confirmé par la comparaison du pourcentage d'affinité pour l'éther et l'hexane. En effet, une plus forte affinité pour l'hexane montre que les souches testées sont donneuses d'électrons avec un pourcentage d'affinité pour l'éther et l'hexane négligeable pour *L. monocytogenes* AER 102 et *P. aeruginosa* ATCC 15742. Ces 4 micro-organismes possèdent donc un caractère donneur d'électrons et sont considérés comme basiques au sens de Lewis.

Il est donc nécessaire d'utiliser 2 couples de solvants permettant pour obtenir une information complète pour toutes les souches testées même dans le cas où l'affinité est très faible pour un solvant, comme notamment pour *L. monocytogenes* AER 102 et *P. aeruginosa* ATCC 15742.

Le caractère électron-donneur d'une souche peut être attribué à la présence de groupements basiques exposés à la surface cellulaire, comme les groupements carboxylate (COO^-), phosphate (PO_4^-) des phospholipides, les lipoprotéines et les lipopolysaccharides ou les fonctions amines (NH_2) [8, 16, 17]. Les groupements carboxylate et phosphate joueraient donc un rôle prédominant dans la détermination de la charge négative de la surface cellulaire.

On peut donc récapituler les résultats de la méthode de MATS pour la détermination des propriétés de surface des bactéries comme suit :

- *L. innocua* LRGIA 01 et *S. aureus* méthi-R nosoco 3011 sont des souches hydrophobes avec une surface basique donneuse d'électrons. Hamadi et Lattrache [15] ont montré que *S. aureus* ATCC 25923 avait une forte affinité pour l'hexadécane ce qui montre son caractère hydrophobe mais également son caractère fortement donneur d'électrons.

- *L. monocytogenes* AER102 et *P. aeruginosa* ATCC 15742 sont des souches plutôt hydrophiles et leur surface est de type basique donneuse d'électrons ce qui est en accord avec Briandet *et al.* [16]. En effet, ces auteurs ont montré les différences de propriétés de surface d'une souche de *L. monocytogenes* Scott A en fonction des conditions de culture. Dans cet article, les conditions de culture qui se rapprochent le plus de celles utilisées dans notre étude sont une culture des cellules de *L. monocytogenes* à 37°C en bouillon cœur cervelle. Dans ces conditions, la souche de *L. monocytogenes* Scott A présente un caractère plutôt hydrophile ce qui semble être cohérent avec les résultats obtenus dans le cadre de notre étude.

Les caractères hydrophiles/hydrophobes et donneur/accepteur d'électrons de chaque souche sont récapitulés dans le tableau 3-1.

Tableau 3-1 : Récapitulatif des propriétés de surface de 4 souches testées

	Caractère hydrophile/hydrophobe	**Caractère donneur/accepteur d'électrons**
***Staphylococcus aureus* NOSOCO 3011**	hydrophobe	donneuse
***Listeria innocua* LRGIA 01**	hydrophobe	donneuse
***Pseudomonas aeruginosa* ATCC 15742**	hydrophile	donneuse
***Listeria monocytogenes* AER 102**	hydrophile	donneuse

Plusieurs auteurs [8,16,18] associent au caractère donneur d'électrons, l'importance des interactions de Lewis acide-base lors de l'adhérence de la bactérie au substrat. Hamadi et Lattrache [15] ont mis en évidence que toutes les souches testées dans leur étude (*Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Bacillus subtilis* ILP 142B, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 et 4 souches d'*Escherichia coli* HB101, AL52, O128B12 et ATCC 25922) étaient donneuses d'électrons. Pour expliquer cette propriété donneuse d'électrons déduite de la méthode MATS, des analyses par XPS ont révélé que le ratio protéines/polysaccharides de la membrane bactérienne pouvait être à l'origine de cette propriété.

Dans une revue de Doyle [19], l'auteur recense les articles qui associent la capacité de certains micro-organismes notamment *E. coli* et *P. aeruginosa* a adhérer à des surfaces avec l'hydrophobicité de surface de ces derniers. Dans le cas des Staphylocoques, il existe divers

exemples impliquant le caractère hydrophobe de surface de *S. aureus* et *S. epidermidis* dans l'adhésion à différents substrats. Des conditions de croissance en présence de sang notamment entraînent une augmentation du caractère hydrophobe et une augmentation de l'adhésion de *S. aureus.* Selon Doyle [19], les sites hydrophobes libres à la surface des bactéries permettent des interactions avec les sites hydrophobes du substrat : une bactérie hydrophobe aura donc tendance à adhérer plus facilement à une surface hydrophobe.

L'architecture et la nature des groupements chimiques présents à la surface des cellules bactériennes déterminent les propriétés physico-chimiques de surface des micro-organismes. Ainsi, la faible affinité de *P. aeruginosa* ATCC 15742 pour les solvants apolaires pourrait être attribuée à la partie hydrophile des lipopolysaccharides présents à la surface de bactéries à Gram négatif alors que le faible caractère hydrophile des bactéries à Gram positif pourrait être relié aux acides lipotéichoïques qui sont des macromolécules hydrophobes ancrées dans leur paroi. Cette étude nous permettra peut être ainsi d'interpréter d'éventuelles différences d'adhésion au support textile de ces 4 souches.

Dans un second temps et dans le but de caractériser les souches sélectionnées dans le cadre de ce travail, la Concentration Minimale Inhibitrice (CMI) du PHMB, une molécule choisie dans le projet Actiprotex a été déterminée.

1.3. Détermination des concentrations minimales inhibitrices (CMI) du PHMB vis-à-vis de 3 souches bactériennes : *L. innocua* LRGIA 01, *S. aureus* méthi-R nosoco 3011, *P. aeruginosa* ATCC 15742

Afin de connaître le comportement de 3 des 4 souches testées selon le protocole de MATS vis-à-vis du PHMB, molécule antimicrobienne utilisée pour fonctionnaliser les textiles par imprégnation, les CMI de cette molécule ont été déterminées. Parmi les 4 souches testées selon le protocole MATS, 3 étaient des bactéries à Gram positif (*L. innocua* LRGIA 01, *L. monocytogenes* AER 102 et *S. aureus* méthi-R nosoco 3011) et une était une bactérie à Gram négatif (*P. aeruginosa* ATCC 15742). Nous avons donc choisi de sélectionner une des 2 souches de *Listeria* : *L. innocua* LRGIA 01, un coque à Gram positif : *S. aureus* méthi-R nosoco 3011 et un bacille à Gram négatif : *P. aeruginosa* ATCC 15742 afin de disposer de 3 souches différentes. Le choix d'avoir 2 bactéries à Gram positif et une bactérie à Gram négatif repose sur le fait que ce sont plus couramment des bactéries à Gram positif qui sont prélevées dans les industries agro-alimentaires. Ces souches seront réutilisées par la suite pour l'étude de leur physiologie après contact avec un textile traité au PHMB.

Seule la CMI du PHMB a été déterminée car la CMI de l'argent dans ces conditions n'a pas pu être déterminée. En effet, pour les traitements sol-gel et plasma, l'agent antimicrobien utilisé est l'argent mais utilisé sous forme Ag^0 qui ne peut pas être préparé sous forme de solution et l'argent utilisé pour le traitement sol-gel est en solution dans l'éthanol. La détermination des CMI de l'argent n'avait donc pas d'intérêt puisque la forme déposée sur textile était forcément différente de celle qui était disponible pour la détermination de la CMI.

La détermination de la Concentration Minimale Inhibitrice (CMI) en milieu gélosé permet la caractérisation de l'activité intrinsèque du PHMB. Rappelons que dans ce cas, la CMI a été déterminée en milieu gélosé, car ce sont les conditions qui se rapprochent le plus des déterminations d'activité antimicrobienne sur textiles. En effet, le fait de mettre les bactéries en contact avec le PHMB par l'intermédiaire d'un milieu gélosé peut être comparé à un contact avec un textile traité au PHMB, de façon plus proche qu'une détermination en milieu liquide.
Pour cela, les 3 souches bactériennes ont été testées sur des milieux TSA (Tryptone Soy Agar) dans lesquels des concentrations variables en PHMB ont été incorporées et l'incubation a été faite pendant 24 h. Les résultats sont regroupés dans le tableau 3-2.

Tableau 3-2 : CMI du PHMB vis-à-vis de *L. innocua* LRGIA 01, *S. aureus* nosoco 3011 et *P. aeruginosa* ATCC 15742. Les CMI ont été déterminées en milieu gélosé et sont exprimées en mg/L de PHMB.

Souches	CMI en mg/L
***Listeria innocua* LRGIA 01**	20,0
***Staphylococcus aureus* NOSOCO 3011**	12,5
***Pseudomonas aeruginosa* ATCC 15742**	125,0

Comme le montrent les résultats obtenus, le PHMB est actif à faible concentration sur *L. innocua* LRGIA 01 et *S. aureus* méthi-R nosoco 3011 (respectivement 20,0 et 12,5 mg/L) alors qu'il faut une concentration environ 10 fois plus élevée pour arriver à détruire *P. aeruginosa* ATCC 15742 (125,0 mg/L). Cette dernière semble donc être la souche la plus résistante à cette molécule avec une CMI égale à 125,0 mg/L, *S. aureus* nosoco 3011 la plus sensible avec une CMI égale à 12,5 mg/L, et *L. innocua* LRGIA 01 apparaît intermédiaire avec une CMI égale à 20,0 mg/L.

Le PHMB a pour cible les membranes (cytoplasmique et externe) des bactéries. Cet agent antimicrobien forme des domaines avec les phospholipides acides de la membrane entraînant une désorganisation des membranes et une fuite cellulaire conduisant à la mort.

Il apparaît ici que les cellules ayant une hydrophobie de surface plus faible comme *P. aeruginosa* sont plus résistantes, résistance qui peut être due à de possibles interactions répulsives à proximité des sites d'adsorption du PHMB. En effet, Le PHMB est une molécule cationique qui va interagir avec les groupements anioniques de la membrane externe des bactéries à Gram négatif, principalement avec les phospholipides acides [20]. Par conséquent, une modification de la composition lipidique de la membrane externe peut entraîner une évolution de l'adsorption des molécules de PHMB à la surface des bactéries. La membrane externe chargée négativement est stabilisée par la présence d'ions bivalents tels que les ions Mg^{2+} et Ca^{2+}. Ces ions sont associés aux acides téichoïques et aux polysaccharides des bactéries à Gram positif et aux liposaccharides des bactéries à Gram négatif. Les agents antimicrobiens cationiques tels que le PHMB ont donc besoin d'une forte charge positive associée à une région hydrophobe pour interagir avec la membrane cytoplasmique des bactéries. Il s'avère que de nombreuses souches retrouvées en industrie agro-alimentaire sont des souches à Gram positif. Il semblerait que ces souches soient plus sensibles à l'action du PHMB même pour *S. aureus* méthi-R nosoco 3011 qui est une souche résistante à la méthicilline. Cette molécule posséderait donc un certain intérêt à être employé en industrie agro-alimentaire.

Pour étudier l'effet du PHMB, une étude de l'état physiologique a été réalisée à l'aide de colorants de viabilité sur une de ces 3 souches : *L. innocua* LRGIA 01.

1.4. Etude de l'état physiologique de *Listeria innocua* LRGIA 01 après contact avec le PHMB en milieu liquide par microscopie à épifluorescence en présence de fluorochromes

Dans le paragraphe précédent, l'activité intrinsèque du PHMB en milieu gélosé vis-à-vis de 3 micro-organismes (*L. innocua* LRGIA 01, *S. aureus* méthi-R NOSOCO 3011 et *P. aeruginosa* ATCC15742) a été évaluée. Le comportement des bactéries en milieu gélosé n'est pas le même que celui en milieu liquide comme l'ont montré Schvartzman *et al.* [21] dans une étude comparant la croissance de *L. monocytogenes* en milieu de culture liquide TSB, dans du lait ou sur du fromage. En effet, ces auteurs ont mis en évidence que la

croissance sur ces 3 types de milieu présentait des différences considérables quel que soit le taux d'inoculation (bas ou élevé) : les milieux liquides tels que le lait ou le milieu de culture présentaient des conditions meilleures pour la croissance de *L. monocytogenes*. Cette remarque pourrait être expliquée par une moins bonne répartition des micro-organismes à travers la matrice fromagère. Ceci pourrait être assimilable à la croissance en milieu gélosé et la croissance sur textile en comparaison de la croissance en milieu liquide.

Il parait donc intéressant d'évaluer l'état physiologique des cellules après contact avec le PHMB en milieu liquide avant d'évaluer son action une fois fixé sur textile (cf. chapitre 5).
Différents fluorochromes sont commercialisés pour déterminer la viabilité des micro-organismes par microscopie à épifluorescence. Sachant que le PHMB est un agent antimicrobien qui agit sur l'intégrité de la membrane, nous avons choisi d'utiliser un marqueur de viabilité qui ne pénètre que dans les micro-organismes dont la membrane cytoplasmique est désorganisée. Le kit Live/Dead® BacLight™ (Molecular Probes, Invitrogen, France) permet la distinction entre les cellules à la membrane plasmique endommagée et les cellules ayant une membrane intacte.

Pour l'étude de l'état physiologique de cellules après contact avec le PHMB en milieu liquide, seule la souche de *L. innocua* LRGIA 01 a été retenue. *L. innocua* est couramment utilisée par le LRGIA et rencontrée régulièrement dans la littérature, elle sera considérée comme le modèle d'étude pour la caractérisation du mode d'action du PHMB. Elle sera utilisée comme un modèle « non pathogène » de *L. monocytogenes*.

Un suivi de croissance de *L. innocua* LRGIA 01 en BCC a été effectué et à chaque phase de croissance, un échantillon de cellules a été prélevé et coloré à l'aide du kit Live/Dead® BacLight™ (Invitrogen, France). Il faut rappeler que la coloration des cellules dépend de leur état de viabilité. En effet les cellules viables apparaissent vertes et les cellules non viables apparaissent rouges. La corrélation entre couleur observée et état de viabilité des cellules peut donc être faite et les résultats apparaissent dans la figure 3-2.

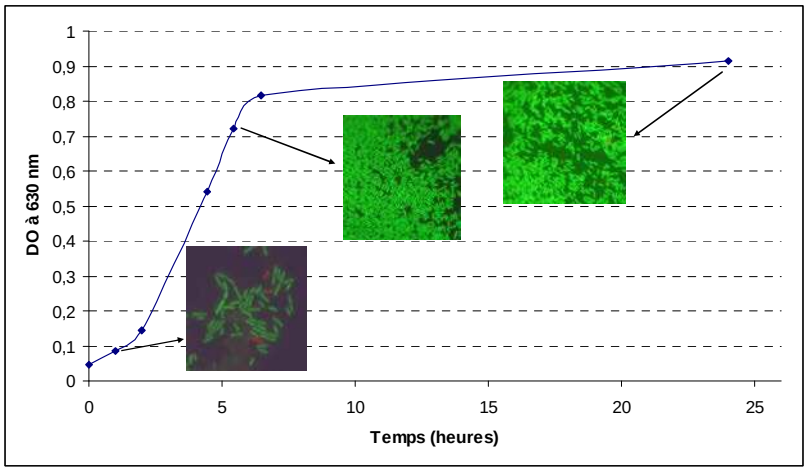


Figure 3-2 : Suivi de croissance de *Listeria innocua* LRGIA 01 en Bouillon Cœur Cervelle (BCC) à 30°C et suivi de l'état physiologique par coloration avec le kit Live/Dead® Baclight™.

Les différentes phases de croissance de *L. innocua* LRGIA 01 peuvent être distinguées sur la figure 3-2 : la phase de latence entre 0 et 1 h, une phase d'accélération entre 1 et 2 h, une phase de croissance exponentielle entre 2 et 7 h, puis une phase stationnaire à partir de 7 h.

Des clichés des cellules ont été réalisés après coloration pour chacune des phases de croissance. En phase de latence, la majorité des cellules sont vertes avec quelques cellules rouges. Quelques cellules rouges sont retrouvées lors de la phase stationnaire en parallèle de nombreuses cellules vertes. En revanche, seules des cellules vertes sont observées lors de la phase exponentielle. Il faut rappeler que les cellules vertes sont des cellules viables dont la membrane est intacte et que les cellules rouges sont des cellules non viables dont la membrane a été altérée.

Berney *et al.* [22] ont démontré que les propriétés de coloration sont dépendantes du stade physiologique de la bactérie : en effet, pendant la phase exponentielle, les cellules d'*Escherichia coli* sont plus vertes que pendant la phase de latence. Les cellules de la phase exponentielle correspondent à des cellules en division cellulaire et donc physiologiquement actives. Ceci est confirmé dans notre cas pour la culture de *L. innocua* LRGIA01 en BCC. Grâce à ces résultats, il a été montré que les cellules vertes représentent bien des cellules actives lors d'une croissance « normale » de *L. innocua* LRGIA 01.

La CMI du PHMB pour inactiver *L. innocua* LRGIA 01 est de 20 mg/L, par conséquent pour étudier l'effet du PHMB sur *L. innocua* LRGIA 01 en milieu liquide, nous avons retenu 3 concentrations : 5 mg/L, 20 mg/L et 40 mg/L.

Une étude de l'état physiologique des cellules de *L. innocua* (10^8 UFC/mL correspondant à une DO de 0,2 à 630 nm) en phase exponentielle a été réalisée après contact avec du PHMB aux 3 concentrations (5 et 20 et 40 mg/L) en milieu liquide afin de déterminer si ces concentrations de PHMB ont un effet sur la membrane de *L. innocua* LRGIA 01. En parallèle, un témoin sans PHMB a été réalisé et coloré de la même façon. Des colorations ont été ensuite été réalisées au moment de la mise en contact et après 6 et 24 h d'incubation à 30°C (les résultats sont présentés dans la figure 3-3). Cette étude a pour but de définir l'action du PHMB sur la membrane des cellules de *L. innocua* LRGIA 01 à des concentrations plus ou moins élevées.

La figure 3-3 représente les cellules de *L. innocua* LRGIA 01 après marquage par les fluorochromes du kit Live/Dead® Baclight™ après différents temps de contact avec 3 concentrations en PHMB (5, 20 et 40 mg/L) en milieu liquide et un témoin constitué d'une suspension cellulaire de *L. innocua* LRGIA 01 sans PHMB est également présenté. Ce marquage par les fluorochromes a permis d'apprécier l'état physiologique des cellules, plus précisément leur viabilité et leur intégrité membranaire. Avant d'être mises en contact avec le PHMB, les cellules utilisées étaient en phase exponentielle de croissance.

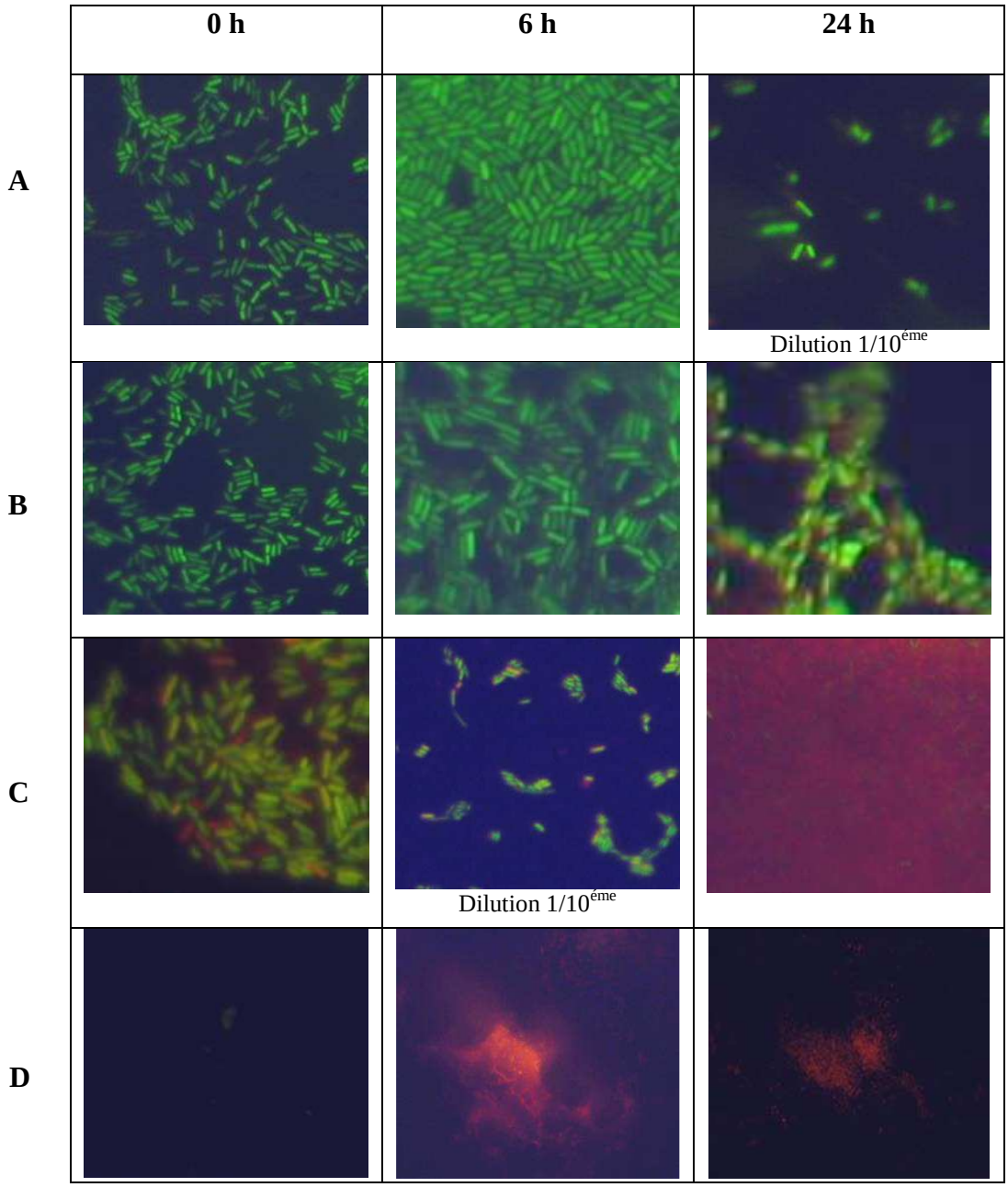


Figure 3-3 : Clichés d'observations au microscope à épifluorescence de *Listeria innocua* LRGIA01 après contact avec 3 concentrations en PHMB : 5 (B), 20 (C) et 40 (D) mg/L et sans PHMB (A) immédiatement après le contact (0 h) et après 6 et 24 h (les bactéries étant colorées à l'aide du kit Live/Dead® Baclight™ avant toute observation au microscope à épifluorescence). Grossissement X 1000.

Des cellules viables ont été observées dans la suspension cellulaire sans PHMB (Figure 3-3 A) démontrant que les cellules sont vivantes en comparaison des expérimentations représentées par la figure 3-2. En effet, pour les cellules sans PHMB, toutes les cellules observées sont vertes.

Pour la concentration la plus faible (5 mg/L, Figure 3-3 B), des cellules vertes sont également observées entre 0 et 6 h et un mélange de cellules vertes et de cellules rouges est observé après 24 h de contact (estimation d'environ 20 % de cellules rouges et 80 % de cellules vertes). Ces observations montrent une activité antimicrobienne du PHMB à 24 h pour cette concentration car des cellules rouges sont observées alors que seulement des cellules vertes étaient observées dans le témoin à 24 h. Une concentration plus faible que la CMI pourrait donc causer des dommages au niveau de la membrane de la cellule après 24h de contact.

Pour la CMI, (20 mg/L, Figure 3-3 C), un mélange de cellules vertes et de cellules rouges est observé immédiatement après la mise en contact des cellules avec le PHMB et une diminution du nombre de cellules observé sur les champs a également été mise en évidence en comparaison du témoin et des cellules traitées avec une concentration en PHMB deux fois plus faible. Cette diminution, après 6 h de contact, prouve que certaines cellules ont été lysées. Après 24 h de contact, une majorité de cellules rouges a été observée ce qui indique que le PHMB à la CMI entraîne des dommages au niveau de la membrane des cellules de *L. innocua* LRGIA 01 puisque le kit Live/Dead® Baclight™ permet de mettre en évidence des perturbations au niveau de la membrane des bactéries.

Pour la concentration la plus forte (40 mg/L, Figure 3-3 D), aucune cellule n'a pu être observée dès les premiers temps de la mise en contact résultant d'une lyse complète des cellules en contact avec le PHMB à cette concentration. Un fond légèrement rouge peut être observé, probablement causé par un amas de débris cellulaires.

Dans la littérature, le PHMB est connu pour créer des pores dans la membrane plasmique des bactéries [23]. Ces expériences montrent que l'action du PHMB vis-à-vis de *L. innocua* LRGIA 01 implique la membrane cytoplasmique en tant que cible de l'effet bactéricide. Les dommages membranaires et la perméabilisation des cellules causés par le PHMB [20,24,25] sont responsables de l'entrée de l'iodure de propidium dans la cellule entraînant une coloration rouge de la cellule. En effet, Mc Donnel et Russel [20] ont montré que le PHMB provoquait la formation de « domaines » au niveau des phospholipides acides de la membrane ce qui entraînerait donc des perturbations au niveau de la membrane interne. Ceci a été confirmé par Moore *et al.* [24] et Kirker *et al.* [25]. Ces « domaines » provoquent l'entrée de l'iodure de propidium dans les cellules d'où leur coloration rouge.

Il existe peu d'exemples dans la littérature scientifique qui associent le PHMB à la

microscopie à épifluorescence pour l'étude de l'état physiologique de cellules bactériennes. Il est pourtant important de connaître la viabilité des cellules après contact avec un agent antimicrobien notamment pour la mise en évidence de cellules viables mais non cultivables, c'est-à-dire de cellules ayant perdu la capacité de se développer sur milieu gélosé mais qui restent des cellules vivantes potentiellement capables de contaminer des produits alimentaires en cas de revivification les rendant à nouveau cultivables. La microscopie à épifluorescence a été utilisée par Tomas *et al.* [26] pour réaliser un suivi d'inhibition de la flore de la salive par la chlorhexidine *in vivo* après 7 h d'application. Dans cet article, les auteurs ont mis en évidence qu'il existe un biais entre un dénombrement sur milieu gélosé et l'évaluation de la viabilité. En effet, le dénombrement est basé sur le dénombrement d'un nombre d'unités formant colonie (UFC) et non sur un dénombrement de cellules de façon individuelle. L'épifluorescence parait donc être une méthode plus précise notamment pour le dénombrement de cellules après contact avec un antimicrobien.

La microscopie à épifluorescence nous a donc permis de mettre en évidence une action du PHMB au niveau de la membrane avec une perméabilisation de cette dernière mais les détails du mode d'action de cet agent antimicrobien restent encore à préciser. Il reste notamment à déterminer où se fixe cette molécule et comment elle perturbe la membrane des cellules jusqu'à leur lyse. Le mode d'action du PHMB au niveau de la membrane de *L. innocua* LRGIA 01 a également été étudié par spectrofluorimétrie et par spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier (IRTF) (résultats développés dans le chapitre 5).

Après le choix et la caractérisation des souches sélectionnées pour le projet Actiprotex et l'étude du PHMB en milieu liquide, la méthode de détermination de l'activité antimicrobienne des textiles est présentée à ce niveau pour permettre la compréhension des résultats présentés dans les chapitres 4 et 5.

2. Protocole de détermination de l'activité antimicrobienne : adaptation de la norme ISO 20743/2005

Dans le cadre du projet Actiprotex, plusieurs partenaires industriels ou laboratoires de recherche ont travaillé sur la mise au point de textiles antimicrobiens par des techniques de traitement de surface comme le traitement plasma, la méthodologie sol-gel ou encore l'utilisation d'un brevet mis au point par l'IFTH (complexation d'un agent cationique

antibactérien avec un agent anionique précipitant). Dans l'objectif de comparer les résultats obtenus dans les différents laboratoires, il était impératif d'utiliser la même méthodologie en adaptant la norme ISO 20743/2005 pour la détermination de l'activité antimicrobienne de textiles. Les différentes adaptations de la norme sont exposées notamment la technique d'ensemencement des textiles, de décrochage des bactéries après contact avec ce dernier mais aussi l'étude du comportement des souches à des humidités relatives de l'air ambiant différentes ou sur textiles 65 % coton - 35 % polyester (C/P) et 65 % polyester - 35 % coton (P/C) non traités.

2.1. Présentation de la norme

La norme ISO 20743/2005 a été utilisée dans le cadre de ce travail pour déterminer l'activité antimicrobienne de textiles fonctionnalisés par plasma, sol-gel ou imprégnation par bain. En effet, cette norme est largement utilisée par l'IFTH et dans un souci de comparaison, cette norme a également été utilisée au LRGIA. Cette norme a été adaptée dans le but de pouvoir la mettre en place au laboratoire mais aussi pour compléter l'information obtenue par l'activité antimicrobienne à 24 h notamment en réalisant une cinétique de croissance des souches sélectionnées dans l'étude sur les textiles témoins ou traités antimicrobiens au cours du temps.
La norme ISO 20743/2005 se décompose en 3 parties distinctes pour la détermination de l'activité antimicrobienne d'un textile que sont :

- La méthode par absorption, où la suspension bactérienne est directement inoculée sur les échantillons à tester ;
- La méthode par transfert, où la suspension est déposée à la surface d'un milieu gélosé et les bactéries sont ensuite transférées sur l'échantillon à tester ;
- La méthode par impression, où la suspension bactérienne est placée sur un filtre et imprimée sur l'échantillon à tester.

Les méthodes employées dans le cadre du projet Actiprotex sont celles par absorption et par transfert. Dans la méthode par absorption (la plus largement utilisée), l'inoculum est déposé directement à la surface d'une éprouvette (échantillon). Elle repose sur l'ensemencement par un volume donné d'inoculum standardisé (1.10^5 à 3.10^5 UFC/mL) sur une éprouvette d'un poids déterminé (0,10 g ± 0,05 g). Dans la méthode par transfert (utilisée seulement dans certains cas lorsque le textile est très hydrophobe), l'inoculation des éprouvettes est réalisée par transfert des bactéries sur le textile à partir d'un milieu solide sur lequel a été répandue la même suspension bactérienne que celle décrite pour la méthode par absorption. Pour les 2

méthodes, après incubation en chambre humide, les bactéries sont décrochées du textile et récupérées dans un milieu liquide puis dénombrées par la méthode des dilutions en milieu solide. Dans la norme, un textile témoin non actif comme un simple coton est testé parallèlement. Dans notre cas, un textile 65 % coton – 35 % polyester (C/P) ou 65 % polyester – 35 % coton (P/C) a été utilisé en tant que témoin en fonction du textile traité.

Les différents tests réalisés sur la base de cette norme sont présentés dans la partie 2.2 notamment la technique d'ensemencement des textiles et la méthode pour décrocher les micro-organismes du textile.

2.2. Mise au point du protocole de détermination de l'activité antimicrobienne sur la base de la norme ISO 20743/2005

L'adaptation de la norme ISO 20743/2005 a été réalisée sur *L. innocua* LRGIA 01 et par la suite le même protocole a été appliqué sur les autres souches bactériennes.

2.2.1. Conditions de dépôt des micro-organismes sur les textiles

Dans la norme ISO 20743/2005, une suspension bactérienne est préparée dans un milieu TSB (Bouillon Tryptone Soja) dilué au 1/20^{éme} de façon à ne pas fournir trop de nutriments aux cellules. La préparation de la suspension est détaillée dans la section « matériels et méthodes ». Dans la norme, pour l'ensemencement des éprouvettes de textiles, 200 µL sont répartis sur 6 éprouvettes de textiles. Ici, seulement 4 éprouvettes sont préparées de la même façon et le fait de préparer 4 éprouvettes de textiles ne change en rien les résultats obtenus puisque le même poids d'éprouvette était obtenu au final (0,40 g ± 0,05 g). Des dénombrements ont été réalisés lors d'un dépôt sur 4 éprouvettes ou sur 6 éprouvettes du même poids. Ce procédé a été réalisé 3 fois, aucune différence significative n'a pu être mise en évidence. En effet, pour les dénombrements sur 4 éprouvettes, 4,5 ± 0,1 log (UFC/g) ont été obtenus et pour les dénombrements sur 6 éprouvettes 4,2 ± 0,3 log (UFC/g).

Une comparaison de différents dépôts a été réalisée de façon à répartir les micro-organismes de façon homogène sur les textiles. Un dépôt de 200 µL réparti sur les 4 éprouvettes a été comparé à un dépôt de 50 µL sur chaque éprouvette de façon à vérifier que la manière de déposer l'inoculum n'avait pas d'influence sur la répartition des micro-organismes et sur le suivi de leur croissance sur 48 h. Pour faire cette comparaison, *L. innocua* LRGIA 01 a été utilisée avec un inoculum de $3{,}4.10^5$ UFC/mL. Le tableau 3-3 représente les résultats de ces comparaisons.

Tableau 3-3 : Dénombrement des cellules de *L. innocua* LRGIA 01 après dépôt de 50 µL sur chaque éprouvette ou de 200 µL répartis sur 4 éprouvettes de textiles C/P blancs. Décrochage au Stomacher 2 min/face et dénombrement sur milieu gélosé TSA. n = 2.

		Log (UFC/g)			
Temps de contact cellules/textile (h)		0	6	24	48
Inoculum déposé sur 4 éprouvettes	4 x 50 µL	3,6 ± 0,2	6,0 ± 0,2	6,4 ± 0,1	5,2 ± 0,1
	200 µL	4,0 ± 0,4	6,2 ± 0,2	6,4 ± 0,1	6,5 ± 0,1

Pour chaque essai (dépôt de 4 x 50 µL sur chaque éprouvette ou répartition de 200 µL sur 4 éprouvettes), 2 répétitions ont été effectuées et ces manipulations ont été reproduites 3 fois, ce qui a permis de valider la répétabilité et la reproductibilité. Les dénombrements ont été réalisés au moment de l'inoculation et après 6, 24 et 48 h de contact. D'après les résultats, on remarque que le nombre de cellules dénombrées après dépôt de 200 µL répartis sur 4 éprouvettes est toujours plus élevé que le nombre de cellules dénombrées après dépôt de 4 x 50 µL sur chaque éprouvette. En effet, pour le temps 48 h, 5,2 ± 0,1 log (UFC/g) sont dénombrés pour un dépôt de 4 x 50 µL contre 6,5 ± 0,1 log (UFC/g) pour un dépôt de 200 µL. Le fait de déposer l'inoculum en une seule fois permettrait donc de déposer plus facilement les micro-organismes à la surface du textile et entraînerait une meilleure répartition de ces derniers, ce point n'a cependant pas été vérifié par microscopie. La répétabilité et la reproductibilité ayant été vérifiées, c'est donc le procédé de dépôt de 200 µL réparti sur 4 éprouvettes de textiles comme, préconisé dans la norme, qui a été retenu pour la suite des expérimentations. Une fois que les cellules sont déposées à la surface des textiles, le décrochage de ces dernières est une phase importante avant de les dénombrer. Dans un second temps, deux méthodes décrochage des bactéries seront comparées : la méthode de décrochage au Stomacher et la méthode de décrochage aux ultrasons.

2.2.2. Méthode de décrochage des micro-organismes des textiles

Dans la norme ISO 20743/2005, après dépôt des micro-organismes sur textiles et incubation, les cellules bactériennes doivent être décrochées du textile pour ensuite pouvoir être dénombrées. Dans la norme, 3 méthodes de décrochage sont proposées :

- agitation par vortex où les éprouvettes de textiles sont placées dans des tubes puis vortexées pendant 5 secondes à 5 reprises ;
- agitation à la main où les éprouvettes sont placées dans des tubes et agitées à la main en réalisant des cercles d'environ 30 cm pendant 30 secondes ;

- agitation par Stomacher où les éprouvettes sont placées dans des sacs spécifiques pour utilisation Stomacher et l'agitation au Stomacher se fait 1 minute pour chaque face du sac.

Dans le cadre de cette étude, une comparaison de 2 modes de décrochage a été faite : un décrochage par Stomacher comme préconisé dans la norme et un décrochage par ultrasons après dépôt d'une suspension d'inoculum de *L. innocua* LRGIA 01.

Les 2 autres méthodes proposées dans la norme n'ont pas été testées. Le choix de comparer la méthode de décrochage par Stomacher à celle de décrochage par ultrasons a été effectué car le LRGIA dispose d'un équipement ultrasons développé pour le décrochage des biofilms des surfaces des industries agro-alimentaires (en acier inoxydable, polypropylène, bois…) [27].

La quantification des micro-organismes attachés à des surfaces inertes est un problème récurrent qui n'est pas encore totalement résolu. Dans certains cas, les cellules adhérent de façon très forte aux surfaces ce qui les rend difficilement détachables et cela pose de réels problèmes de quantification. En effet, les cellules que l'on ne peut pas décrocher d'une surface ne peuvent par conséquent pas être quantifiées. Le problème posé par le décrochage des micro-organismes est qu'il faut pouvoir les décrocher sans affecter leur cultivabilité.

L'utilisation d'ultrasons a été proposée par Mazurovsky *et al.* [28] en 1960 et reste encore une bonne méthode de décrochage des micro-organismes [29] à ce jour. C'est pour cela que nous l'avons comparé à une méthode moins drastique pour les micro-organismes qu'est la méthode de décrochage à l'aide d'un broyeur de type Stomacher. Cette méthode est couramment utilisée pour le dénombrement de bactéries notamment dans les aliments.

Lors de décrochage de biofilms sur des surfaces au contact des aliments, en matériaux tels que le bois ou l'acier inoxydable, le temps de dérochage par les ultrasons appliqués à une fréquence de 40 kHz était de 10 secondes [27]. Le temps de décrochage a été adapté ici au matériau utilisé. Le temps de décrochage appliqué a été réduit par rapport à celui appliqué aux autres matériaux. Pour le décrochage au Stomacher, le temps préconisé dans la norme était de 1 minute par face, ce temps a été augmenté à 2 minutes par face pour décrocher de façon plus importante les bactéries mais en vérifiant qu'il n'y a avait pas de létalité engendrée par cette augmentation.

Par conséquent, des comparaisons de décrochage par ultrasons pendant 5 et 10 secondes à 40 kHz avec des décrochages au Stomacher pendant 1 et 2 minutes ont été réalisées et sont présentées dans le tableau 3-4 après dénombrement des cellules sur milieu gélosé TSA.

Tableau 3-4 : Comparaison des modes de décrochage : Stomacher (pendant 1 ou 2 minutes par face) et ultrasonique (5 secondes et 10 secondes à 40 kHz par face) pour décrocher *L. innocua* LRGIA 01 du textile C/P après contact. n = 2

	Log (UFC/g)	
	Temps de contact textile/ cellules (h)	
Mode de décrochage	0	24
Stomacher 1min.	4,7 ± 0,1	6,1 ± 0,2
Stomacher 2 min.	4,2 ± 0,1	6,3 ± 0,2
Ultrasons 5 sec.	5,2 ± 0,2	7,1 ± 0,2
Ultrasons 10 sec.	5,2 ± 0,5	7,5 ± 0,4

Les décrochages des bactéries ont été réalisés immédiatement après le dépôt sur textile (0 h) et 24 h après le contact des cellules avec le textile. Les résultats des dénombrements de *L. innocua* LRGIA 01 obtenus après décrochage montrent que tout de suite après le dépôt de la suspension d'inoculum, environ 1 log (UFC/g) de plus est dénombré dans le cas de la méthode par ultrasons. Un test de Fisher a été réalisé grâce au logiciel Statgraphics centurion XV© (version 15.0.10, Sigmaplus, Levallois-Perret, France) avec un seuil de signification de $p < 0,05$ et aucune différence significative n'a pu être mise en évidence. Pour ce qui est du temps de contact de 24 h, les mêmes observations peuvent être faites. En effet, on retrouve environ 1 log (UFC/g) en plus après dénombrement des cellules décrochées par les ultrasons mais le test statistique révèle des différences non significatives. Il faut également noter que les ultrasons entraînent la dissociation des agrégats de cellules lors du décrochage ce qui peut aussi conduire à un dénombrement plus important.

D'après ces résultats, il a été montré que le décrochage par ultrasons ou par Stomacher étaient équivalents. Cependant, l'utilisation d'ultrasons peut entraîner une létalité vis-à-vis des cellules décrochées particulièrement lorsqu'ils sont utilisés à basses fréquences [29]. Cette méthode peut sembler être une méthode plus « agressive » pour les cellules. Le décrochage des bactéries du textile a été utilisé ici sur des textiles témoins non traités et les cellules mises en contact avec ce dernier ne subissaient donc pas de stress supplémentaires dû à la présence d'un agent antimicrobien par exemple. Lors de l'utilisation de la norme ISO 20743/2005, les cellules sont en contact avec un textile traité avec un agent antimicrobien plaçant les cellules en conditions de stress. Il est donc important de maintenir ces cellules dans un état reflétant le plus possible l'état dans lequel elles se trouvent afin de pouvoir les dénombrer sur un milieu de culture gélosé. Il est donc important d'utiliser la méthode la moins « agressive » pour les décrocher. En l'absence de différence significative d'efficacité de décrochage entre les 2 méthodes, la méthode de décrochage au Stomacher (2 minutes par face) a été retenue pour le reste de l'étude.

Pour vérifier que le nombre de cellules décrochées est bien maximal lors du premier décrochage, une manipulation dite « méthode par épuisement » a été réalisée. Trois décrochages successifs dans un milieu stérile à chaque fois ont été réalisés au Stomacher pendant 2 minutes par face suivis de dénombrements sur milieu gélosé TSA après chaque décrochage. Les résultats obtenus sont présentés dans la figure 3-4.

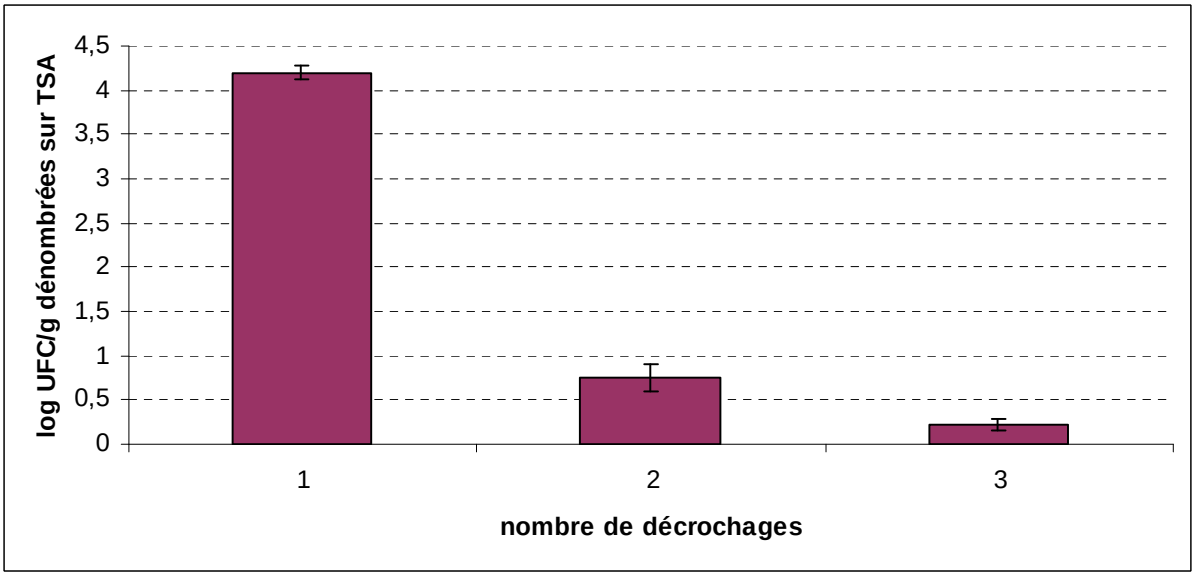


Figure 3-4 : Décrochages successifs de *L. innocua* LRGIA 01 après dépôt sur textile blanc témoin non traité C/P et incubation pendant 8 h. n = 4

Ces résultats montrent que la majorité des cellules sont décrochées au premier passage au Stomacher avec plus de 4 log UFC/g dénombrées sur TSA et que dès le second décrochage quasiment aucune cellule n'a pu être dénombrée.

2.3. Etude de la croissance de différentes souches sur textiles témoin non traités

Une étude a été réalisée pour étudier la croissance des micro-organismes considérés sur le matériau textile. Un suivi de croissance dans le temps a été réalisé pour *P. aeruginosa* ATCC 15742, *L. innocua* LRGIA 01, *L. monocytogenes* AER 102, et *S. aureus* méthi-R nosoco 3011. Le protocole utilisé a été le même que celui pour la détermination de l'activité antimicrobienne en ajoutant les temps de contact de 4 et 8 h entre le moment de l'inoculation et 24 h de contact.

2.3.1. Etude de la croissance de *L. innocua* LRGIA 01, *S. aureus* méthi-R nosoco 3011, *P. aeruginosa* ATCC 15742 et *L. monocytogenes* AER 102 sur textiles témoins (C/P et P/C blancs)

Dans un premier temps, une comparaison des dénombrements de la suspension d'inoculum et du nombre de cellules retrouvé après dépôt sur textile et décrochage au Stomacher a été effectuée.

Par exemple, pour le textile C/P blanc avec un dépôt de *L. innocua* LRGIA 01 à sa surface, la concentration en cellules de l'inoculum est de $3{,}4.10^5$ UFC/mL. Or il faut noter qu'un essai est composé de 2 éprouvettes de textiles donc de 100 µL de suspension et ces 2 éprouvettes sont diluées dans 20 mL de diluant afin de récupérer les cellules par décrochage au Stomacher. Ainsi, on doit retrouver $(3{,}4.10^5 \times 0{,}1) / 20 = 1{,}7.10^3$ UFC/mL. Sur ce textile, on retrouve après décrochage au Stomacher $1{,}2.10^3$ UFC/mL. Le tableau 3-5 récapitule les comparaisons pour *L. innocua* LRGIA 01.

Tableau 3-5 : comparaison du dénombrement de l'inoculum de *L. innocua* LRGIA 01 avec celui des bactéries sur le textile témoin blanc, 65% polyester à T0. n = 2

(UFC/mL)	Inoculum déposé (a)	Bactéries dénombrées sur le textile après décrochage à T0 (b)	Différence b-a (Δ)
C/P blanc	$1{,}7.10^3$	$1{,}2.10^3$	$- 0{,}5.10^3$
P/C blanc	$1{,}3.10^3$	$1{,}1.10^3$	$- 0{,}2.10^3$

Pour les textiles blancs C/P et P/C, le nombre de cellules dénombrées après décrochage correspond au nombre de cellules présent dans la suspension d'inoculum et déposées sur le textile. En effet, les différences de dénombrement apparaissent négligeables car on a une diminution de $0{,}5.10^3$ et de $0{,}2.10^3$ UFC/mL respectivement du nombre de cellules dénombrées après décrochage du textile blanc C/P et P/C par rapport au nombre de cellules dénombrées dans l'inoculum. Dans un second temps, un suivi de croissance de *P. aeruginosa* ATCC 15742, *L. innocua* LRGIA 01, *L. monocytogenes* AER 102 et *S. aureus* méthi-R nosoco 3011 a été effectué sur textiles blancs 65 % coton - 35 % polyester (C/P) et 65 % polyester - 35 % coton (P/C). Les résultats de ces cinétiques de croissance sont présentés dans la figure 3-5.

Pour les 4 souches testées, une croissance de 2 à 3 logs (UFC/g) en 24 h est observée sur textiles C/P et P/C blancs dans tous les cas.

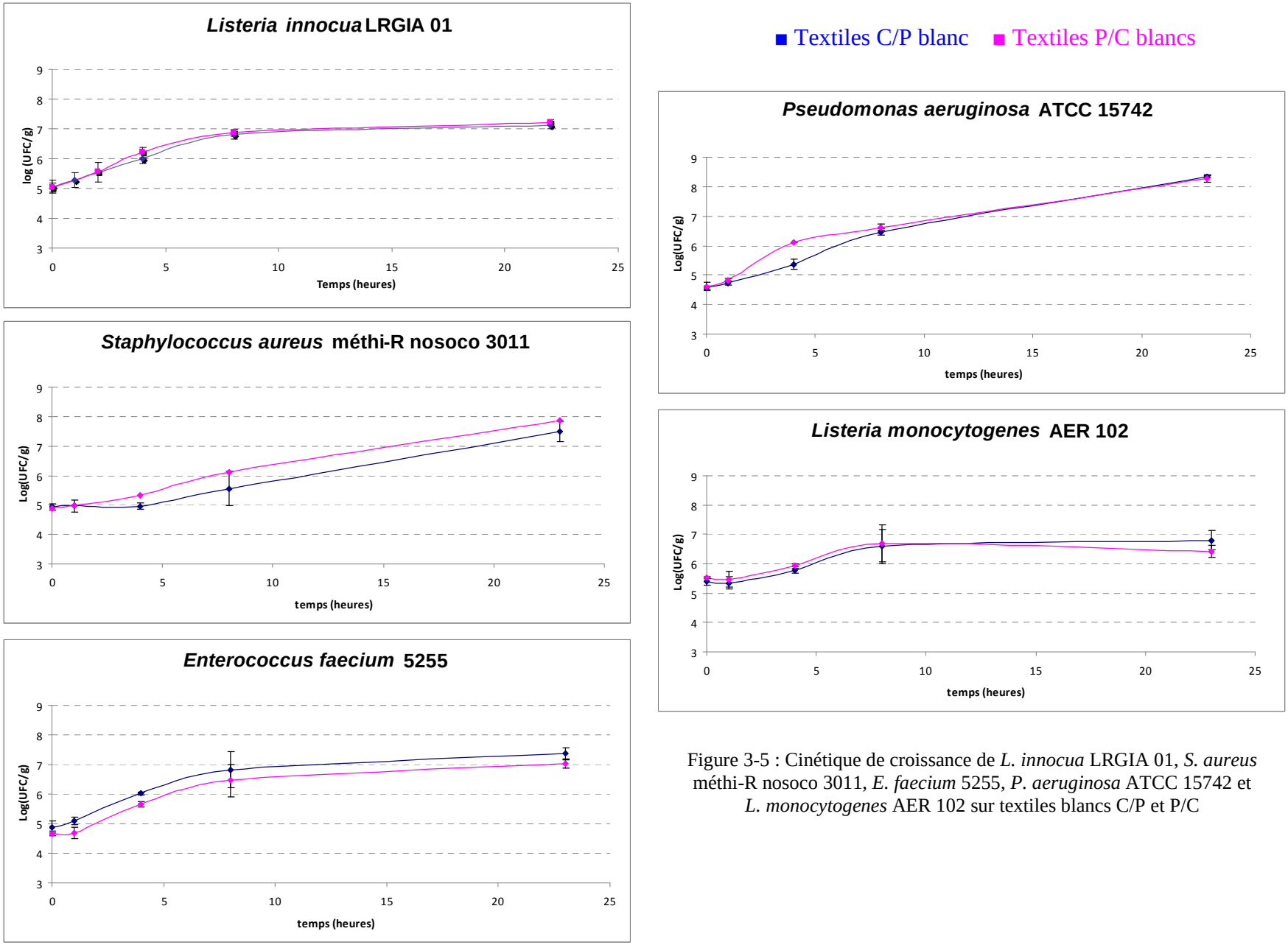


Figure 3-5 : Cinétique de croissance de *L. innocua* LRGIA 01, *S. aureus* méthi-R nosoco 3011, *E. faecium* 5255, *P. aeruginosa* ATCC 15742 et *L. monocytogenes* AER 102 sur textiles blancs C/P et P/C

D'une façon générale, on peut décrire les différentes phases de croissance sur les textiles non traités. Pour les 4 souches bactériennes testées on peut noter que les différentes phases de croissance obtenues en milieu liquide sont comparables à celle pouvant être observées sur textiles. La phase de latence correspond au temps nécessaire à la bactérie pour synthétiser les enzymes adaptées au nouveau substrat [30], dans notre cas le textile qui est différent du milieu dans lequel se trouvent les cellules avant ensemencement. Dans le cas de *S. aureus*, il semblerait que ce temps soit légèrement plus long que pour les autres bactéries mais aussi par rapport à sa croissance en milieu liquide.

La phase exponentielle de croissance apparaît identique pour les 2 souches de *Listeria*. Pour *P. aeruginosa* ATCC 15742 et *S. aureus* méthi-R nosoco 3011, la phase exponentielle se prolonge au-delà de 8 h et il n'y a donc pas de phase stationnaire sur textile et en milieu liquide pour *P. aeruginosa* ATCC 15742. Pour *S. aureus* méthi-R nosoco 3011 on notera une phase stationnaire à partir de 8 h en milieu liquide. En effet, dans le cas de la culture en milieu liquide, l'oxygène disponible est utilisé rapidement par les micro-organismes et seule la surface de la culture permettra une bonne croissance. Pour les nutriments, l'augmentation de la population entraine une diminution des nutriments pouvant causer la mort des cellules.

Dans le cas de la croissance sur textile (pour *L. innocua* LRGIA 01 et *L. monocytogenes* AER 102), l'entrée en phase stationnaire par analogie à la croissance en milieu liquide peut également être expliqué par ces 2 phénomènes, le cas de l'oxygène étant moins important. En effet les cellules sur textiles se trouvent plus en surface que dans le cas d'une culture en milieu liquide. Cependant, le manque de nutriments apparaît probablement plus rapidement puisque les cellules avant d'être déposées sur textiles se trouvent dans un milieu TSB dilué au 1/20^{éme}. Une fois sur le textile, les micro-organismes doivent donc utiliser les nutriments présents sur ce dernier pour se multiplier. Les textiles sont reconnus comme un support pour le développement des micro-organismes. Ces derniers sont capables de s'y multiplier rapidement en présence de certaines conditions telles que l'humidité, la présence de nutriments et des conditions de température adaptées à leur croissance [31]. Les fibres synthétiques telles que le polyester sont souvent plus résistantes à « l'attaque » microbienne par rapport aux fibres naturelles comme le coton du fait de leur hydrophobicité plus importante [32]. De plus la cellulose du coton peut servir de nutriments et de source d'énergie dans certaines conditions. Dans notre cas, les textiles testés sont composés en partie de coton et constituent donc un très bon environnement pour la croissance des 5 micro-organismes testés.

Par la suite la croissance de 2 de ces 5 micro-organismes a été évaluée à différentes humidités relative de l'air sur textiles C/P car ces 2 micro-organismes possèdent des profils de croissance différents.

2.3.2. Etude de la croissance de *L. innocua* LRGIA 01 et *P. aeruginosa* ATCC 15742 sur textiles témoins C/P blancs en conditions d'humidités différentes

La croissance de 2 souches : un bacille à Gram négatif, *P. aeruginosa* ATCC 15742 et un bacille à Gram positif, *L. innocua* LRGIA 01 a été évaluée sur textiles C/P à différentes humidités relatives de l'air. Ces 2 micro-organismes ont été choisis dans cette partie de l'étude puisque *L. innocua* LRGIA 01 est considérée comme le modèle d'étude et *P. aeruginosa* ATCC 15742 est une souche connue pour sa capacité à former des biofilms en industries agro-alimentaires et a donc été choisie pour réaliser ces tests.

Comme cela a été décrit dans la section « matériels et méthodes » (chapitre 2), les cinétiques de croissance à des humidités relatives différentes de l'air ambiant ont été réalisées grâce à l'utilisation de bocaux hermétiques dans lesquels un sel en solution saturée a été placé afin de maintenir une humidité précise de l'air au sein du bocal. L'eau correspond à une humidité relative de l'air de 100 % alors que les sels K_2SO_4, $BaCl_2$, KCl, NaCl et $MgCl_2$ permettent de maintenir respectivement des humidités relatives de l'air de 97, 90, 84, 75 et 32 % à l'intérieur du bocal dans lequel se trouvent les textiles.

Les textiles ont été placés à 30°C dans les bocaux sans les bactéries suffisamment longtemps (au moins 5 h) pour atteindre l'humidité au sein des fibres de textiles à l'équilibre avec l'humidité de l'air correspondante. Par la suite les micro-organismes ont été déposés puis l'incubation des bocaux a été réalisée à différents temps avant un décrochage des bactéries et un dénombrement en milieu gélosé. Les résultats de ces cinétiques sont présentés dans la figure 3-6.

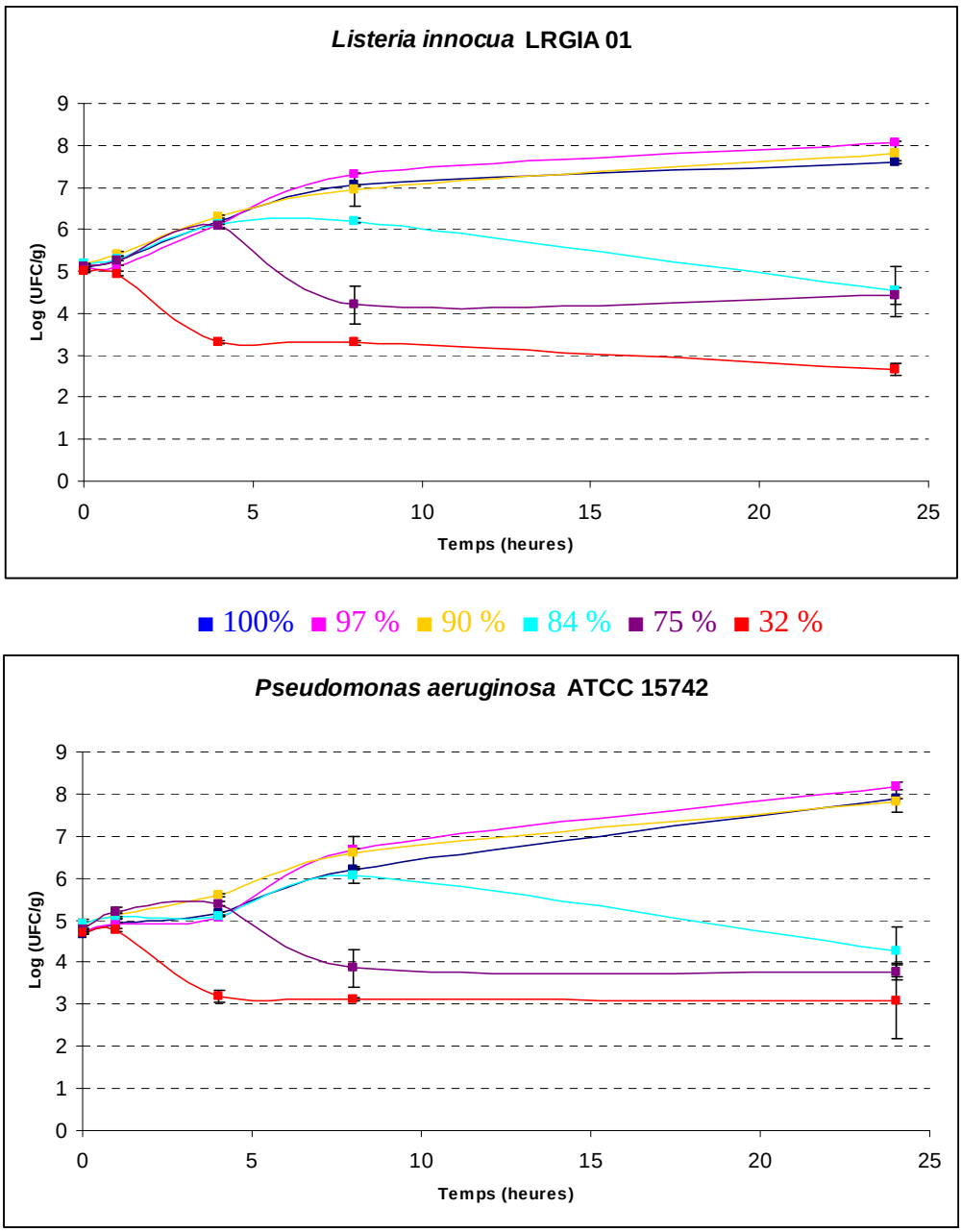


Figure 3-6 : Cinétiques de croissance de *L. innocua* LRGIA 01 et *P. aeruginosa* ATCC 15742 sur textiles C/P blancs incubés sur textiles avec de l'air à des humidités relatives différentes (100, 97, 90, 84, 75 et 32 %). n = 2

En fonction des humidités relatives de l'air, le devenir des 2 micro-organismes n'est pas la même. En effet, pour une humidité relative de 100 %, la croissance de *L. innocua* LRGIA 01 se fait normalement sur le textile C/P blanc avec une progression de 2,5 log (UFC/g) en 24 h. Pour les humidités relatives de l'air de 97 % et 90 %, on constate la même chose que pour une humidité relative de 100 % avec une croissance de 3,4 log (UFC/g) pour 97 % et 2,9 log (UFC/g) pour 90 % en 24 h. En revanche, à partir d'une humidité relative de 84 %, *L. innocua* LRGIA 01 se développe de la même façon que lorsque l'humidité était comprise entre 90 et 100 % jusqu'à 4 h de contact. Ensuite entre 4 h et 8 h, 6 log (UFC/g) sont encore dénombrés

puis entre 8 h et 24 h une diminution notable des UFC d'environ 2 log (UFC/g) est observée. Pour une humidité relative de 75 % on constate que le nombre d'UFC est identique à celui pour une humidité de 84 %, mais au temps 4 h ce nombre diminue fortement et stagne à environ 4 log (UFC/g) jusqu'au temps 24 h. En ce qui concerne l'humidité de 32 %, on observe une diminution à partir de 1 h de contact jusqu'au temps 24 h. La diminution observée est d'environ 2 log (UFC/g). *L. innocua* LRGIA 01 est donc capable d'adhérer au textile et également de se multiplier sur 24 h pour des humidités relatives comprise entre 90 % et 100 %. Il faut noter que l'humidité relative optimale de croissance de *L. innocua* est d'environ 97 % et elle est capable de se multiplier si l'humidité relative est comprise entre 79 et 86 % par exemple sur du salami [33]. Ces informations sont en accord avec les résultats obtenus dans cette étude. En effet, c'est à partir d'une humidité relative de 84 % que *L. innocua* LRGIA 01 commence à ne plus se multiplier sur textiles. Il faut cependant préciser que sur les textiles la quantité de nutriments est bien moins importante que sur un produit alimentaire comme le salami.

De la même façon que *L. innocua* LRGIA 01, *P. aeruginosa* ATCC 15742 est capable d'adhérer et de se multiplier sur le textile C/P. Pour une humidité relative de 100 %, la croissance de *P. aeruginosa* ATCC 15742 se fait normalement sur le textile, en effet on observe une progression de 3,2 log (UFC/g) puisqu'au moment de l'inoculation, 4,7 log (UFC/g) sont dénombrés et qu'après 24 h de contact, 7,9 log (UFC/g) sont retrouvés. Une phase d'accélération est observée entre le moment de l'inoculation et 8 h de contact. On retrouve également une phase exponentielle de croissance entre 1 h et 8 h de contact pour finir avec une phase stationnaire à partir de 8 h de contact. Pour les humidités relatives de 90 et 97 %, on constate la même chose que pour *L. innocua* LRGIA 01, *P. aeruginosa* ATCC 15742 se développe aussi bien après 24 h de contact. En revanche à partir d'une humidité relative de 84 % *P. aeruginosa* ATCC 15742 se développe comme pour des humidités proches de 100 % jusqu'à 8 h de contact, puis, entre 8 h et 24 h une diminution d'environ 2 log (UFC/g) est observée. Pour une humidité relative de 75 %, la croissance est identique à la croissance pour une humidité relative de 84 %, cependant, à partir de 4 h de contact, le nombre d'UFC diminue fortement et stagne à environ 4 log (UFC/g) jusqu'à 24 h de contact. En ce qui concerne l'humidité de 32 %, une perte de cultivabilité est observée dès 1 h de contact et ce jusqu'à 24 h de contact et cette diminution est d'environ 2 log (UFC/g). *P. aeruginosa* ATCC est capable de se multiplier lorsque l'humidité relative est comprise entre 95 et 100 % [34], ce qui est en accord avec les résultats obtenus dans cette étude.

Koutsoumanis *et al.* [34] ont étudié la croissance de *L. monocytogenes* en milieu liquide (TSB) en comparaison de la croissance en milieu gélosé (TSA) en faisant varier les conditions de température (de 4 à 30°C), de pH (de 4,24 à 6,58) et d'humidités relatives (de 90 à 99,3 %) pendant 30 jours. En milieu liquide, les valeurs de pH et d'humidités relatives minimales qui permettent une croissance de cette souche sont respectivement de 4,45 et 90 % pour des températures comprises entre 15 et 30°C. Pour la même gamme de température, les valeurs minimales de pH et d'humidités relatives minimales permettant la croissance sur milieu gélosé sont respectivement de 5,1 et 94,5 %. Ces différences entre croissance planctonique et croissance sur milieu gélosé montrent que les cellules présentes à la surface du milieu solide doivent gérer un stress supplémentaire pour leur croissance. Ce stress peut être lié à différents facteurs tels que la diffusion des nutriments ou de l'oxygène ou encore la communication entre cellules.

L. innocua LRGIA 01 et *P. aeruginosa* ATCC 15742 ont donc le même comportement vis-à-vis du textile C/P blanc. En effet, elles sont toutes les deux capables d'adhérer et de se multiplier. On remarque également qu'elles adoptent le même comportement vis-à-vis des différences de valeurs d'humidité relative. En effet, elles se développent bien sur le textile lorsque l'humidité est comprise entre 90 et 100 % et ne se développent plus si l'humidité relative descend en dessous de 84 %. Ceci semble être en accord avec ce qui a été observé par Koutsoumanis *et al.* [34] pour *L. monocytogenes* en milieu gélosé qui donnait une humidité relative minimale de 94,5 % pour permettre une croissance de cette souche. Il faut cependant noter que sur textile, les conditions ne sont probablement pas les mêmes que sur milieu gélosé. Augustin *et al.* [35] ont mis en évidence une humidité relative minimale de 92 % pour *L. monocytogenes* et Neumeyer *et al.* [36] de 95 % pour *P. aeruginosa*. Il semblerait donc que sur textiles, les 2 micro-organismes testés dans cette étude seraient capables de se multiplier plus facilement à des humidités relatives faibles (90 %). Ces résultats pourraient être expliqués par le fait que les cellules soient protégées au sein des fibres du textile et des valeurs d'humidités relatives au niveau microscopique certainement plus importante qu'au niveau macroscopique.

Par la suite et pour ne pas influencer le comportement des micro-organismes, une humidité de 100 % sera maintenue pour la mesure de l'activité antimicrobienne. En effet, dans le cadre de cette étude, les activités antimicrobiennes de différents textiles fonctionnalisés seront

recherchées et pour ne pas faire varier plusieurs paramètres en même temps l'humidité relative durant ces expérimentations sera constante et optimale pour permettre un développement sur textile non traité.

3. Conclusion

Au cours de ce chapitre, dans un premier temps le choix des souches pour le projet Actiprotex en collaboration avec les partenaires du projet et leur caractérisation au sein du LRGIA ont été décrits. La caractérisation de ces micro-organismes a permis de déterminer leur caractère hydrophobe/hydrophile et donneur d'électrons grâce à la méthode MATS. En effet, 3 des 5 souches sélectionnées apparaissent hydrophobes : *S. aureus* méthi-R nosoco 3011, *E. faecium* 5255 et *L. innocua* LRGIA 01 et 2 apparaissent moyennement hydrophobes : *P. aeruginosa* ATCC 15742 et *L. monocytogenes* AER 102 et les 5 souches sont toutes donneuses d'électrons. Ces informations permettront essentiellement, dans les chapitres suivants, de pouvoir interpréter des différences de comportements sur les supports textiles fonctionnalisés. En effet, il a été montré que les caractères de surface des micro-organismes avaient un impact sur leurs capacités d'adhésion à différentes surfaces.

Dans un second temps, les adaptations de la norme ISO 20743/2005 pour la détermination de l'activité antimicrobienne ont été présentées avec la méthode de dépôt des micro-organismes à la surface des textiles et leur décrochage. Il s'est avéré intéressant de déposer 200 µL d'une suspension d'environ 10^5 UFC/mL réparties sur 4 éprouvettes de textile. Dans le cadre de ce travail, le décrochage par Stomacher était le plus approprié pour le décrochage des bactéries du textile. C'est donc cette méthode de dépôt et cette méthode de décrochage qui ont été utilisées dans les chapitres suivants.

Par la suite, des études de croissance de plusieurs micro-organismes (*L. innocua* LRGIA 01, *L. monocytogenes* AER 102, *S. aureus* méthi-R nosoco 3011, *E. faecium* 5255, *P. aeruginosa* ATCC 15742) sur les 2 types de textiles C/P et P/C ont été effectuées. Les résultats ont montré une bonne croissance des 5 souches sur ces 2 types de textiles. Ces micro-organismes sont donc capables d'adhérer et de se multiplier sur textiles témoins non traités. Dans les chapitres suivants, les activités antimicrobiennes des textiles seront déterminées grâce à la comparaison de la croissance sur textiles témoins. Il est donc important de connaître le comportement de ces souches sur un textile non traité.

La croissance de 2 (*L. innocua* LRGIA 01 et *P. aeruginosa* ATCC 15742) de ces 5 micro-organismes a également été étudiée sur textiles C/P en présence d'humidités relatives de l'air variables. Il s'est avéré qu'en dessous de 90 % d'humidité relative de l'air les 2 souches n'étaient plus capables de se multiplier sur textiles. Pour la détermination des activités antimicrobiennes des textiles traités, une humidité de 100 % a été utilisée de façon à ne pas faire subir de stress supplémentaire aux micro-organismes testés. En effet, l'activité antimicrobienne a été calculée de façon à déterminer si l'agent antimicrobien déposé à la surface des textiles avait une activité antimicrobienne vis-à-vis des micro-organismes testés.

Ce chapitre est donc un chapitre d'introduction des résultats qui permettra de comprendre les 2 autres chapitres suivant sur l'étude de textiles fonctionnalisés par traitement plasma et méthodologie sol-gel à l'argent présentés dans le chapitre 4 et par imprégnation par bain au PHMB présenté dans le chapitre 5. En effet, l'adaptation de la norme ISO 29743-2005 a été indispensable pour la détermination des activités antimicrobiennes des textiles traités et il était important de connaître le comportement des souches en évaluant leurs croissances sur textiles témoins non traités. Le fait d'évaluer les différences de croissance à des humidités relatives de l'air différentes était également un paramètre à prendre en compte pour l'évaluation de l'activité antimicrobienne.

4. Références bibliographiques

[1] http://www.invs.sante.fr/surveillance/tiac/default.htm. Données relatives aux Toxi-infections alimentaires collectives (TIAC) déclarées en France en 2006 et 2007. *INVS* (2007). Consulté le 12 septembre 2010.

[2] A. Deplano, H. Rodriguez-Villalobos, Y. Glupczynski, P. Bogaerts, D. Allemeersch, A. Grimmelprez. Emergence and dissemination of multidrug resistant clones of *Pseudomonas aeruginosa* producing VIM-2 metallo-beta-lactamase in Belgium. *Eurosurveillance* (2007) **12 (1)**: p. E070118.

[3] Y. Carmeli, N. Troillet, A. W. Karchmer, M. H. Samore. Health and economic outcomes of antibiotic resistance in *Pseudomonas aeruginosa*. *Archives of Internal Medicine* (1999) **159 (10)**: pp. 1127-1132.

[4] N. Nicolay, J. M. Thiolet, D. Talon, I. Poujol, C. Bernet, A. Carbonne, C. Dumartin, I. Raclot, H. Sénéchal, L. Bouraoui, B. Coignard. Signalement des infections nosocomiales à *Pseudomonas aeruginosa* en France entre Août 2001 et juin 2006. *Bulletin Epidémiologique Hebdomadaire de l'INVS - Bilans réguliers de surveillance - maladies infectieuses* (2008) **30-31**: pp. 261-264.

[5] https://www.invs.sante.fr/publications/2009. Enquête nationale de prévalence des infections nosocomiales (mars 2009). Consulté le 20 octobre 2010.

[6] https://www.rivm.nl/earss. European Antimicrobial Resistance Surveillance System (EARSS), résultats 2008. Consulté le 20 octobre 2010.

[7]http://www.invs.sante.fr/publications/2009/enquete_prevalence_infections_nosocomiales/enquete_prevalence_infections_nosocomiales_vol1.pdf Enquête nationale de prévalence des infections nosocomiales, France, juin 2006 Volume 1 – Méthodes, résultats, perspectives. *INVS*. Consulté le 20 octobre 2010.

[8] M. N. Bellon-Fontaine, J. Rault, C. J. Van Oss. Microbial adhesion to solvents: a novel method to determine the electron-donor/electron-acceptor or Lewis acid-base properties of microbial cells. *Colloids and Surfaces. B, Biointerfaces* (1996) **7**: pp. 47-53.

[9] H. Takahashi, T. Suda, Y. Tanaka, B. Kimura. Cellular hydrophobicity of *Listeria monocytogenes* involves initial attachment and biofilm formation on the surface of polyvinyl chloride. *Letters in Applied Microbiology* (2010) **50 (6)**: pp. 618-625.

[10] A. L. Bertrand, J. J. Morrier, G. Benay, M. Lissac, O. Barsotti. Etude "*in vitro*" de l'adhérence de "*Streptococcus mutans*" sur un alliage niti utilisé en orthodontie. *Les cahiers de l'ADF* (2003) **14-15**: pp. 50-55.

[11] N. Mozes, A. J. Léonard, P. G. Rouxhet. On the relations between the elemental surface composition of yeasts and bacteria and their charge and hydrophobicity. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes* (1988) **945 (2)**: pp. 324-333.

[12] C. Rubio. Conception des mécanismes d'adhésion des biofilms en milieu marin en vue de la conception de nouveaux moyens de prévention. *Thèse de l'Université Paris VI* (2002).

[13] H. A. Latrache, M. El Ghmari, M. Karroua, A. Hakkou, H. Ait Mousse, A. El Bouadili, P. Bourlioux. Relations between hydrophobicity tested by three methods and surface chemical composition of *Escherichia coli*. *Microbiologica* (2002) **25**: pp. 75-82.

[14] H. M. Al-Qadiri, M. Lin, A. G. Cavinato, B. A. Rasco. Fourier transform infrared spectroscopy, detection and identification of *Escherichia coli* O157:H7 and *Alicyclobacillus* strains in apple juice. *International Journal of Food Microbiology* (2006) **111 (1)**: pp. 73-80.

[15] F. Hamadi, H. Latrache. Comparison of contact angle measurement and microbial adhesion to solvents for assaying electron donor-electron acceptor (acid-base) properties of bacterial surface. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* (2008) **65**: pp. 134-139.

[16] R. Briandet, T. Meylheuc, C. Maher, M. N. Bellon-Fontaine. *Listeria monocytogenes* Scott A: cell surface charge, hydrophobicity, and electron donor and acceptor characteristics under different environmental growth conditions. *Applied and Environmental Microbiology* (1999) **65**: pp. 5328-5333.

[17] C. Pelletier, C. Bouley, C. Cayuela, S. Bouttier, P. Bourlioux, M. N. Bellon-Fontaine. Cell surface characteristics of *Lactobacillus casei* subsp. casei, *Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei*, and *Lactobacillus rhamnosus* strains. *Applied Environmental Microbiology* (1997) **63**: pp. 1725-1731.

[18] P. Chavant, B. Martinie, T. Meylheuc, M. N. Bellon-Fontaine, M. Hebraud. *Listeria monocytogenes* LO28: surface physicochemical properties and ability to form biofilms at different temperatures and growth phases. *Applied and Environmental Microbiology* (2002) **68**: pp. 728-737.

[19] R. J. Doyle. Contribution of the hydrophobic effect to microbial infection. *Microbes Infection* (2000) **2**: pp. 391-400.

[20] P. Gilbert, L. Moore. Cationic antiseptics: diversity of action under a common epithet. *Journal of Applied Microbiolgy* (2005) **99**: pp. 703-715.

[21] M. S. Schvartzman, X. Belessi, F. Butler, P. Skandamis, K. Jordan. Comparison of growth limits of *Listeria monocytogenes* in milk, broth and cheese. *Journal of Applied Microbiology* (2010) **109 (5)**: pp. 1790-1799.

[22] M. Berney, F. Hammes, F. Bosshard, H. U. Weilenmann, T. Egli. Assessment and interpretation of bacterial viability by using the Live/Dead BacLight kit in combination with flow cytometry. *Applied and Environmental Microbiology* (2007) **73**: pp. 3283-3290.

[23] G.McDonnell, A. Russel. Antiseptics and disinfectants: activity, action, and resistance. *Clinical Microbiology Reviews* (1999) **12**: pp. 147-179.

[24] L. E. Moore, R. G. Ledder, P. Gilbert, A. J. McBain. *In vitro* study of the effect of cationic biocides on bacterial population dynamics and susceptibility. *Applied and Environmental Microbiology* (2008) **74**: pp. 4825-4834.

[25] K. R. Kirker, S. T. Fisher, G. A. James, D. McGhee, C. B. Shah. Efficacy of polyhexamethylene biguanide-containing antimicrobial foam dressing against MRSA relative to standard foam dressing. *Wounds* (2009) **21 (9)**: pp. 229-233.

[26] I. Tomas, L. García-Caballero, M. C. Cousido, J. Limeres, M. Álvarez, P. Diz. Evaluation of chlorhexidine substantivity on salivary flora by epifluorescence microscopy. *Oral Diseases* (2009) **15 (6)**: pp. 428-433.

[27] N. Oulahal-Lagsir, A. Martial-Gros, E. Boistier, L. J. Blum, M. Bonneau. The development of an ultrasonic apparatus for the non-invasive and repeatable removal of fouling in food processing equipment. *Letters in Applied Microbiology* (2000) **30 (1)**: pp. 47-52.

[28] E. B. Masurovsky, W. K. Jordan. Studies on the removal of *Staphylococcus aureus* from milk-contact surfaces by ultrasonic cleaning methods. *Journal of Dairy Science* (1960) **43**: pp. 1545–1559.

[29] Z. Qian, R. D. Sagers, W. G. Pitt. The effect of ultrasonic frequency upon enhanced killing of *P. aeruginosa* biofilms. *Annals of Biomedical Engineering* (1997) **25**: p. 69–76.

[30] L. Prescott, J. Harley, D. Klein. Microbiologie. Editions De boeck. Mc Graw-Hill, 2003, Bruxelles.

[31] Y. Gao, R. Cranston. Recent advances in antimicrobial treatments of textiles. *Textile Research Journal* (2008) **78**: pp. 60-72.

[32] R. Purwar, M. Joshi. Recent developments in antimicrobial finishing-A review. *AATCC Review* (2004) **4**: pp. 22-26.

[33] J. P. Guiraud. Microbiologie alimentaire. Editions dunod, 1998, Paris.

[34] K. P. Koutsoumanis, P. A. Kendall, J. N. Sofos. A comparative study on growth limits of *Listeria monocytogenes* as affected by temperature, pH and aw when grown in suspension or on a solid surface. *Food Microbiology* (2004) **21 (4)**: pp. 415-422.

[35] J. C. Augustin, V. Zuliani, M. Cornu, L. Guillier. Growth rate and growth probability of *Listeria monocytogenes* in dairy, meat and seafood products in suboptimal conditions. *Journal of Applied Microbiology* (2005) **99**: pp. 1019-1042.

[36] K. T. Neumeyer, T. Ross, T. A. McMeekin. Development of a predictive model to describe the effects of temperature and water activity on the growth of spoilage pseudomonads. *International Journal of Food Microbiology* (1997) **38**: pp. 45-54.

Chapitre 4 : Fonctionnalisation antimicrobienne d'un textile par l'argent : méthodologie plasma ou méthodologie sol-gel, caractérisation physico-chimique et étude de l'activité antimicrobienne

Chapitre 4 : Fonctionnalisation antimicrobienne d'un textile par l'argent : méthodologie plasma ou méthodologie sol-gel, caractérisation physico-chimique et étude de l'activité antimicrobienne

1. Evaluation de l'activité antimicrobienne d'un textile traité par plasma simple couche à l'argent 178

1.1. Caractérisation physico-chimique des textiles après dépôt par traitement plasma simple couche d'argent 178

1.2. Caractérisation par ToF-SIMS des textiles après dépôt d'argent par méthodologie plasma en simple couche 183

1.3. Cinétique de croissance de *Listeria innocua* LRGIA 01 et activité antimicrobienne de textiles traités.. 184

2. Etude de la répartition des micro-organismes après contact avec un textile traité à l'argent par méthode plasma par MEB : exemple d'un textile C/P traité par dépôt d'une simple couche d'argent de 10 Å 191

3. Evaluation de l'activité antimicrobienne d'un textile traité par plasma : dépôt simultané Ag-SiOCH..... 193

3.1. Méthode de dépôt simultané Ag-SIOCH par traitement plasma 194

3.2. Caractérisation des textiles après dépôt simultané Ag-SiOCH par méthodologie plasma 196

3.3. Suivi de croissance de *Listeria innocua* LRGIA 01 sur les textiles traités Ag-SiOCH par plasma 198

4. Evaluation de l'activité antimicrobienne d'un textile traité par plasma : dépôt d'Ag-SiOCH et une encapsulation par SiOCH ou Al_2O_3 201

4.1.Méthode de traitement plasma : dépôt d'Ag-SiOCH encapsulé par SiOCH ou Al_2O_3 202

4.2. Caractérisation des textiles après un dépôt d'Ag-SiOCH encapsulé par SiOCH ou Al_2O_3 par méthodologie plasma 203

4.3. Effet de textiles traités Ag-SiOCH encapsulé par SiOCH ou Al_2O_3 sur *Listeria innocua* LRGIA 01.... 206

5. Evaluation de l'activité antimicrobienne d'un textile traité par méthodologie sol-gel.... 214

5.1. Méthodologie Sol-Gel [23]..... 215

5.2. Activités antimicrobiennes de textiles fonctionnalisés par Sol-Gel à l'argent 217

6. Conclusion..... 223

7. Références bibliographiques 2266

Chapitre 4 : Fonctionnalisation antimicrobienne d'un textile par l'argent : méthodologie plasma ou méthodologie sol-gel, caractérisation physico-chimique et étude de l'activité antimicrobienne

Ce chapitre est consacré à la présentation de deux méthodes de modification de surface précédemment décrites dans la partie « étude bibliographique » : le traitement plasma et la méthodologie sol-gel. En effet, dans le cadre du projet Actiprotex, dans l'objectif de déposer de l'argent à la surface de textiles pour les rendre antimicrobiens, deux méthodologies ont été employées pour la modification de surface. Des traitements plasma à base d'argent ont été réalisés par la société HEF (Andrézieux Bouthéon) et 3 types de traitements seront décrits dans ce chapitre : un traitement simple couche, un traitement avec un dépôt simultané d'argent et d'oxyde de silicium dopé au carbone (Ag-SiOCH) et enfin un traitement à base d'un dépôt d'Ag-SiOCH encapsulé par de l'oxyde d'aluminium (Al_2O_3) ou de l'oxyde de silicium dopé au carbone (SiOCH). Le but de ces 3 traitements était l'obtention de textiles antimicrobiens traités à l'argent ayant une bonne activité antimicrobienne sans que les dépôts entrainent une coloration de ces textiles. Ces différents traitements ont été réalisés sur des textiles composés de 65 % de polyester et de 35 % de coton.

Le traitement sol-gel avec nanoparticules d'argent générées par réduction photochimique a été effectué par le LMGP (Laboratoire des Matériaux et Génie Physique, Institut Polytechnique de Grenoble) dans le but de déposer de l'argent à la surface de textiles et des analyses physico-chimiques ont été réalisées directement au sein de ce laboratoire. Contrairement aux traitements plasma, les traitements sol-gel ont eux été réalisés sur des textiles composés de 65 % de coton et de 35 % de polyester.

Le traitement plasma, en collaboration avec la société HEF, a largement été étudié et de façon plus approfondie que les traitements réalisés par méthodologie sol-gel. En effet, la technologie plasma sur textile était plus aboutie que la méthodologie sol-gel, bien connue du LMGP qui devait être adaptée au matériau textile, matériau peu connu de ce laboratoire. Les résultats de ce chapitre ont contribué à la rédaction de 2 publications parues et présentées en annexe 2 et 3.

1. Evaluation de l'activité antimicrobienne d'un textile traité par plasma simple couche à l'argent

La société HEF, spécialiste du traitement plasma a dans un premier temps réalisé des dépôts « simple couche » c'est-à-dire des dépôts d'une seule couche d'argent, antimicrobien préalablement sélectionné dans le projet Actiprotex. Pour la société HEF, le traitement plasma sur textile devait être mis au point afin d'obtenir des conditions de process reproductibles et efficaces afin d'obtenir un matériau final antimicrobien contre plusieurs souches microbiennes mais sans coloration du textile pouvant être due au traitement. Ces résultats ont fait l'objet d'une publication dans la revue Food Control (Annexe 2).

Dans cette première partie, la méthodologie plasma est présentée et différentes caractérisations du traitement plasma simple couche ont été réalisées : une caractérisation de la couleur des textiles après traitement avec des épaisseurs d'argent croissantes, une caractérisation par XPS des modifications de la composition chimique de l'extrême surface des textiles traités et enfin pour terminer des mesures d'activités antimicrobiennes ont été effectuées. Le devenir de *L. innocua* LRGIA 01 au cours du temps, sur les textiles témoins et traités est présenté. Elles ont permis de déterminer les activités antimicrobiennes à 24h pour cette même souche selon la norme ISO 20743/2005.

1.1. Caractérisation physico-chimique des textiles après dépôt par traitement plasma simple couche d'argent

Le but de ce premier type de dépôt par plasma était de déposer une quantité d'argent suffisante pour obtenir une activité antimicrobienne suffisante vis-à-vis de *Listeria innocua* LRGIA 01. La quantité d'argent nécessaire pour inhiber ou tuer *Listeria innocua* LRGIA 01 n'étant pas connue dans ces conditions, c'est-à-dire après contact avec un textile traité à l'argent, différentes épaisseurs d'argent ont été appliquées avec comme objectif final d'obtenir un textile non coloré (blanc), actif sur un certain nombre de souches bactériennes.

Afin d'obtenir des dépôts « transparents », des dépôts les plus fins possibles ont dû être déposés à la surface des textiles. Afin de contrôler l'épaisseur d'argent déposée à la surface des textiles, la puissance des dépôts a varié. En effet, c'est la variation de la puissance lors du procédé de fabrication qui a permis de contrôler l'épaisseur d'argent déposée au cours de ce procédé. La puissance de dépôt utilisée dans le cadre de ce travail a été fixée à 100 W par la société HEF. En effet, cette puissance permet de réaliser des dépôts fins (de 10 à 400 Å) et

pour ce type d'épaisseur, il a été démontré que la structure du film déposé change beaucoup avec l'épaisseur, le substrat et la température.

La réalisation de dépôts ultra-minces ou de nanomatériaux pose le problème de leur caractérisation. Effectivement, dans le cas de dépôt très fins, les mesures mécaniques ou optiques usuelles ne peuvent pas être mises en œuvre. Une première étude réalisée par la société HEF a permis d'identifier la spectrophotométrie UV-visible en transmission en tant que technique pouvant être utilisée pour un premier criblage des quantités d'argent déposées. Par la suite, une caractérisation plus précise des dépôts d'argent par traitement plasma a été faite par le LSA (Université Lyon 1, Lyon) et la société Science et Surface (Ecully) avec les techniques d'analyse de surface XPS, SIMS, ToF-SIMS et MET.
Pour faire cette caractérisation par transmission optique, des dépôts ont été réalisés sur lame de verre car sur textiles, les mesures sont plus complexes du fait de la rugosité et de la porosité de ces derniers rendant les mesures peu précises avec cette technique. La figure 4-1 montre les spectres en transmission de films d'argent dont les épaisseurs varient de 1 à 20 nm pour les dépôts sur lames de verre.

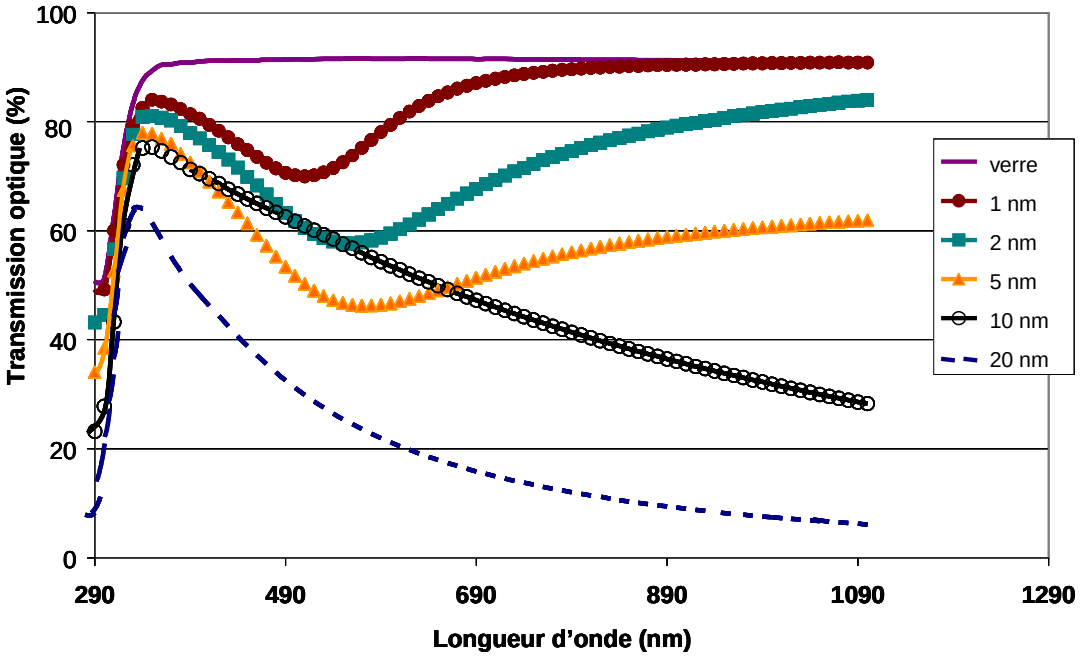


Figure 4-1 : Spectres de transmission optique des différents films d'argent déposés sur lames de verres (1 à 20 nm) obtenu avec le spectromètre lambda 35 de Perkin Elmer (Wellesley, USA).

Dans le cas de la lame de verre seule sans traitement plasma, la transmission est d'environ 90 % ce qui est logique puisqu'aucun dépôt n'empêche le passage de la lumière UV.

Pour des lames de verres traitées par plasma simple couche d'argent avec des épaisseurs déposées allant de 1 à 20 nm, le taux de transmission diminue avec l'épaisseur pour des longueurs d'ondes supérieures à 700 nm. En effet, pour l'épaisseur la plus faible (1 nm) le taux de transmission apparaît le plus fort (environ 90 %) proche de la lame de verre sans traitement et pour l'épaisseur la plus forte (20 nm), le taux de transmission apparaît le plus faible (environ 10 %). Toutefois, pour des épaisseurs inférieures à 10 nm, le film semble être discontinu et fait apparaître des bandes d'absorption plasmoniques entre 500 et 600 nm ce qui se traduit sur le graphique par des variations (diminution du taux de transmission de façon brutale) au niveau du taux de transmission dans cette zone. Ces résultats sont habituellement expliqués par la résonance plasmonique [1] qui représente la signature des nanostructures métalliques. La bande comprise entre 500 et 600 nm est attribuée à l'excitation collective des électrons dans les particules avec des changements périodiques de ces électrons à la surface ce qui définit l'absorption plasmonique de surface [2]. Le plasmon de surface est une onde à décroissance exponentielle des deux côtés de l'interface séparant un métal (ici l'argent) d'un milieu diélectrique sans pertes (ici le verre). C'est donc ici l'interface verre/argent qui est détectée. Dans l'étude de Vimala *et al.* [3], la bande d'absorption plasmonique de nanoparticules d'argent se situe aux alentours de 433 nm. Dans notre étude, l'absorption plasmonique se situe entre 500 et 600 nm.

Cette caractérisation de lames de verre après traitement plasma à l'argent a permis dans un premier temps de détecter ces dépôts très fins avant de les caractériser ensuite sur textiles par des techniques d'analyse de surface telles que la technique XPS ou la technique ToF-SIMS. Dans un premier temps, cette caractérisation par spectroscopie UV-visible en transmission réalisée par la société HEF, a permis de mettre en évidence la présence de nanostructures métalliques. En effet lorsque les couches sont les plus épaisses (entre 200 et 400 Å) des nanoparticules d'argent se forment et le dépôt parait donc moins homogène. Par la suite, des dépôts d'argent identiques à ceux faits sur lames de verre par plasma simple couche ont été réalisés dans un premier temps sur 2 types de textiles : textiles 65 % polyester - 35 % coton (P/C) et textiles 65 % coton - 35 % polyester (C/P). Après dépôt, les textiles étaient dans les deux cas colorés. La coloration des textiles était visible même pour les couches d'argent déposées d'épaisseurs les plus faibles (10 à 20 Å) et quel que soit le support utilisé. Cette coloration est certainement due à l'oxydation de l'argent par l'oxygène de l'air (Figure 4-2). En effet, la plupart des métaux sont chimiquement réactifs, en particulier vis à vis de l'oxygène de l'air avec lequel ils forment des oxydes.

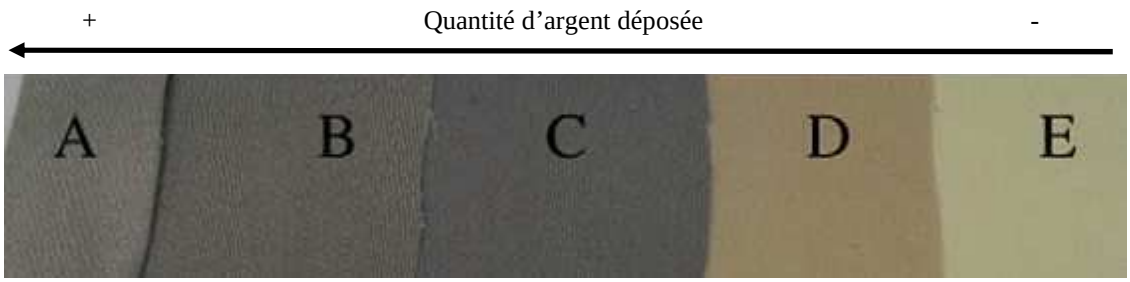


Figure 4-2 : Echantillons de textiles C/P traités sur lesquels différentes épaisseurs d'argent ont été déposées
A: 400 Å, B: 200 Å, C: 100 Å, D: 20 Å, E: 10 Å

Les clichés ont été pris sur des textiles C/P (figure 4-2) mais la coloration était identique pour des textiles P/C. Une coloration jaune orangée est observée pour les textiles traités avec les plus faibles épaisseurs d'argent (10 et 20 Å) et une coloration gris clair à gris foncé apparaît pour les textiles traités avec les plus fortes épaisseurs d'argent (100, 200 et 400 Å).

Pour évaluer de façon plus précise les différences observées entre les textiles traités avec différentes épaisseurs d'argent, des mesures de couleurs ont été réalisées sur des textiles traités et non traités à l'aide d'un colorimètre et du système CIE L-a-b. Ce système a été utilisé pour évaluer les paramètres de couleurs des 5 échantillons de textiles traités par plasma avec des épaisseurs d'argent plus ou moins fortes (10, 50, 100, 200 et 400 Å pour le textile P/C et 10, 20, 100, 200 et 400 Å pour le textile C/P). Les résultats de ces mesures sont présentés dans le tableau 4-1. Dans le système CIE L-a-b, la valeur de « L » représente le paramètre "clair-sombre" et va de 0 à 100 avec 0 pour le blanc et 100 pour le noir. Les valeurs de « a » vont de -50 à + 50, peuvent être positives (rouge) ou négatives (vert) et les valeurs de « b » vont de -50 à + 50 et peuvent être négatives (bleu) ou positives (jaune).

Enfin, la différence totale de couleur est donnée par la formule $\Delta E = \sqrt{((\Delta L)^2 + (\Delta a)^2 + (\Delta b)^2)}$ où ΔL, Δa et Δb représentent respectivement les différences de mesure entre un textile non traité et un textile traité par plasma à l'argent pour les paramètre L, a et b. Plus cette valeur est faible plus les échantillons ont des couleurs proches.

Tableau 4-1 : Mesures de couleurs des textiles P/C (A) et C/P (B) traités plasma et non traités suivant le système CIE L*a*b quelques jours après le traitement et conservation dans du papier d'aluminium à l'obscurité.

A

	Epaisseur d'argent (Å)	L	a	b	ΔE
Textiles P/C	Non traité	93,90	0,06	0,02	-
	400	64,62	-0,53	7,39	30,50
	200	63,01	0,06	6,93	31,92
	100	59,14	0,50	5,53	35,39
	50	61,44	0,97	4,13	32,90
	10	88,87	-0,95	17,66	19,47

B

	Epaisseur d'argent (Å)	L	a	b	ΔE
Textiles C/P	Non traité	93,93	0,10	-0,08	-
	400	70,93	0,36	-0,69	24,28
	200	60,47	0,20	0,03	34,04
	100	56,41	0,04	0,40	37,80
	20	79,43	0,67	2,81	26,26
	10	89,86	0,26	-2,07	18,13

D'une façon générale, d'après le tableau 4-1, plus l'épaisseur augmente, plus les valeurs de « L » diminuent pour des épaisseurs comprises entre 10 et 100 nm que ce soit pour les textiles C/P ou P/C. En effet, pour une épaisseur de 100 Å la valeur de L est de 59,14 et de 56,41 respectivement pour les textiles P/C et C/P alors que pour une épaisseur de 10 Å la valeur de L est de 88,87 et 89,86, respectivement pour les textiles P/C et C/P. Ces résultats montrent que, pour les textiles C/P et P/C, les textiles traités à l'argent par méthodologie plasma sont plus sombres que les textiles non traités.

Pour ce qui est de la couleur représentée par les variables « a » et « b », il n'y a pas de différence statistique entre les textiles C/P et P/C d'après le test de Fisher ($p < 0,05$). Il apparaît également que les valeurs de ΔE les plus faibles sont obtenues pour des épaisseurs d'argent déposées les plus faibles également : pour une épaisseur de 10 Å, les valeurs de ΔE sont de 19,47 et 18,13 respectivement pour les textiles P/C et C/P alors que pour une épaisseur de 400 Å, les valeurs de ΔE sont de 30,50 et 34,28 respectivement pour les textiles P/C et C/P. Quel que soit le textile utilisé (C/P ou P/C), il faut donc un dépôt inférieur à 10 Å pour avoir une couleur qui se rapproche de celle d'un textile non traité. De plus, il faut également noter que la composition du textile (C/P ou P/C) n'influence pas la coloration de ces derniers lors du traitement plasma à l'argent. En effet, aucune différence de couleur entre un textile C/P et un textile P/C n'a été observée. L'épaisseur des dépôts d'argent devra donc être maîtrisée afin de ne pas obtenir de coloration des textiles pour une utilisation finale. En effet, en industries agro-alimentaires, les vêtements de travail sont blancs dans la plupart des entreprises et la couleur ne doit donc pas être un critère d'élimination de ces textiles lors du choix par les utilisateurs du vêtement de protection proposé.

Une fois traité à l'argent par plasma, la composition chimique des dépôts sur les textiles a été analysée avec les techniques d'analyse de surface SIMS (Science et Surface) et ToF-SIMS (LSA).

1.2. Caractérisation par ToF-SIMS des textiles après dépôt d'argent par méthodologie plasma en simple couche

Il a été observé que la quantité d'argent déposée en surface des textiles était vraisemblablement importante car elle était capable d'entraîner une coloration visuelle des textiles du jaune au gris foncé selon l'épaisseur du dépôt. La détection visuelle de l'argent à la surface des textiles laisse donc présager une détection aisée par la technique ToF-SIMS qui est sensible et précise. Les analyses par spectrométrie de masse d'ions secondaires à temps de vol (ToF-SIMS) ont donc permis de détecter l'argent à l'extrême surface, c'est-à-dire jusqu'à quelques monocouches de profondeur à partir de la surface des différents échantillons analysés.

Rappelons que la spectrométrie de masse est une technique d'analyse qui permet de déterminer des structures chimiques des molécules en les fragmentant *via* la séparation en phase gazeuse d'ions atomiques et moléculaires en fonction de leur rapport masse/charge (m/z). La technique ToF-SIMS est une technique permettant de détecter des composés en surface d'un matériau.

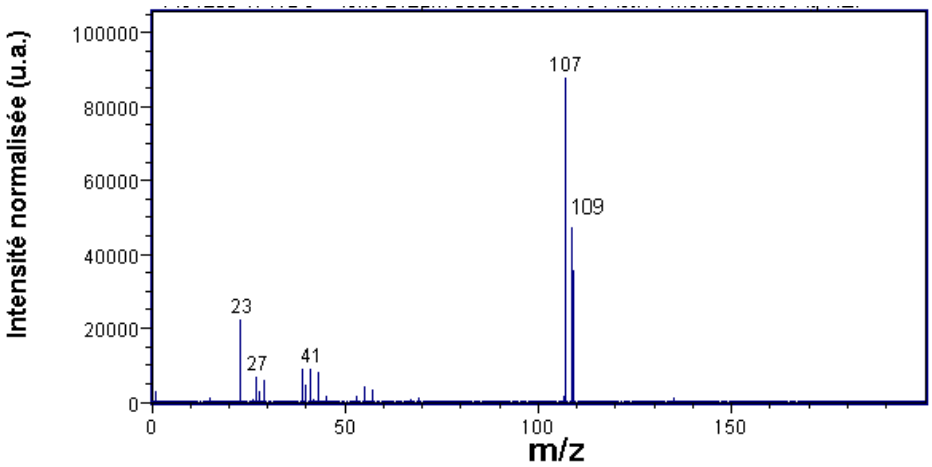


Figure 4-3 : Spectre ToF-SIMS en mode positif d'un textile P/C traité avec la plus faible quantité d'argent (10 Å). n =3 (Isotopes de l'argent : m/z=107 et 109)

La figure 4-3 représente un spectre ToF-SIMS réalisé par le LSA sur un textile ayant subi un traitement à l'argent déposé en une simple couche d'épaisseur moyenne de dépôt de 10 Å. Plusieurs pics apparaissent sur cette figure et représentent les composants présents à l'extrême surface du textile traité. Les pics m/z = 107 et m/z = 109 correspondent aux isotopes de l'argent (m/z correspondant au rapport masse/charge). Il faut noter que ces 2 pics sont représentés en majorité sur le spectre, ce qui indique bien que l'argent est dominant lors de

l'analyse de l'extrême surface d'un textile traité par plasma à l'argent même s'il s'agit de l'épaisseur la plus faible (10 Å). Cela semble logique puisque la technique ToF-SIMS analyse les premières monocouches de la surface de l'échantillon et possède une sensibilité de l'ordre du ppm-ppb (partie par million ou par milliards) [4]. Le pic m/z = 23 correspond à l'isotope du sodium et des pics hydrocarbonés sont situés entre les pics de l'argent et celui du sodium.

Ces résultats montrent que l'argent est largement détecté à l'extrême surface d'un textile traité avec la plus faible épaisseur d'argent et y est présent en majorité. Même pour le dépôt de faible épaisseur, la quantité d'argent déposée reste donc très importante et pourra être réduite par la suite. Des cinétiques de croissance de *L. innocua* LRGIA 01 et des mesures d'activités anti-*Listeria innocua* LRGIA 01 de ces textiles vont ensuite être réalisées dans le but d'évaluer la relation entre les techniques de dépôt de l'argent sur les textiles, les quantités d'argent correspondantes déposées et l'activité antimicrobienne de ces textiles.

1.3. Cinétique de croissance de *Listeria innocua* LRGIA 01 et activité antimicrobienne de textiles traités

Les cinétiques de croissance de *L. innocua* LRGIA 01 sur ces textiles sont présentées dans la figure 4-4 pour les textiles C/P et pour les textiles P/C.

Pour évaluer la croissance des souches à tester sur textiles témoins, à chaque expérimentation, une cinétique de croissance sur textile équivalent au textile traité sans le traitement a été réalisée. La croissance de *L. innocua* LRGIA 01 a donc été évaluée sur des textiles témoins à 65 % de coton (C/P) et à 65 % de polyester (P/C) non traité.

Comme indiqué dans la section « matériels et méthodes », le nombre de cellules de *L. innocua* LRGIA 01 initialement déposé sur textiles est d'environ 5 log UFC/g. D'après les 2 graphiques de la figure 4-4 immédiatement après ce dépôt, le nombre de bactéries dénombrées après décrochage du textile (5 log UFC/g) est sensiblement le même que le nombre de bactéries déposées et ce pour les 2 types de textiles. Par la suite, des dénombrements après décrochage sont réalisés après plusieurs temps de contact entre *L. innocua* LRGIA 01 et le textile témoin. Il faut également noter qu'une étape de rinçage est ajoutée à partir de 4 h de contact pour éliminer les bactéries qui n'ont pas adhéré au textile.

L'évolution du nombre de bactéries au cours du temps pour les 2 textiles témoins (C/P et P/C) apparaît similaire. En effet, depuis le moment de l'inoculation (t = 0) jusqu'à 8 h de contact, la population bactérienne croît de 2 log UFC/g. Après 8 h de contact, la population

bactérienne sur le textile se stabilise à 7 log UFC/g. Ces résultats suggèrent que *L. innocua* LRGIA 01 est capable d'adhérer et de se multiplier sur textiles témoins C/P et P/C en conditions saturées en humidité. De plus, la norme ISO 20743/2005 préconise une croissance minimum de 2 log en 24 h sur le textile témoin pour valider l'expérience de détermination de l'activité antimicrobienne d'un textile traité par rapport à un témoin.

Ces expérimentations ont été réalisées dans une atmosphère saturée en humidité pour mimer les conditions les plus favorables à la croissance. Beresford *et al.* [5] ont montré que les cellules de *Listeria monocytogenes* étaient capables d'adhérer rapidement (en moins de 2 h) à des surfaces inertes rencontrées en agro-alimentaire tels que le polypropylène, la gomme, le verre ou encore l'acier inoxydable. Ces auteurs ont montré qu'après une rapide immersion dans une suspension de cellules à environ 10^8 UFC/mL une quantité importante des cellules (environ 4 log) décrochées par ultrasons d'un coupon de 0,8 x 0,8 cm de polypropylène, gomme, verre et acier était capable d'adhérer à toutes les surfaces testées. Après 2 h de contact ces mêmes cellules sont capables d'adhérer de façon très forte au support quel qu'il soit et le nombre de cellules dénombrées après décrochage du coupon avait augmenté d'environ 2 log (UFC/mL). Les travaux de Takahashi *et al.* [6] ont mis en évidence la corrélation entre adhésion de *L. monocytogenes* au PVC et l'interaction de cette même souche avec les solvants apolaires (décane et hexadécane) par la méthode de MATS. Ces résultats ont donc montré que l'hydrophobicité des cellules jouerait un rôle dans l'adhésion de ces dernières au PVC. En effet, ce matériau est hydrophobe et possède des propriétés acide base au sens de Lewis neutres. Des études ont mis en évidence que l'adhésion initiale de *L. monocytogenes* impliquerait des forces physico-chimiques entre les propriétés de surface de la bactérie et les propriétés de la surface sur laquelle elle va adhérer. Par exemple, Briandet *et al*. [7] ont montré que l'affinité des cellules bactériennes de *L. monocytogenes* à l'acétate d'éthyle était corrélé à l'adhésion de ces dernières à l'acier inoxydable ce qui indiquerait des similarités des propriétés acide base au sens de Lewis de l'acier inoxydable et de l'acétate d'éthyle. Ceci montre bien que l'attachement initial de *L. monocytogenes* à des surfaces hydrophobes dépendrait de l'hydrophobicité cellulaire de cette dernière.

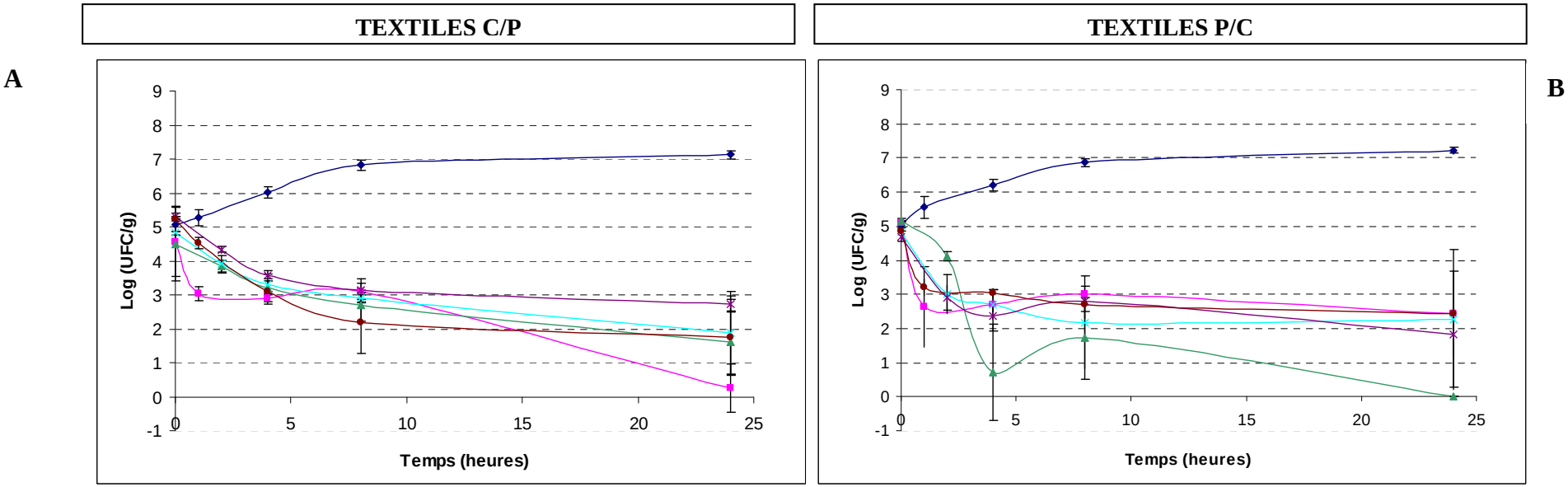


Figure 4-4 : Cinétique de croissance de *L. innocua* LRGIA 01 sur textiles C/P (A) et P/C (B) non traités (◆) et traités par méthodologie plasma avec de l'argent (simple couche) avec des épaisseurs d'argent déposé de 10 Å (■) 20 ou 50 Å (▲) 100 Å (X) 200 Å (*) 400 Å (●). n = 2

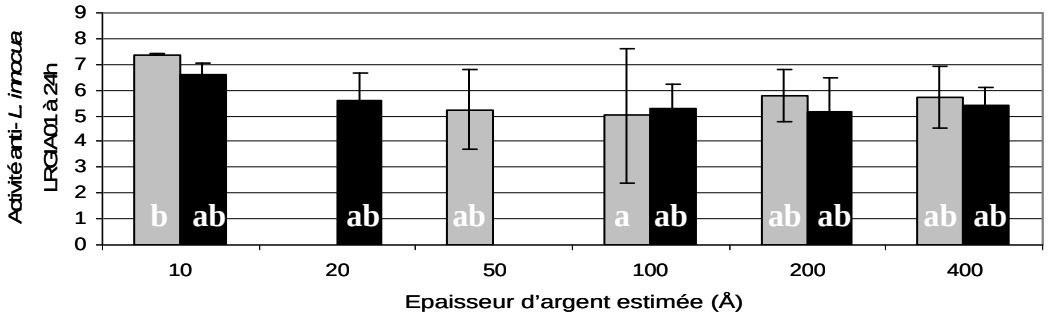


Figure 4-5 : Activités antimicrobiennes vis-à-vis de *L. innocua* LRGIA 01 sur textiles C/P et P/C traités par méthodologie plasma avec de l'argent (simple couche) après 24 h de contact selon la norme ISO 20743-2005 C/P (■) et P/C (■). n = 2. Chaque lettre (a ou b) indique un groupe statistique homogène. Les nombres représentés par les lettres a ou b dans chaque cas sont différentes (a<b). Les résultats avec différentes lettres sont ainsi significativement différenciés par le test de Fisher (p<0,05).

Comme l'ont décrit ces auteurs et en comparaison des résultats obtenus pour *L. innocua* LRGIA 01 sur textiles témoins, cette souche est capable d'adhérer au textile. Dans l'article d'Oulahal *et al.* [8], les auteurs ont voulu tester la survie *in situ* de *L. innocua* et *S. aureus* en fonction des paramètres de température appliqués sur des surfaces de l'industrie agro-alimentaire (acier inoxydable, polypropylène) en contact. De plus les micro-organismes cibles ont été mis en contact avec du lait cru, du lait pasteurisé et du caillé fromager. Ces auteurs ont mis en évidence que les 2 souches testées étaient capables d'adhérer à des surfaces telles que l'acier inoxydable ou le polypropylène et par la suite capables de s'accumuler sur ces surfaces en 8 jours (formation de biofilm). La survie des ces micro-organismes au sein de ces biofilms dépend directement de la source de nutriments et de la température. En effet, la population de *L. innocua* augmente de 3,6 ± 0,2 log (UFC/cm^2) à 12°C mais aucune cellule n'est détectée à 25°C sur acier inoxydable en présence de caillé fromager et les résultats sur polypropylène diffèrent avec 3,0 ± 0,5 log (UFC/cm^2) en 8 h à 25°C en présence de fromage. Ces résultats peuvent être comparés à ceux obtenus avec *L. innocua* LRGIA 01 sur textiles avec une croissance d'environ 2 log UFC/g en 8 h.

Les résultats obtenus par Beresford *et al.* [5] pour *L. monocytogenes* sur l'acier inoxydable ou le polypropylène sont comparables à ceux obtenus pour *L. innocua* LRGIA 01 sur textile c'est-à-dire une rapide adhésion des cellules (en moins de 2 h pour *L. monocytogenes* et en moins de 4 h pour *L. innocua* LRGIA 01) mais également une croissance de ces cellules sur le support testé (augmentation de 2 log en 2 h pour *L. monocytogenes* et de 2 log en 8 h pour *L. innocua* LRGIA 01). Le milieu utilisé dans les 2 cas est comparable puisqu'il s'agit du TSB (Tryptone Soy Broth) dilué 20 fois dans notre cas et à 20 % (m/v) dans l'article de Beresford *et al.* [5] de façon à ne pas fournir trop de nutriments aux cellules bactériennes lors de l'adhésion de ces dernières aux supports testés.

L'adhésion aux surfaces inertes dépend également des souches bactériennes [9] et du type de substrat [10]. En effet, Harvey *et al.* [9] ont montré que la production de biofilm par *L. monocytogenes* était plus importante dans un milieu MWB (Modified Welshimer's Broth) qui est un milieu minimum défini, que dans du TSB, un milieu riche mais empirique alors que les cellules planctoniques étaient capables de croître de la même façon dans les 2 milieux. Dans le cadre de cette étude, le même milieu a été employé tout au long des expérimentations afin de pouvoir comparer entre eux les résultats obtenus avec les différents textiles traités ou non avec des agents antimicrobiens.

Sinde *et al.* [10] ont quant à eux mis en évidence des différences d'adhésion d'une souche de *L. monocytogenes* par rapport à une souche de *Salmonella*. Les différences trouvées dans le degré d'adhésion de ces 2 souches, indiquent qu'il existe certains facteurs à la surface des bactéries, hormis les différences d'hydrophobicité, qui contribuent à l'adhésion des bactéries sur des surfaces inertes tels que l'énergie libre de surface. En effet, l'énergie libre de surface serait liée de façon plus importante à l'adhésion des bactéries aux surfaces inertes que le nombre de cellules déposé au départ.

Dans notre étude, *L. innocua* LRGIA 01 a été choisie car il s'agit d'une souche proche de *L. monocytogenes*. La souche de *L. innocua* LRGIA 01 retenue dans le cadre du projet Actiprotex est capable d'adhérer au textile de façon assez rapide. En effet, dans le protocole une étape de rinçage permettant d'éliminer les cellules n'ayant pas adhéré au textile a été mise en place dès 4 h de contact. A la vue du dénombrement après 4 h de contact, il est possible de dire que cette souche est capable d'adhérer au textile en moins de 4 h. Elle est également capable de s'y multiplier (en moins de 4 h). En effet entre 1 h et 4 h de contact, pour les 2 types de textiles (C/P et P/C), la croissance est d'environ 1 log (UFC/g). A partir de 8 h de contact, la croissance semble arriver à un plateau. Le textile est un support pour la croissance des micro-organismes mais on peut supposer qu'à un certain stade la quantité de nutriments présents à sa surface ne suffise plus pour entrainer une croissance des cellules. Il faut cependant souligner que l'étude de la croissance n'a pas été réalisée entre 8 h et 24 h et que l'évolution du nombre de cellules ces 2 temps n'est donc pas connu.

Les textiles ont été préparés avec différentes épaisseurs d'argent (10, 20, 100, 200, 400 Å pour les textiles C/P et 10, 50, 100, 200, 400 Å pour les textiles P/C) par traitement plasma et les dépôts ont été faits par simple couche d'argent. Les cinétiques de croissance ont été suivies de la même manière que pour le textile témoin. La figure 4-4 A et B montre une inhibition de *L. innocua* LRGIA 01 dès 1h de contact et ce jusqu'à 24h de contact pour l'ensemble des épaisseurs d'argent déposées et pour les 2 types de textiles. Au vu des différents écarts types, il n'apparaît pas de différence significative d'activités antimicrobiennes en fonction de l'épaisseur de la couche d'argent déposé. Cette inhibition se traduit par une diminution de 5 à 7 log UFC/g selon les textiles par rapport au témoin après 24 h d'incubation.

Une épaisseur de 10 Å d'argent sur les textiles C/P ou P/C est apparue suffisante pour obtenir une diminution importante (7 log UFC/g), par conséquent il n'est pas nécessaire de déposer une épaisseur plus importante d'argent pour que le textile soit actif vis-à-vis de *L. innocua* LRGIA 01. Cette information est très importante par rapport à la coloration des échantillons.

Ces résultats semblent indiquer qu'il est possible de déposer une quantité plus faible d'argent pour entraîner une forte inhibition de cette souche et qu'il sera donc indispensable de maîtriser la quantité d'argent déposée sur les textiles que ceux-ci soient majoritairement en coton ou en polyester afin de limiter la coloration du textile tout en conservant une activité antimicrobienne suffisante. Il a en effet été montré précédemment que même une épaisseur d'argent de 10 Å entraînait une faible coloration du textile par rapport à un textile témoin non traité.

La norme ISO 20743/2005 préconise de calculer l'activité antimicrobienne (A) des textiles fonctionnalisés après 24 h de contact avec la souche bactérienne à tester. Ce calcul se réalise ensuite en comparant les résultats obtenus pour le textile traité à ceux obtenus avec un textile témoin de même nature (C/P ou P/C) non traité suivant la formule suivante :

$$A = (\log C_{24} - \log C_0) - (\log T_{24} - \log T_0)$$

- C_{24} : nombre de bactéries dénombrées après 24 h de contact avec le textile témoin,
- C_0 : nombre de bactéries dénombrées après 24 h de contact avec le textile témoin à t = 0 c'est-à-dire immédiatement après l'inoculation,
- Log T_{24} : nombre de bactéries dénombrées après 24 h de contact avec le textile traité,
- $\log T_0$: nombre de bactéries dénombrées après 24 h de contact avec le textile traité à t = 0 c'est- à-dire immédiatement après l'inoculation.

La figure 4-5 présente les activités antimicrobiennes vis-à-vis de *L. innocua* LRGIA 01 sur les textiles traités C/P et P/C.

D'après la norme ISO 20743/2005, pour qu'un textile soit considéré comme « actif » vis-à-vis d'une souche bactérienne, il faut que son activité antibactérienne à 24 h soit supérieure à 2. Selon les résultats obtenus, les activités antimicrobiennes vis-à-vis de *L. innocua* LRGIA 01 sont toutes supérieures à 2 pour les textiles sur lesquels une monocouche d'argent a été déposée par traitement plasma. En effet, que ce soit pour une épaisseur de 10 Å ou une épaisseur de 400 Å, l'activité anti- *L. innocua* à 24h apparaît forte : 6,3 ± 0,3 et 7,4 ± 0,1 respectivement pour le textile C/P et le textile P/C pour une épaisseur de 10 Å et 5,4 ± 1,0 et 4,5 ± 1,2 respectivement pour C/P et P/C pour une épaisseur de 400 Å. Pour les épaisseurs intermédiaires, les activités sont également comprises entre 5 et 6. Ces résultats montrent que la couche d'argent de 10 Å d'épaisseur déposée est amplement suffisante pour inhiber *L. innocua* LRGIA 01. D'après l'étude statistique réalisée (test de Fisher avec $p < 0,05$), il

semblerait qu'il y ait seulement une différence d'activités antimicrobiennes entre les textiles traités avec une épaisseur d'argent de 10 Å et de 100 Å pour les textiles P/C avec une activité plus marquée pour le textile avec la couche d'argent la plus faible (10 Å). Pour les autres textiles aucune différence significative d'activité antimicrobienne n'a pu être mise en évidence en fonction de l'épaisseur d'argent déposée. Il n'est donc pas nécessaire de déposer une épaisseur d'argent supérieure à 10 Å pour obtenir une bonne activité antimicrobienne.

De nombreuses études ont montré qu'une faible concentration en argent était suffisante pour induire une importante diminution de la population bactérienne [11-14]. En effet, Berger *et al.* [11] ont observé que toutes les souches testées, Gram + : *S. aureus*, Streptocoques du groupe D et Gram - : *E. coli*, *P. aeruginosa*, *Proteus mirabilis*, *Serratia spp.*, dans cette étude étaient inhibées en 24 h par une concentration en argent inférieure ou égale à 1,25 µg/mL et tuées par une concentration en argent inférieure ou égale à 10,05 µg/mL. L'ajout de 900 ppm d'une solution d'argent a entrainé une diminution exponentielle de la population d'*Escherichia coli*, de 10^7 UFC.mL^{-1} à 10^6 UFC.mL^{-1} en 3 h et jusqu'à 10 UFC.mL^{-1} en 24 h [14].

Wang *et al.* [15] ont déposé par traitement plasma, des films nanostructurés d'argent à la surface de textiles non tissés. La réduction du nombre de cellules d'*E. coli* a été mesurée en mettant en contact les coupons traités avec les cellules pendant 1 h et en décrochant et dénombrant les cellules en milieu gélosé. Ces auteurs ont montré qu'une épaisseur de film d'argent de 1 nm était capable d'inhiber 86 % de la population bactérienne de départ d'*E. coli*. L'augmentation de l'épaisseur du film à base d'argent a résulté en une augmentation graduelle des propriétés antibactériennes : pour des épaisseurs respectives de 0,5, 1, 2 et 3 nm d'argent les pourcentages de réduction d'*E. coli* étaient respectivement de 8,3, 86,9, 100 et 100 %. Dans notre cas, quelle que soit l'épaisseur d'argent déposée (de 10 à 400 Å) à la surface du textile, l'activité antimicrobienne est restée toujours aussi importante. On peut donc supposer que l'épaisseur « seuil », pour laquelle l'activité antimicrobienne est maximale, est donc dépassée. L'épaisseur déposée par simple couche par traitement plasma est donc probablement trop importante et devra donc être diminuée. Dans notre cas, une quantité de 10 Å déposée à la surface du textile suffit à obtenir une activité antimicrobienne marquée avec une coloration plutôt faible mais encore « jaune ». Dans la suite de l'étude, la quantité d'argent a été diminuée dans le but d'obtenir des textiles non colorés mais aussi parce qu'il a été suggéré qu'il est impératif d'avoir une concentration d'argent la plus faible possible afin d'éviter la cytotoxicité éventuelle d'un textile vis-à-vis de la personne qui le porte par exemple.

2. Etude de la répartition des micro-organismes après contact avec un textile traité à l'argent par méthode plasma par MEB : exemple d'un textile C/P traité par dépôt d'une simple couche d'argent de 10 Å

Des analyses de la topographie de surface d'échantillons de textiles traités ou non par méthodologie plasma et en contact ou non avec *L. innocua* LRGIA 01 ont été réalisées par MEB. Un type d'échantillon a été choisi pour ce type d'analyse, le textile C/P traité par l'argent en simple couche de 10 Å. Ce textile a été choisi car il possède une bonne activité antimicrobienne vis-à-vis de cette souche. Les principales images de ces analyses sont présentées dans la figure 4-6.

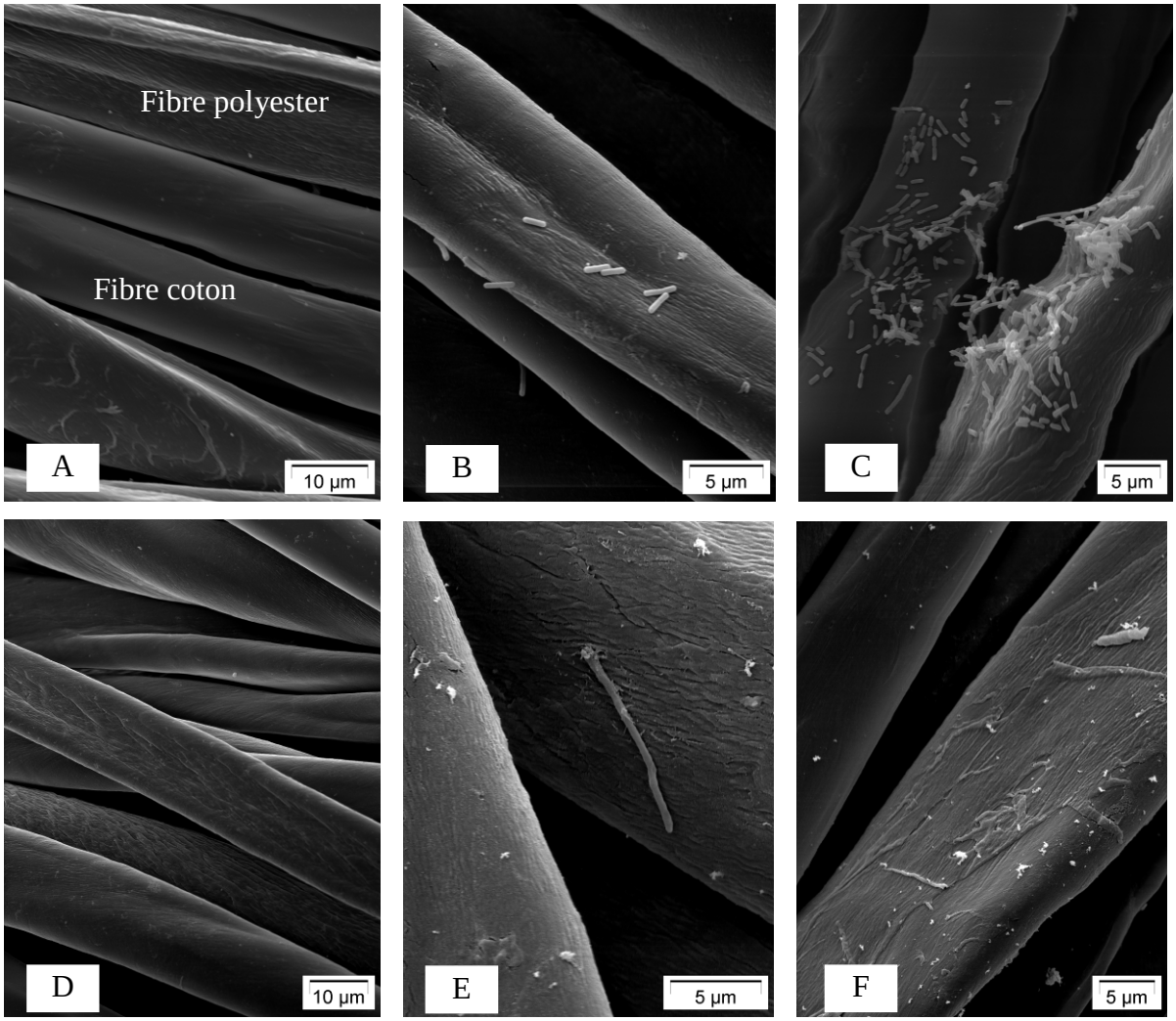


Figure 4-6 : Clichés de microscopie électronique à balayage (MEB) de la surface des échantillons de textiles C/P. Textile non traité sans bactérie (A), textile non traité avec bactéries en contact pendant 8 h (B), textile non traité avec bactéries en contact pendant 24 h (C), textile traité par méthodologie plasma avec un dépôt simple couche de 10 Å sans bactérie (D), textile traité par méthodologie plasma avec un dépôt simple couche de 10 Å avec bactéries en contact pendant 8 h (E), textile traité par méthodologie plasma avec un dépôt simple couche de 10 Å avec bactéries en contact pendant 24 h (F).

Les clichés du textile non traité sans bactérie (figure 4-6 A) révèlent la structure typique des fibres de coton et des fibres de polyester. Les fibres de coton apparaissent plus irrégulières que les fibres de polyester. En effet, ces fibres sont des fibres naturelles contrairement au polyester qui est une fibre synthétique. Le traitement plasma n'entraîne pas de modification au niveau des fibres de coton et de polyester puisqu'aucun changement visuel n'est observé au MEB (figure 4-6 D). Sur la totalité de l'échantillon, aucun changement n'a pu être mis en évidence au niveau des fibres. Les clichés présentés dans cette figure sont représentatifs de la totalité de la surface quel que soit l'échantillon analysé (témoin ou traité plasma).

Après 8 h (figure 4-6 B) et 24 h (figure 4-6 C) de contact entre le textile non traité et *L. innocua*, des bactéries apparaissent sur les observations. Après 24 h de contact, beaucoup plus de bactéries sont observées au niveau des fibres et les cellules de *L. innocua* semblent former des micro-colonies. La présence de *L. innocua* LRGIA 01 à la surface des textiles non traités est évidente et des agrégats de cellules ainsi que des cellules en phase de division cellulaire peuvent être observées. Ces résultats sont en accord avec les résultats des dénombrements sur milieux gélosés réalisés et confirment que les textiles témoins non traités sont de bons supports pour la croissance des micro-organismes [16,17] et dans notre cas pour *L. innocua* LRGIA 01.

Pour les textiles traités, seules des cellules isolées ont pu être observées après 8 h de contact (figure 4-6 E) et plus aucune bactérie n'a été observée après 24 h de contact (figure 4-6 F). Les cellules observées sur textiles traités après 8 h de contact sont différentes de celles observées sur textile témoin non traité, elles apparaissent plus longues, déformées. De plus, il n'existe aucun signe de division cellulaire. L'augmentation de la longueur des cellules pourrait être un signe de dommages cellulaires dus aux composés antimicrobiens déposés sur le textile. Lindsay *et al.* [18] ont montré que des agents oxydants comme le chlore entraînent une augmentation de la longueur des cellules de *Pseudomonas fluorescens* au sein d'un biofilm. DeQueiroz *et al.* [19] ont quant à eux montré que les cellules de *P. aeruginosa* présentaient des déformations après 1 et 5 minutes d'exposition à un mélange de peroxyde d'hydrogène à 2500 mg/L et d'hypochlorite de sodium à 25000 mg/L. Il faut cependant noter que les dépôts observés sur les fibres après 24 h de contact sont probablement aussi dus au traitement par le tampon cacodylate employé lors de la préparation des échantillons.

Ces différentes observations confirment que *L. innocua* LRGIA 01 n'est pas capable de se multiplier sur textile traité à l'argent par méthodologie plasma et est inhibée par ce dernier. Le contact de ces cellules avec ces textiles entraîne même une déformation des cellules due probablement à l'action antimicrobienne de l'argent.

3. Evaluation de l'activité antimicrobienne d'un textile traité par plasma : dépôt simultané Ag-SiOCH

Les dépôts simple couche d'argent se sont avérés avoir une très bonne activité vis-à-vis de *L. innocua* LRGIA 01 même avec la plus faible épaisseur déposée (10 Å). Cependant la coloration de ces textiles restait beaucoup trop importante pour la plupart des applications commerciales en particulier dans le secteur agro-alimentaires où les vêtements de travail sont généralement blancs. Dans un second temps, un dépôt mixte PVD (Physical Vapor Deposition) / PECVD (Plasma-Enhanced Chemical Vapor Deposition) a donc été mis en place dans le but de déposer simultanément de l'argent et du $Si_xO_yC_zH_w$ noté par la suite SiOCH et par conséquent de pouvoir déposer des quantités plus faibles d'argent dans le but d'obtenir des textiles non colorés mais aussi afin de déposer une couche « protectrice » de l'argent.

Par la suite un seul type de textile (P/C) a été choisi pour les dépôts simultanés ou avec encapsulation. En effet, l'utilisation d'échantillons de tissu dans une enceinte à vide pose le problème du dégazage dans l'enceinte de dépôt : tout matériau sous vide perd l'eau adsorbée à sa surface en provenance de l'atmosphère extérieure. La quantité d'eau dégazée est d'autant plus importante que la surface spécifique du matériau est élevée et que le matériau est hydrophile ce qui est le cas du coton. De plus, le tissu peut contenir des composés volatils propres à sa composition ou issus des procédés de fabrication. Sous vide ces composés vont se désorber et peuvent être à l'origine de variations de pression, de contaminations des matériaux déposés et peuvent modifier le mode de croissance des dépôts, voire altérer l'adhésion du film. Une étude de dégazage préalable a donc été réalisée par la société HEF. Grâce à cette étude, il a été mis en évidence que la quantité de coton dans le tissu retarde la descente en vide d'une façon importante, c'est pour cela que pour la suite des essais, le textile 65 % polyester – 35 % coton (P/C) a été retenu.

Dans une première partie, la méthode de traitement est présentée, puis, par la suite les résultats des caractérisations de surface par XPS du traitement antimicrobien (réalisées par la société Science et Surface dans le cadre de la thèse de Céline Brunon) sont présentés et enfin l'action de ces textiles sur *L. innocua* LRGIA 01.

3.1. Méthode de dépôt simultané Ag-SIOCH par traitement plasma

L'influence de la puissance et de la pression a été examinée par la société HEF lors des dépôts plasma dans le but de contrôler l'épaisseur du dépôt et par conséquent la couleur. Différentes combinaisons de mélanges de gaz, pressions et puissances ont été employées au niveau de la cathode de pulvérisation dans le but de réaliser un dépôt simultané de 2 composants à l'aide de 2 sources plasma. Dans un premier temps, des sources PVD et PECVD ont été utilisées en même temps dans le but de déterminer les conditions lors du procédé plasma pour réaliser les dépôts sur les textiles dans de bonnes conditions, c'est-à-dire dans le but de maîtriser les quantités d'argent et de SiOCH déposées. Le procédé PVD a été réalisé avec une pression d'argon (Ar) de $2{,}2.10^{-1}$ Pa (puissance : 100 W) alors que pour le procédé PECVD les pressions d'O_2 et d'HMDSO (hexaméthyldisiloxane $O\text{-}(Si\text{-}(CH_3)_3)_2$), le précurseur, étaient de 1,7 Pa (puissance: 150 W). L'étape de dépôt de l'argent était très rapide dans le but d'obtenir une couche équivalent à 1 nm mais disposée de façon discontinue. Dans ce cas, la couche d'argent se trouve donc sous forme d'îlots. En effet, Maaroof *et al.* [20] ont montré que la taille des nanoparticules avait un effet sur les propriétés optiques. Dans cette étude, il a été montré que pour des épaisseurs inférieures à 10 nm, le film apparaissait discontinu avec un dépôt sous forme d'agrégats d'argent. Wang *et al.* [15] ont également montré des images de microscopie électronique à transmission où les dépôts d'argent apparaissaient avec des rugosités différentes pour des épaisseurs inférieures à 100 nm. Il apparaît donc que lors du dépôt de très faibles épaisseurs, l'argent se trouve sous forme d'agrégats et donc de nanoparticules ou nanocomposites. Dans notre cas, un dépôt d'argent de 1 nm a été réalisé ce qui laisse donc supposer que ce dernier se trouve également sous forme de nanoparticules d'argent plutôt que sous forme de film continu. Cette méthode a donc permis à la société HEF dans le cadre du projet Actiprotex de réaliser des matériaux nanocomposites de composition hétérogène comme présenté dans la figure 4-7.

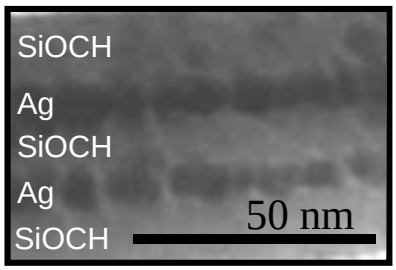


Figure 4-7 : Micrographies par microscopie électronique à transmission (MET) sur verre de couches alternées d'argent (10 Å) et de SiOCH obtenues par dépôts PVD (Ar, $2{,}2.10^{-1}$ Pa, 100 W) et PECVD (O_2 + HMDSO, 1,7 Pa, 150 W). Observation réalisée par le LSA.

Cette figure représente des micrographies de microscopie électronique à transmission (MET) des dépôts plasma de PVD et PECVD sur lame de verre et différentes couches apparaissent nettement : des couches de SiOCH qui apparaissent plus claires sur les micrographies et des couches d'argent qui apparaissent plus sombres. On notera que le dépôt d'argent (plus foncé) apparaît discontinu comme ce qui a été supposé précédemment.

Différents mélanges de gaz et différentes pressions et puissances pour la pulvérisation ont été testés au niveau de la cathode de dépôt pour réaliser des dépôts simultanés Ag-SiOCH par HEF. Il a été montré que l'ajout d'oxygène en mélange avec de l'argon et de l'HMDSO annule totalement le taux de dépôt de la cible argent et conduit à un dépôt de SiOCH pur. Le mélange de gaz le plus approprié apparait donc être un mélange d'argon (Ar) et d'HMDSO. Les sources plasma sont stables pour une pression totale de 3.10^{-1} Pa. A cette pression, différentes puissances de pulvérisation ont été appliquées allant de 100 W à 2000 W. Dans un premier temps, des dépôts sur lames de verre ont été réalisés pour contrôler la transmission comme indiquée dans le paragraphe 1.1 et les spectres en transmission optique ont été faits entre 340 et 1140 nm. Les résultats sont présentés dans la Figure 4-8.

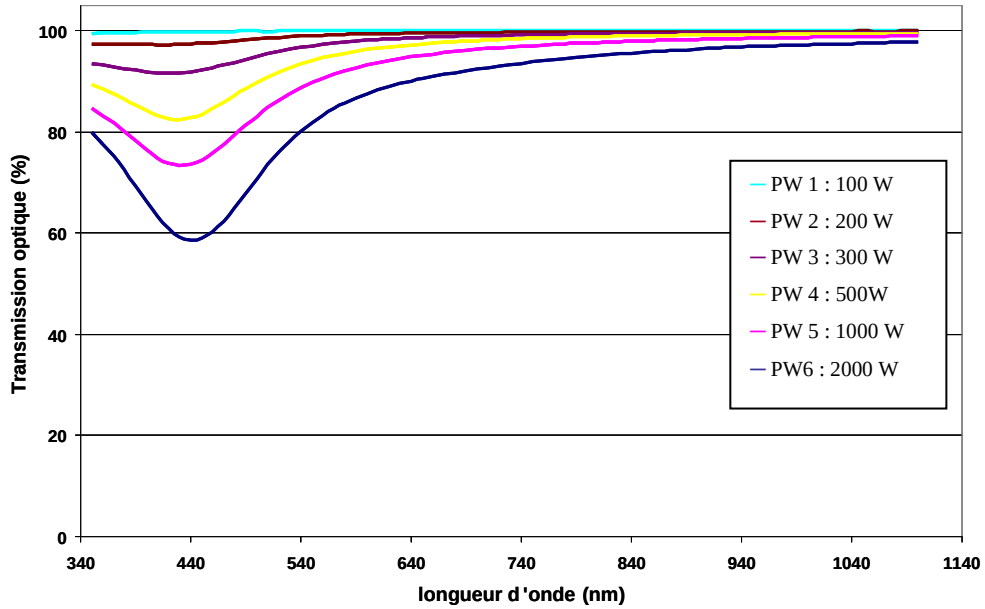


Figure 4-8 : Spectres de transmission optique des dépôts de Ag-SiOCH avec une puissance de dépôt allant de 100 W à 2000 W et une pression de 3.10^{-1} Pa utilisant simultanément des procédés PVD et PECVD (Ar, HMDSO).

Pour des longueurs d'onde excédant 700 nm la transmission est proche de 100 %, les dépôts apparaissent donc totalement transparents. Pour des longueurs d'ondes plus faibles, un pic

présentant un maximum d'absorption entre 430 et 440 nm et qui augmente en intensité lorsque la puissance de pulvérisation augmente. Ce phénomène, nommé « résonance plasmonique » est induit par des clusters nanostructurés de métal, ici l'argent dans le nanocomposite [1, 20]. Ces résultats sont similaires à ceux obtenus dans le cadre d'un dépôt d'une simple couche d'argent où les conditions de puissance élevée appliquées expliquaient l'importance de l'épaisseur des couches d'argent déposées et donc fait que celles-ci n'aient pas pu être transparentes. En parallèle un dépôt de SiOCH seul a été réalisé avec une puissance de 100 W et une pression de 3.10^{-1} Pa à l'aide de l'électrode PECVD. Le débit d'argon lors des dépôts a également été contrôlé. Il s'est avéré que, plus le débit d'argon augmente, plus les dépôts sur lame de verre étaient transparents.

3.2. Caractérisation des textiles après dépôt simultané Ag-SiOCH par méthodologie plasma

Les références des échantillons sont rappelées dans le tableau 4-2 pour une meilleure compréhension des résultats qui suivent.

Tableau 4-2 : Récapitulatif des références des échantillons traités Ag – SiOCH simultanément en faisant varier les puissances et débit d'argon lors du traitement

		Puissance				
	Textiles P/C	**100 W**	**200 W**	**300 W**	**500 W**	**1 kW**
Pression 3.10^{-1} Pa	**Débit d'argon 1220 cm^3/min**	-	-	Acti 040906	-	-
	Débit d'argon 560 cm^3/min	-	-	Acti 040907	-	-
	Débit d'argon 140 cm^3/min	Acti 040903	Acti 040904	Acti 040905	Acti 040902	Acti 040901

Des caractérisations de l'extrême surface des textiles après traitement plasma Ag-SiOCH ont été réalisées par le LSA (Université Lyon 1, Lyon) et la société Science et Surface (Ecully) et les résultats XPS sont présentés dans le tableau 4-3.

Tableau 4-3 : Résultats des analyses XPS faites sur textile P/C après traitement plasma simultané Ag-SiOCH à pression constante (3.10^{-1} Pa) en pourcentage atomique (% at.) de chaque élément à l'extrême surface. nd : non déterminé. n = 3

	Référence conditions sur textile P/C	**Puissance (W)**	**Débit d'argon (cm^3/min)**	**C**	**O**	**Si**	**Ag**
Sans argent	**Acti 040900**	nd	nd	52,8 ± 1,3	27,0 ± 0,8	20,2 ± 1,7	nd
Avec argent	**Acti 040901**	1000	140	57,8 ± 1,5	19,8 ± 1,0	16,0 ± 0,4	6,4 ± 0,6
	Acti 040902	500	140	48,4 ± 11,4	31,0 ± 15,0	16,0 ± 6,1	4,6 ± 2,4
	Acti 040905	300	140	50,0 ± 12,2	31,4 ± 18,8	16,7 ± 7,9	1,9 ± 1,2
	Acti 040904	200	140	49,0 ± 5,4	28,7 ± 7,1	21,3 ±2,3	1,0 ± 0,3
	Acti 040903	100	140	57,6 ± 1,2	20,3 ± 0,6	22,1 ± 1,1	nd
	Acti 040906	300	1220	55,0 ± 3,7	23,7 ± 2,8	20,7 ± 1,3	0,6 ± 0,07
	Acti 040907	300	560	60 ± 2,3	19,2 ± 0,1	18,8 ± 2,0	2,0 ± 0,3

L'échantillon Acti 040900 représente le textile traité avec du SiOCH seul ce qui correspond donc à un témoin sans actif antimicrobien. Dans ce cas l'argent n'est pas détecté et les proportions de O et Si sont sensiblement les mêmes que pour les textiles traités. Le traitement au SiOCH seul n'interfère donc pas avec la détection de ces éléments. Il faut rappeler que les autres échantillons ont subi des puissances de dépôt différentes pour une pression constante de 3.10^{-1} Pa : PW Acti 040901 (1 kW) > PW Acti 040902 (500 W) > PW Acti 040905 (300 W) > PW Acti 040904 (200 W) > PW Acti 040903 (100 W) et dans le cas des échantillons Acti 040905, Acti 040907 et Acti 040906, des débits d'argon croissants (Acti 040906 = 1220 cm^3/min > Acti 040907 = 560 cm^3/min > Acti 040905 = 140 cm^3/min) ont été appliqués avec une puissance constante de 300 W et une pression constante de 3.10^{-1} Pa.

D'après les résultats XPS, la quantité d'argent déposée sur textile est différente d'un échantillon à l'autre. En effet, lorsqu'on augmente la puissance, la quantité d'argent déposée à l'extrême surface du textile augmente également. Pour la puissance la plus élevée (Acti 040901 = 1 kW), la quantité d'argent en pourcentage atomique à la surface du textile est la plus forte (6,4 % atomique d'Ag), et pour la puissance la plus faible (Acti 040903 = 100 W) l'argent n'a pas pu être détecté à l'extrême surface par la technique XPS (limite de détection de 0,1 %). Pour une puissance intermédiaire de 300 W (Acti 040905), la quantité d'argent en pourcentage atomique détectée est de 1,9 % soit une quantité intermédiaire entre les deux autres. Ces résultats montrent que la quantité d'argent déposée à l'extrême surface des textiles est dépendante de la puissance de dépôt. Il est donc possible de contrôler la quantité d'argent déposé en modulant la puissance de dépôt. Dans le cas où le débit d'argon change, la quantité d'argent déposée la plus faible est obtenue pour le débit le plus fort. En effet pour les échantillons Acti 040905, 040907 et 040906, le débit d'argon est croissant (de 140 à 1220 cm^3/min). La quantité d'argent déposé la plus forte (2,0 % et 1,9 % atomique) est obtenue lorsque le débit d'argon est le plus faible respectivement pour les échantillons Acti 040905 (140 cm^3/min) et Acti 040907 (560 cm^3/min). Lorsque le débit est le plus fort (Acti 040906 : 1220 cm^3/min) la quantité d'argent déposée est la plus faible (0,6 % atomique).

Les quantités respectives de Si et O restent constantes lors des différents dépôts et sont les signatures caractéristiques du SiOCH. Il faut noter qu'en présence ou en absence d'argent, le SiOCH est donc déposé de la même façon. La caractérisation des textiles traités par plasma avec un dépôt simultané d'Ag-SiOCH par XPS a permis de détecter et de doser (en pourcentage atomique) l'argent à leur extrême surface. Dans un second temps, les cinétiques de croissance de *L. innocua* LRGIA 01 sur ces textiles ont été étudiées. Ceci a permis de calculer les activités anti-*L. innocua* LRGIA 01 correspondantes à 24h et d'évaluer la

corrélation l'activité antimicrobienne à la quantité et à la nature du dépôt antimicrobien déposé à l'extrême surface.

3.3. Suivi de croissance de *Listeria innocua* LRGIA 01 sur les textiles traités Ag-SiOCH par plasma

Des dépôts simultanés d'argent et de SiOCH ont été réalisés dans le but de pouvoir contrôler les activités antimicrobiennes. En effet, l'objectif de la société HEF était de mettre au point des textiles antimicrobiens actifs vis-à-vis de *L. innocua* LRGIA 01 en contrôlant la quantité d'argent déposée dans le but de contrôler l'activité antimicrobienne. Dans un premier temps, la puissance de dépôt a variée de 100 W à 1000 W (Figure 4-9 A) : plus la puissance était élevée, plus l'épaisseur d'argent déposée à l'extrême surface du textile était forte comme cela a été démontré dans la partie 3.2. avec des analyses XPS. Dans un second temps, à puissance de dépôt constante, le débit d'argon a varié (Figure 4-9 B) dans le but de contrôler le dépôt de SiOCH et d'argent. D'après la figures 4-9, les résultats avec le textile témoin sont conformes à ceux obtenus précédemment, c'est-à-dire une croissance de 2 log UFC/g en 24 h. La croissance sur textile traité au SiOCH est donc restée identique à celle sur textile non traité. Dans un premier temps, les suivis de croissance de *L. innocua* LRGIA 01 ont été réalisés sur les textiles à quantités d'argent croissantes de 1 à 6,4 % atomique selon la puissance appliquée lors du procédé plasma (Acti 040901, Acti 040902, Acti 040903, Acti 040904 et Acti 040905). Pour ces textiles, une inhibition a été observée dès 1 h de contact, celle-ci s'est trouvée être légèrement plus marquée dans le cas du textile Acti 040903 (100 W). Pour les échantillons Acti 040901 (1kW), Acti 040902 (500 W) et Acti 040905 (300 W), plus aucune bactérie n'a été dénombrée sur milieu gélosé après 4 h de contact ce qui correspond à une diminution de 5 log UFC/g en 24 h par rapport à la quantité de cellules déposées à t = 0. Pour les échantillons Acti 040903 (100 W) et Acti 040904 (200 W), l'inhibition est beaucoup moins marquée surtout pour l'échantillon Acti 040903 : diminution de 1 log UFC/g en 24h contre 2,5 log UFC/g pour l'échantillon Acti 040904. Il faut également noter que les écarts types de l'échantillon Acti 040904 sont importants et peuvent éventuellement être expliqués par une répartition moins homogène du dépôt sur ce textile. En effet, si le dépôt d'une faible épaisseur d'argent (1 nm) entraîne la formation d'agrégats, certaines zones du textile peuvent être moins concentrées en argent d'où une action plus ou moins importante d'un essai à l'autre. Il faut rappeler que les prélèvements dans le temps sont faits sur des éprouvettes de textile différentes à chaque fois. Pour ces 5 échantillons, une différence notable de croissance de *L. innocua* LRGIA 01 sur textile a donc pu être observée.

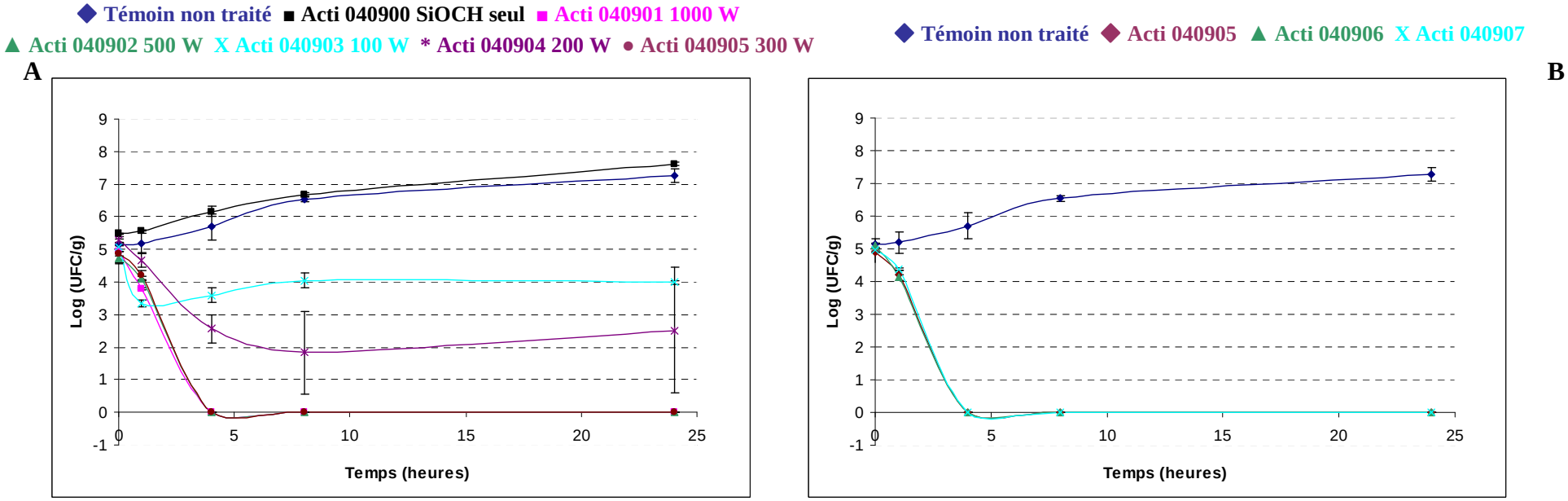


Figure 4-9 : Cinétique de croissance de *L. innocua* LRGIA 01 sur textiles P/C non traités et sur textiles traités par méthodologie plasma avec Ag - SiOCH (couches simultanées) à pression constante (3.10^{-1} Pa), débit d'argon constant (140 cm^3/min) et puissance croissante de 100 à 1000 W (A) et pression constante (3.10^{-1} Pa), puissance constante de (300 W) et débit d'argon croissant de 140 à 1220 cm^3/min (B). n = 2

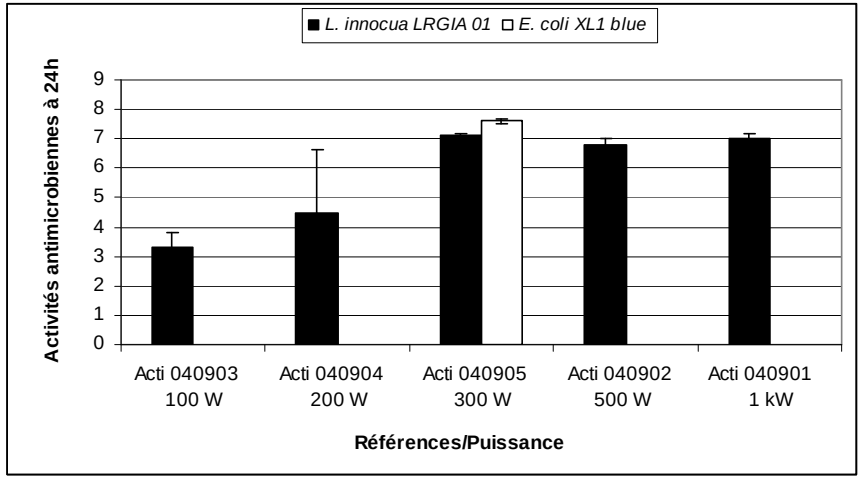


Figure 4-10 : Activités antimicrobiennes vis-à-vis de *L. innocua* LRGIA 01 (■) et *E. coli* XL1 blue uniquement pour Acti 040905 (□) après 24 h de contact selon la norme ISO 20743/2005 pour les textiles traités par méthodologie plasma à l'argent (multicouches Ag - SiOCH) à différentes puissances de dépôt comprises entre 100 et 1000 W. n = 2

En effet, pour des puissances comprises entre 300 W et 1000 W, l'inhibition de la souche est complète dès 4 h de contact puisque plus aucune bactérie n'est dénombrée, alors que pour des puissances plus faibles (entre 100 et 200 W), la diminution est plus faible (de 2 à 4 log UFC/g encore dénombrés après 4 h de contact). Une corrélation existe donc entre la puissance appliquée lors du dépôt et l'activité antimicrobienne du textile : plus la puissance de dépôt est forte, plus l'inhibition est forte. Ceci est en lien avec les analyses de surface qui ont mis en évidence une quantité d'argent plus forte lorsque la puissance de dépôt appliquée était plus forte, le pourcentage atomique de l'argent variant de 1 à 6,4 % lorsque la puissance de dépôt évolue de 200 à 1000 W.

Dans le cas des dépôts simultanés Ag-SiOCH, une très bonne efficacité de ces traitements vis-à-vis de *L. innocua* LRGIA 01 a donc pu être mise en évidence. Le fait de faire varier la puissance de dépôt entraine une variation d'activité. En effet, plus la puissance est forte plus l'activité est forte. Il est donc possible de contrôler le dépôt d'argent et l'activité de ces textiles est donc dépendante de la puissance de dépôt de l'argent.

Les activités antimicrobiennes de ces textiles ont pu être calculées selon la norme ISO 20743/2005. La figure 4-10 présente les activités antimicrobiennes vis-à-vis de *L. innocua* LRGIA 01 et d'*E. coli* XL1 blue seulement pour le textile Acti 040905. Pour *L. innocua* LRGIA 01, les résultats de la figure 4-9 montrent dans un premier temps que tous les textiles développés sont actifs dans tous les cas car l'activité mesurée à 24 h est supérieure à 2. Il faut également noter que plus la puissance utilisée pour les dépôts augmente, plus l'activité antimicrobienne vis-à-vis de *L. innocua* LRGIA 01 à 24 h augmente jusqu'à une valeur seuil à 300 W. En effet, pour la puissance la plus faible (100 W), l'activité à 24 h est de 3,3 ± 0,5 alors que pour une puissance de 300 W, l'activité antimicrobienne est de 7,1 ± 0,1. A partir de 300 W, les activités sont les mêmes : 7,1 ± 0,1, 6,8 ± 0,2 et 7,0 ± 0,2 respectivement pour des puissances de 300 W, 500 W et 1 kW pour *L. innocua* LRGIA 01. La puissance pouvant être corrélée à la quantité d'argent retrouvée à l'extrême surface du textile par la méthode XPS, on peut donc annoncer que plus la puissance augmente, plus la quantité d'argent déposée augmente et plus l'activité antimicrobienne augmente. Il faut cependant préciser que les activités antimicrobiennes arrivent à un maximum à partir d'une puissance de 300 W puisqu'au-delà de cette puissance de dépôt, toutes les cellules sont tuées en moins de 24 h.

Dans le cas de l'échantillon Acti 040905, l'activité vis-à-vis d'*E. coli* XL1 blue a également été calculée dans le but de vérifier si l'argent déposé à la surface du textile était également capable d'inhiber une souche à Gram négative. Seul ce textile a été testé car il s'agit de la condition intermédiaire de puissance utilisée par la suite pour la variation du débit d'argon.

Cette activité est sensiblement la même que pour *L. innocua* LRGIA 01 puisque pour cette dernière, l'activité antimicrobienne à 24 h était de 7,1 ± 0,1 et pour *E. coli* XL1 blue, elle est de 7,6 ± 0,1. Il a donc été montré que ce type de textile était capable d'inhiber 2 souches bactériennes, une souche à Gram positif (*L. innocua*) et une souche à Gram négatif (*E. coli*). Dans ce cas, la sensibilité des souches apparaît identique au traitement antimicrobien sur textile car la quantité d'argent déposée est amplement suffisante pour avoir une activité maximale.

Dans un second temps, les conditions choisies de procédé ont consisté à maintenir une puissance intermédiaire constante (300 W) et à faire varier le débit d'argon entre 140 et 1220 cm^3/min. La variation de débit d'argon a permis de faire varier la quantité de SiOCH déposée. La figure 4-9 montre que quel que soit le débit d'argon utilisé, l'inhibition de *L. innocua* a lieu dès 1 h de contact et que plus aucune bactérie n'a pu être dénombrée sur milieu gélosé après 4 h de contact et ceci a été vérifié après 8 et 24 h de contact.

L'objectif de la société HEF était de mettre au point des textiles avec une action antimicrobienne sur différentes souches qui soient non colorés après le traitement à l'argent. Les dépôts simultanés d'argent et de SiOCH ont donc permis de maîtriser plus aisément la quantité d'argent déposée à la surface des textiles (épaisseur de 1 nm environ) mais également la coloration de ces derniers. En effet, tous les textiles traités par plasma avec un mélange d'argent et de SiOCH étaient blancs. Par la suite, des essais avec encapsulation SiOCH ou Al_2O_3 ont été effectués.

4. Evaluation de l'activité antimicrobienne d'un textile traité par plasma : dépôt d'Ag-SiOCH et une encapsulation par SiOCH ou Al_2O_3

Dans les premières parties, des textiles fonctionnalisés avec de l'argent par traitement plasma ont pu être obtenus. Dans un premier temps, un dépôt simple couche a permis d'obtenir une activité antimicrobienne très marquée de ces textiles vis-à-vis de *L. innocua* LRGIA01. Cependant, ces textiles étaient colorés (du jaune au gris foncé) du fait d'une quantité trop importante d'argent en surface et d'une oxydation de ce dernier. Dans un second temps des dépôts simultanés d'argent et de SiOCH ont permis de définir les paramètres du procédé de dépôt plasma c'est-à-dire la pression gazeuse résiduelle, la puissance de dépôt et le débit d'argon. Des textiles actifs vis-à-vis de *L. innocua* LRGIA 01 et pour le textile Acti 040905 également une activité vis-à-vis d'*E. coli* XL1 blue. De plus, ces textiles n'étaient pas colorés.

Dans cette troisième partie, des dépôts Ag-SiOCH comme mis au point précédemment ont été recouvert d'une couche d'encapsulation SiOCH ou Al_2O_3 dans le but de « protéger » les dépôts contenant l'agent antimicrobien (l'argent) mais aussi de pouvoir maîtriser la diffusion de l'argent à travers cette couche d'encapsulation présentant des porosités différentes. La méthodologie mise au point par la société HEF pour obtenir ce type de dépôt est d'abord décrite. Ensuite, les résultats de l'analyse de la composition chimique de surface (réalisés au LSA) et de l'activité antimicrobienne des textiles seront présentés.

4.1. Méthode de traitement plasma : dépôt d'Ag-SiOCH encapsulé par SiOCH ou Al_2O_3

Les dépôts ont été réalisés avec une quantité d'argent qui dépend de la puissance de la source utilisée et une quantité de SiOCH ou d'Al_2O_3 variable. Les essais réalisés et leurs conditions sont récapitulés dans la figure 4-11.

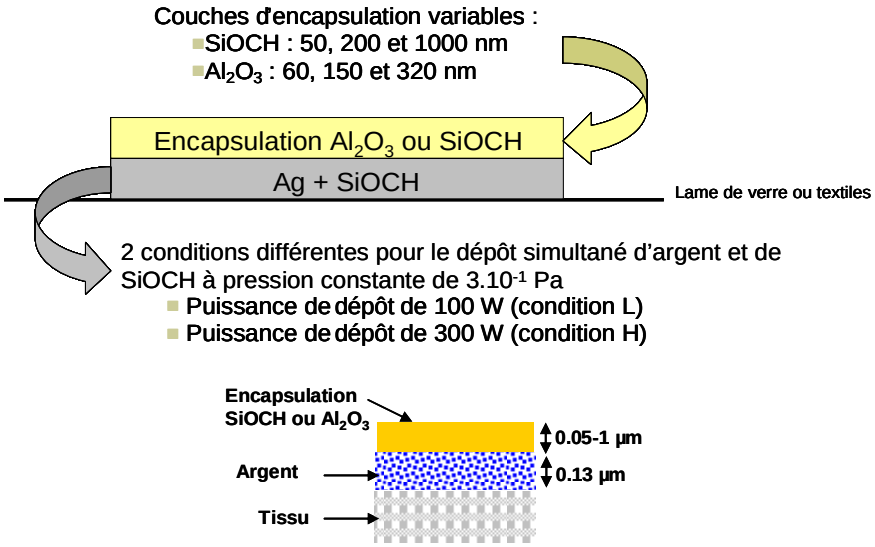


Figure 4-11 : Récapitulatif des différents dépôts effectués sur textile P/C : dépôt d'une sous-couche d'Ag-SiOCH puis couche protectrice d'Al_2O_3 ou de SiOCH

Le premier dépôt réalisé est un dépôt d'un mélange d'argent et de SiOCH (Ag-SiOCH) avec une épaisseur d'Ag-SiOCH d'environ 0,1 µm (d'après l'épaisseur estimée par HEF) directement sur lame de verre ou textile. Les puissances équivalentes aux échantillons Acti 040903 (condition L pour « Low ») et Acti 040905 (condition H pour « High ») ont été sélectionnées c'est-à-dire respectivement 100 et 300 W. En effet, ces deux conditions ont donné des dépôts composites Ag/SiOCH présentant une transparence acceptable. A partir des résultats de caractérisation de la morphologie (MET) (images non montrées), la structure du dépôt apparaît cohérente avec l'obtention de clusters d'argent de taille nanométrique inclus dans une matrice SiOCH. Les analyses XPS, SIMS et ToF-SIMS (spectres non présentés) indiquent une tendance similaire au

niveau de la teneur en Ag : condition H > condition L. Les textiles traités avec la technologie plasma SiOCH + Ag sont actifs vis-à-vis de *Listeria innocua* LRGIA 01 et les niveaux d'activité antimicrobienne coïncident avec les résultats de caractérisation de surface (XPS et ToF-SIMS) qui ont mis en évidence différentes teneurs en argent à la surface.

Pour protéger le revêtement antimicrobien déposé à la surface des textiles vis-à-vis de lavages ménagers, du sang ou de projections de nourriture, il est proposé d'utiliser deux types d'encapsulation (SiOCH ou Al_2O_3) avec des épaisseurs de 50, 200 et 1000 nm pour SiOCH et de 60, 150 et 320 nm pour Al_2O_3 (épaisseurs estimées par le partenaire HEF).

4.2. Caractérisation des textiles après un dépôt d'Ag-SiOCH encapsulé par SiOCH ou Al_2O_3 par méthodologie plasma

Des analyses de surface des dépôts par XPS, SIMS et ToF-SIMS sur lames de verre ont été réalisées au LSA et au sein de la société Science et Surface dans le but de déterminer la quantité d'argent présent en surface et à l'intérieur des différents dépôts. Les références des échantillons sont récapitulées dans le tableau 4-4.

Tableau 4-4 : Récapitulatif des références des échantillons traités Ag-SiOCH encapsulés SiOCH ou Al_2O_3

		Conditions de dépôt		
Epaisseur de la couche d'encapsulation (nm)		**condition L = 100 W** Acti 040903		**condition H = 300 W** Acti 040905
SiOCH	**50**	Acti 021014		Acti 040908
	200	Acti 021015		Acti 040909
	1000	Acti 021016		Acti 040910
Al_2O_3	**60**	Acti 100912		Acti 021017
	150	Acti 100911		Acti 021018
	320	Acti 040913		Acti 021019

Dans un premier temps, des dépôts ont été réalisés sur lames de verre car la caractérisation sur textiles s'avère être difficile. Il est raisonnable de penser que les résultats obtenus sur lames de verre et ceux sur textiles seront comparables mais il ne faudra pas dans notre discussion oublier de tenir compte de cette différence car la morphologie du dépôt sur lames de verre n'est pas forcément la même que sur les textiles.

- ✓ Caractérisation de surface et profils en profondeur de dépôts Ag/SiOCH recouverts de couches d'encapsulation SiOCH

Les principales conclusions des analyses XPS peuvent être résumées comme suit : une forte augmentation de la teneur en silicium a été détectée à la surface des échantillons recouverts du composite Ag/SiOCH (conditions L ou H: Si= ~25% at., C= ~55% at., O= ~20% at., Ag=0%) par comparaison à la teneur observée à la surface de l'échantillon de textile P/C de référence (= tel que produit, non traité) (Si= ~0,1% at., C= ~67% at., O= ~32% at., Ag=0%, autres= ~0,9%). Pour l'échantillon recouvert d'une couche d'encapsulation SiOCH, la composition de surface est similaire. Les analyses ToF-SIMS (spectres non présentés) ont également été réalisées à la surface de textiles traités et non traités. Les résultats ToF-SIMS confirment ceux obtenus par XPS.

L'agent antimicrobien (Ag) a été détecté à la surface de textiles recouverts d'Ag/SiOCH (condition plasma H) sans aucune encapsulation mais pas pour ceux recouverts avec Ag/SiOCH (condition plasma L). Les spectres ToF-SIMS indiquent aussi que l'argent n'est pas détecté pour les textiles P/C recouverts de Ag/SiOCH (conditions plasma L et H) puis de couches d'encapsulations SiOCH (épaisseurs = 50 nm, 200 nm, 1000 nm).

Les profils en profondeur XPS et SIMS ont également été réalisés dans le but de déterminer la localisation de l'argent dans l'épaisseur des dépôts. Les analyses de profils en profondeur indiquent que Ag est détecté à l'intérieur de tout le dépôt (conditions plasma L et H). Le tableau 4-5 montre les concentrations atomiques d'Ag par XPS et SIMS après abrasion (profils en profondeur). Les données de ces profils en profondeur XPS et SIMS apparaissent plutôt cohérentes.

Tableau 4-5: Concentrations atomiques XPS de l'argent (% at.) d'une lame de verre recouverte d'Ag/SiOCH (conditions plasma L et H) et des couches d'encapsulation SiOCH (épaisseurs = 50, 200 et 1000 nm). Les dépôts Ag/SiOCH ont été obtenus en utilisant simultanément PVD et PECVD (100 W) ($3x10^{-1}$ Pa, Ar + HMDSO, puissance pour la pulvérisation PVD : 100 W (condition plasma L) et 300W (condition plasma H)). Les couches d'encapsulation SiOCH ont été obtenues par PECVD (épaisseurs des couches SiOCH = 50, 200 et 1000 nm ; $3x10^{-1}$ Pa (Ar et HMDSO, 140 sccm)).

Condition L	**Sans encapsulation**	**~ 50 nm d'épaisseur de la couche d'encapsulation SiOCH**	**~ 200 nm d'épaisseur de la couche d'encapsulation SiOCH**	**~ 1000 nm d'épaisseur de la couche d'encapsulation SiOCH**
		Résultats XPS		
Concentration atomique d'Ag (% at.) à l'intérieur de la couche contenant de l'Ag	**0,4**	**<0,1 (0,06)**	**<0,1 (0,01)**	**<0,1 (0,05)**
		Résultats SIMS		
Concentration atomique d'Ag (% at.)) à l'intérieur de la couche contenant de l'Ag	**<0,1 (0,08)**	**<0,1 (0,06)**	**Non détecté**	**0,2**
Condition H		***Résultats XPS***		
Concentration atomique d'Ag (% at.) à l'intérieur de la couche contenant de l'Ag	**4**	**1,7**	**0,7**	**0,4**
		Résultats SIMS		
Concentration atomique d'Ag (% at.) à l'intérieur de la couche contenant de l'Ag	**2,6**	**1,7**	**0,5**	**0,2**

- ✓ Caractérisation de surface et profils en profondeur de dépôts Ag/SiOCH recouverts de couches d'encapsulation Al_2O_3

Les résultats XPS indiquent, comme attendu, que les contributions élémentaires de l'argent (Ag), du silicium (Si) et de l'aluminium (Al) correspondent respectivement à l'agent antimicrobien, à la matrice du composite Ag/SiOCH et à la couche d'encapsulation. Les principales observations peuvent être résumées comme suit: la composition chimique en surface des textiles et des lames de verre recouverts du composite Ag/SiOCH puis d'une couche d'encapsulation Al_2O_3 est similaire à celle d'un dépôt pur de Al_2O_3 (conditions 1 et 3: Al= ~25% at., C= ~22% at., O= ~53% at.) et est ainsi différente de la composition observée à la surface de l'échantillon textile référence P/C (=tel que produit, non traité) (Si= ~0,1% at., C= ~67% at., O= ~32% at., autres= ~0,9%). Cela signifie que l'agent antimicrobien (Ag) n'est pas détecté par XPS à la surface des textiles et des lames de verre recouverts de composite Ag/SiOCH et d'une couche d'encapsulation Al_2O_3.

Des analyses ToF-SIMS (spectres non présentés) ont également été réalisées à la surface des textiles non traités et traités. Les analyses ToF-SIMS confirment que l'argent n'est pas détecté à la surface de l'échantillon textile témoin P/C (=tel que produit, non traité) et à la surface d'un dépôt de Al_2O_3 pur. Il est détecté à la surface du dépôt Ag/SiOCH mais aussi en très faible quantité à la surface de la plupart des échantillons encapsulés tels que l'échantillon P/C recouvert de Ag/SiOCH (conditions L et H) et des couches d'encapsulation Al_2O_3 (épaisseurs : 60 nm, 150 nm et 320 nm). Ceci est toutefois surprenant mais peut indiquer une certaine diffusion et/ou l'ablation du dépôt Ag/SiOCH durant le dépôt de la couche d'encapsulation.

Les résultats des profils en profondeur XPS et SIMS (Tableau 4-6) sont plutôt cohérents et la principale observation est la détection attendue de l'argent dans l'épaisseur du dépôt. Des traces d'argent ont été détectées en surface par SIMS, ce qui a été confirmé par ToF-SIMS.

Tableau 4-6: Concentrations atomiques d'argent (% at.) de la lame de verre recouverte d'Ag/SiOCH (conditions plasma L et H) puis de couches d'encapsulation Al_2O_3 (épaisseurs = 60, 150 et 320 nm). Les dépôts Ag/SiOCH ont été obtenus en utilisant simultanément PVD et PECVD (100 W) ($3x10^{-1}$ Pa, Ar + HMDSO, puissance pour la pulvérisation PVD: 100 W (condition plasma L) et 300 W (condition plasma H)). Les couches d'encapsulation Al_2O_3 ont été obtenues par PVD (épaisseurs des couches d'encapsulation Al_2O_3 = 60, 150 et 320 nm; 1kW, $3x10^{-1}$ Pa, Ar/O_2 (96/ 14 sccm)).

Condition L	**Sans encapsulation**	**~ 60 nm d'épaisseur de la couche d'encapsulation Al_2O_3**	**~ 150 nm d'épaisseur la couche d'encapsulation Al_2O_3**	**~ 320 nm d'épaisseur de la couche d'encapsulation Al_2O_3**
Résultats XPS				
Concentration atomique d'Ag (% at.) à l'intérieur de la couche contenant de l'Ag	**0,4**	**Non détecté**	**<0,1 (0,06)**	**Non détecté**
Résultats SIMS				
Concentration atomique d'Ag (% at.) à l'intérieur de la couche contenant de l'Ag	**<0,1 (0,08)**	**<0,1 (0,05)**	**0,1**	**0,1**
Condition H	***Résultats XPS***			
Concentration atomique d'Ag (% at.) à l'intérieur de la couche contenant de l'Ag	**4**	**0,3**	**0,2**	**0,6**
Résultats SIMS				
Concentration atomique d'Ag (% at.) à l'intérieur de la couche contenant de l'Ag	**2,6**	**0,3**	**0,3**	**0,5**

Dans une troisième partie, des études des cinétiques de croissance de 2 souches microbiennes (*Listeria innocua* LRGIA 01 et *Escherichia coli* XL1 blue) sur textiles et des calculs d'activité antimicrobienne ont été réalisés. L'objectif de cette troisième partie est d'évaluer l'action antimicrobienne des textiles fonctionnalisés par la société HEF par plasma Ag-SiOCH avec des encapsulations SiOCH ou Al_2O_3 sur 2 souches microbiennes, une souche à Gram positif et une souche à Gram négatif. Par la suite des corrélations avec les analyses de surface pourront être faites pour expliquer les différences d'activités antimicrobiennes entre les échantillons.

4.3. Effet de textiles traités Ag-SiOCH encapsulé par SiOCH ou Al_2O_3 sur *Listeria innocua* LRGIA 01

Pour tous les graphiques présentés par la suite, la croissance de *L. innocua* LRGIA 01 et *E. coli* XL1 blue sur textile témoin est comprise entre 2,5 et 3 log UFC/g en 24 h ce qui est une croissance normale sur textile non traité.

Dans un premier temps, il a été vérifié que les textiles recouverts de SiOCH et d'Al_2O_3 (sans argent) ne présentaient aucune activité antimicrobienne en comparaison du textile de référence (P/C) vis-à-vis de *L. innocua* LRGIA 01 (figure 4-12)

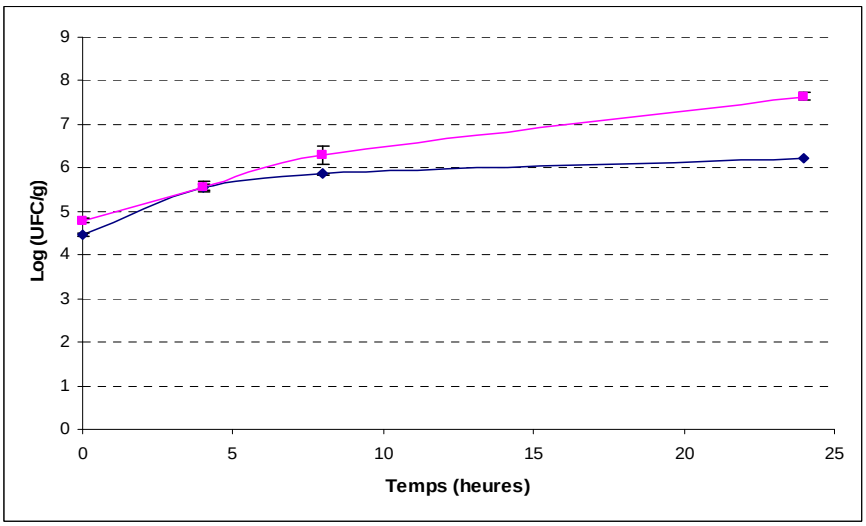
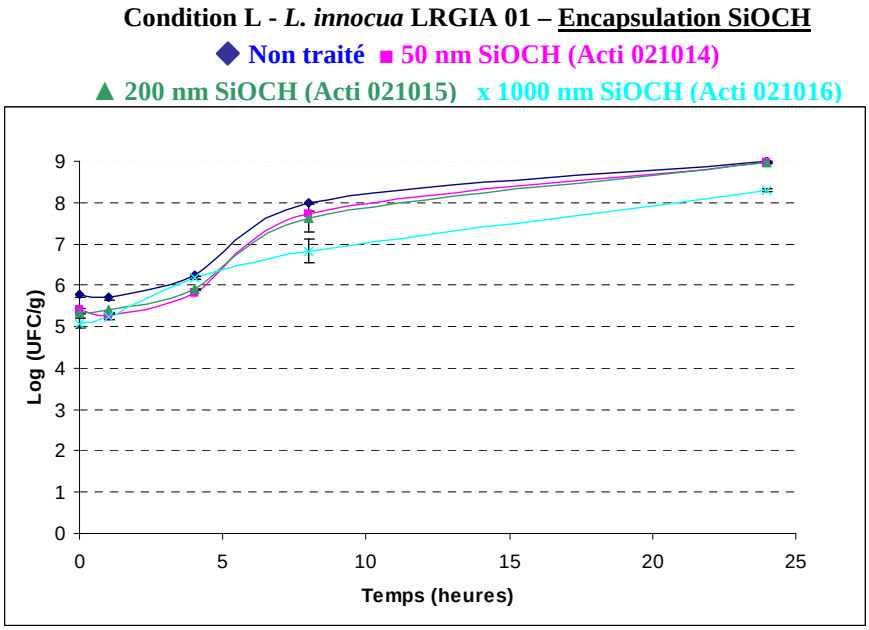


Figure 4-12 : Cinétique de croissance de *L. innocua* LRGIA 01 sur textiles P/C traité SiOCH seul et Al_2O_3 seul par méthodologie plasma. n = 2

➢ <u>Condition L : puissance de dépôt de 100 W</u>

La figure 4-12 représente les cinétiques de croissance de *L. innocua* LRGIA 01 sur des textiles témoins non traités et des textiles traités par plasma Ag-SiOCH condition L, encapsulés SiOCH (Figure 4-13 A) d'épaisseur de 50 nm (Acti 021014), 200 nm (Acti 021015) et 1000 nm (Acti 021016) ou encapsulé Al_2O_3 (Figure 4-13 B) d'épaisseur 60 nm Acti 100912), 150 nm (Acti 100911) et 320 nm (Acti 100913).

A



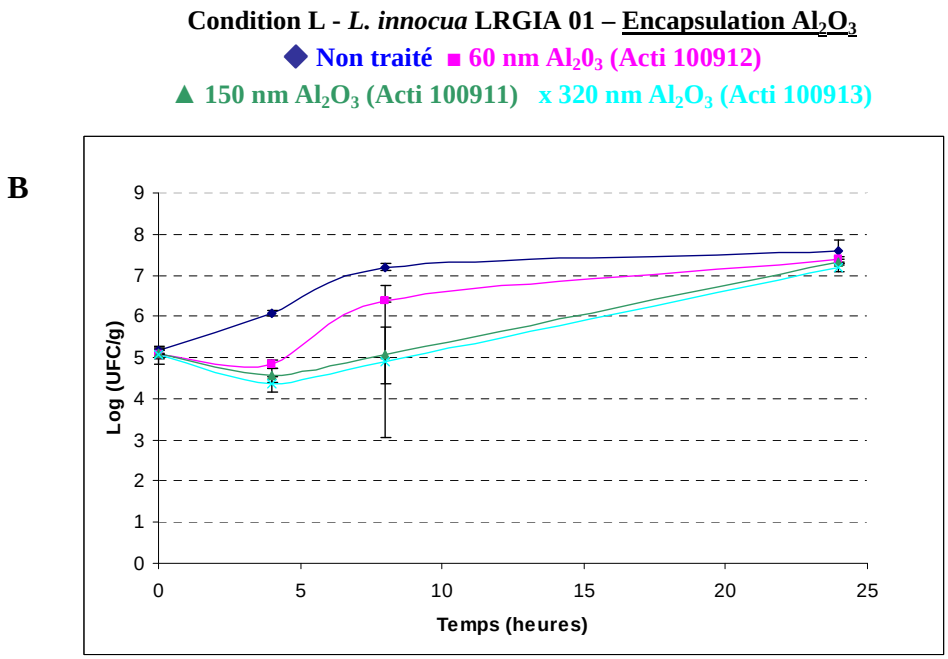


Figure 4-13 : Cinétique de croissance de *L. innocua* LRGIA 01 sur textiles P/C non traité et sur textiles traités par méthodologie plasma avec Ag-SiOCH encapsulés SiOCH (A) ou Al_20_3 (B), condition L = 100 W. n= 2

Pour les 3 textiles traités Ag-SiOCH (condition L) encapsulés avec différentes épaisseurs de SiOCH, la croissance de *L. innocua* LRGIA 01 est quasiment identique à celle observée sur textile témoin, ils ne possèdent donc pas d'activité antimicrobienne vis-à-vis de *L. innocua* LRGIA 01. Aucune activité antimicrobienne à 24 h n'a été mise en évidence. La couche d'Ag-SiOCH est trop peu importante pour obtenir une activité antimicrobienne vis-à-vis de *L. innocua* LRGIA 01. En effet, il a été montré dans la partie 3.2, que lorsque les lames de verre étaient traitées avec la condition L, l'argent n'était pas détecté à la surface du dépôt d'encapsulation. On peut supposer que lors de la mise en contact de la suspension cellulaire de *L. innocua* LRGIA 01 avec le textile traité, cette dernière se retrouve en contact avec la couche d'encapsulation. Si tel est le cas, il y a donc probablement une corrélation entre le fait que l'argent ne soit pas détecté en surface et le fait qu'aucune activité antimicrobienne ne soit mise en évidence.

Pour ces échantillons l'argent était détecté seulement dans la couche Ag-SiOCH déposée au départ et il peut être considéré comme présent à l'état de traces (< 0,1 % atomique). Ceci semble indiquer que le peu d'argent détecté au niveau de cette couche ne diffuse pas à travers la couche d'encapsulation. En effet, il avait été observé préalablement que lorsque le textile ne subissait pas d'encapsulation, ce dernier possédait une bonne activité antimicrobienne (échantillon Acti 040903, activité anti- *L. innocua* LRGIA à 24h : 3,3 ± 0,5).

Pour les textiles traités Ag-SiOCH avec la condition L encapsulés Al_2O_3, les mêmes remarques peuvent être faites que pour les textiles encapsulés SiOCH condition L. En effet,

aucune activité n'a pu être mise en évidence pour ces 3 textiles ce qui est en accord avec les résultats d'analyses de surface obtenus dans la partie 3.3.1.

- Condition H : puissance de dépôt de 300 W

Les cinétiques de croissance de *L. innocua* LRGIA 01 (figure 4-14 A et C) et *E. coli* XL1 blue (figure 4-14 B et D) sur des textiles témoin non traités et des textiles traités par plasma Ag-SiOCH condition H, encapsulés avec des épaisseurs de SiOCH (figure 4-14 A et B) de 50 nm (Acti 040908), 150 nm (Acti 040909) et 320 nm (Acti 040910) ou avec des épaisseurs d'Al_2O_3 (figure 4-14 C et D) de 60 nm Acti 100912), 150 nm (Acti 100911) et 320 nm (Acti 100913) sont regroupées au niveau de la figure 4-14.

- Encapsulation SiOCH

Les 3 textiles traités Ag-SiOCH (condition H = 300 W) encapsulés SiOCH (figure 4-14 A) inhibent la croissance de *L. innocua* LRGIA 01. En effet, une inhibition est observée dès 2 h de contact et celle-ci se maintient jusqu'à 8 h (diminution d'environ 2 log UFC/g en 4 à 8 h). A partir de 8 h le nombre de cellules de *L. innocua* LRGIA 01 ne diminue plus et reste stable à environ 4 log UFC/g. Il n'y a pas de différence significative (selon le test de Fisher, $p < 0,05$) entre les 3 épaisseurs d'encapsulation de SiOCH après 24 h de contact. Il en est de même pour *E. coli* XL1 blue avec une inhibition plus rapide et plus importante que pour *L. innocua* LRGIA 01 : inhibition dès 1 h de contact (diminution de 5 log UFC/g) alors qu'elle s'observe plutôt à partir de 4 h pour *L. innocua* LRGIA 01 et une inhibition complète dès 1 h de contact (diminution de 5 log UFC/g) est observée alors qu'elle est plus faible pour *L. innocua* LRGIA 01 (diminution d'environ 2 log UFC/g). L'activité antimicrobienne vis-à-vis de la souche *E. coli* XL1 blue (souche à Gram négatif) apparaît donc plus marquée que vis-à-vis de la souche *L. innocua* LRGIA 01 (souche à Gram positif).

Ip *et al.* [21] ont testé l'activité antimicrobienne de 5 textiles traités à base d'argent déjà commercialisés : Aquacel Ag™ (Conva Tec), Acticoat™ (Smith and Nephew), Urgotul SSD™ (Urgo), Polymem silver™ (Ferris) et Contrret antimicrobial foam™ (Coloplast). Ces 5 types de textiles exercent une activité antimicrobienne vis-à-vis de 7 souches testées (*S. aureus*, *Enterococcus faecalis*, *P. aeruginosa*, *E. coli*, *Enterobacter cloacae*, *Proteus vulgaris*, *Acinetobacter baumanii*). En effet, par exemple, Urgotul silver™ entraîne une réduction de 10^5 UFC/mL en 6 h de la population de *P. vulgaris*, *E. coli*, *E. cloacae* et de celle de *P. aeruginosa* en 24 h mais aucune activité antimicrobienne n'a pu être mise en évidence vis-à-vis des souches à Gram positif en 24 h. Il semblerait donc que les bactéries à Gram négatif soient plus sensibles à l'argent que les bactéries à Gram positif.

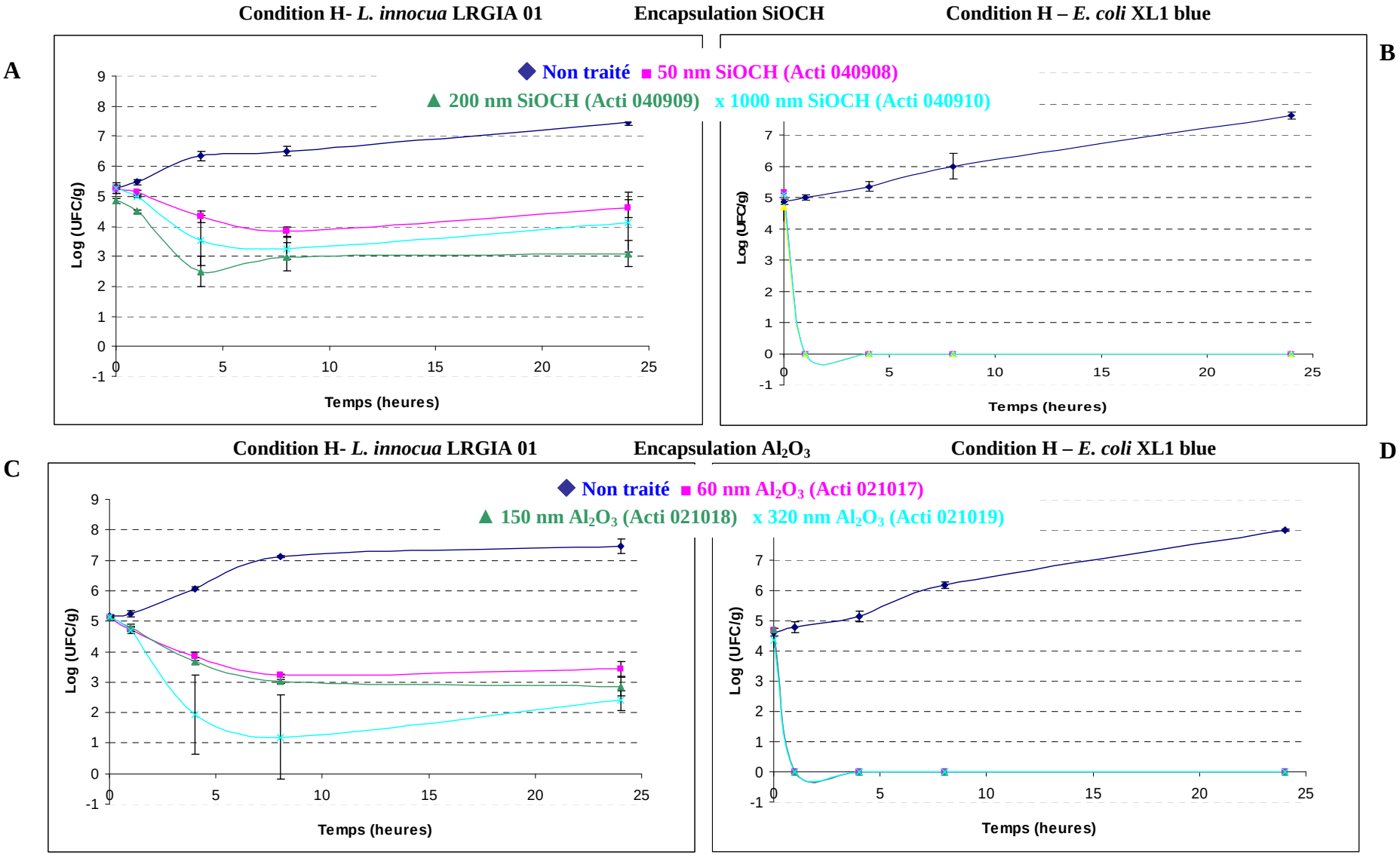


Figure 4-14: Suivi de croissance de *L. innocua* LRGIA 01 (A et C) et d'*E. coli* XL1blue (B et D) sur textiles P/C non traité et sur textiles traités par méthodologie plasma avec Ag-SiOCH encapsulés SiOCH (A et B) ou Al_2O_3 (C et D) condition H = 300 W. n = 2

- Encapsulation Al_2O_3

Pour le cas des textiles traités Ag-SiOCH (condition H) avec une encapsulation d'Al_2O_3, une inhibition de *L. innocua* LRGIA 01 et *E. coli* XL1 blue a été mise en évidence (figure 4-14 C et D). Il apparaît que le textile avec une épaisseur de 320 nm d'Al_2O_3 (Acti 021019) inhibe plus rapidement *L. innocua* LRGIA 01 que les 2 autres textiles encapsulés avec une épaisseur de 60 nm et 150 nm d'Al_2O_3 (Acti 021017 et 021018). Cependant les écarts types observés sont beaucoup plus importants. L'inhibition de cette souche est comparable à celle obtenue avec les textiles encapsulés SiOCH (diminution d'environ 2 log en 4 à 8 h). Pour *E. coli* XL1 blue l'action antimicrobienne du textile est visible dès 1 h et est très importante (5 log en 1 h). L'action des encapsulés SiOCH et Al_2O_3 est la même vis-à-vis de cette souche.
Seuls les textiles traités avec l'argent suivant la condition H (300 W) ont montré une inhibition de *L. innocua* LRGIA 01. L'action vis-à-vis d'*E. coli* XL1 blue est beaucoup plus rapide que pour *L. innocua* LRGIA 01 et le textile est biocide dès 1 h de contact avec les textiles encapsulés Al_2O_3 ou SiOCH condition H.

Par la suite, les activités anti- *L. innocua* LRGIA 01 et anti- *E. coli* XL1 blue ont été calculées suivant la norme ISO 20743/2005 à 24 h dans le but de comparer ces différents traitements. La figure 4-15 représente les activités antimicrobiennes des textiles traités par plasma Ag-SiOCH condition H (300 W) encapsulés SiOCH ou Al_2O_3 vis-à-vis de *L. innocua* LRGIA 01 et *E. coli* XL1 blue.

Aucune activité d'inhibition de *L. innocua* LRGIA 01 n'a été observée pour les textiles Ag-SiOCH encapsulés SiOCH ou Al_2O_3 avec une puissance de dépôt condition L (100 W) : la croissance sur les textiles traités était similaire à la croissance sur le textile témoin. Les activités antimicrobiennes à 24 h n'ont donc pas été calculées.
Pour la condition de puissance de 300 W, les activités vis-à-vis de *L. innocua* LRGIA 01 sont toutes supérieures à 2 et les textiles encapsulés SiOCH ou Al_2O_3 possèdent donc tous bien une activité vis-à-vis de cette souche. Pour les textiles encapsulés SiOCH, les activités antimicrobiennes à 24 h vis-à-vis de cette souche sont les suivantes : 2,8 ± 0,2, 3,7 ± 0,1 et 3,4 ± 1,2 respectivement pour des épaisseurs d'encapsulation SiOCH de 50, 200 et 1000 nm.
Les activités vis-à-vis d'*E. coli* XL1 blue sont également toutes supérieures à 2 et beaucoup plus importantes que pour *L. innocua* LRGIA 01. En effet, pour les mêmes épaisseurs d'encapsulation on a des activités plus de deux fois supérieures : 7,9 ± 0,2, 7,5 ± 0,5 et 7,9 ± 0,3 respectivement pour 50, 200 et 1000 nm d'épaisseur d'encapsulation SiOCH.

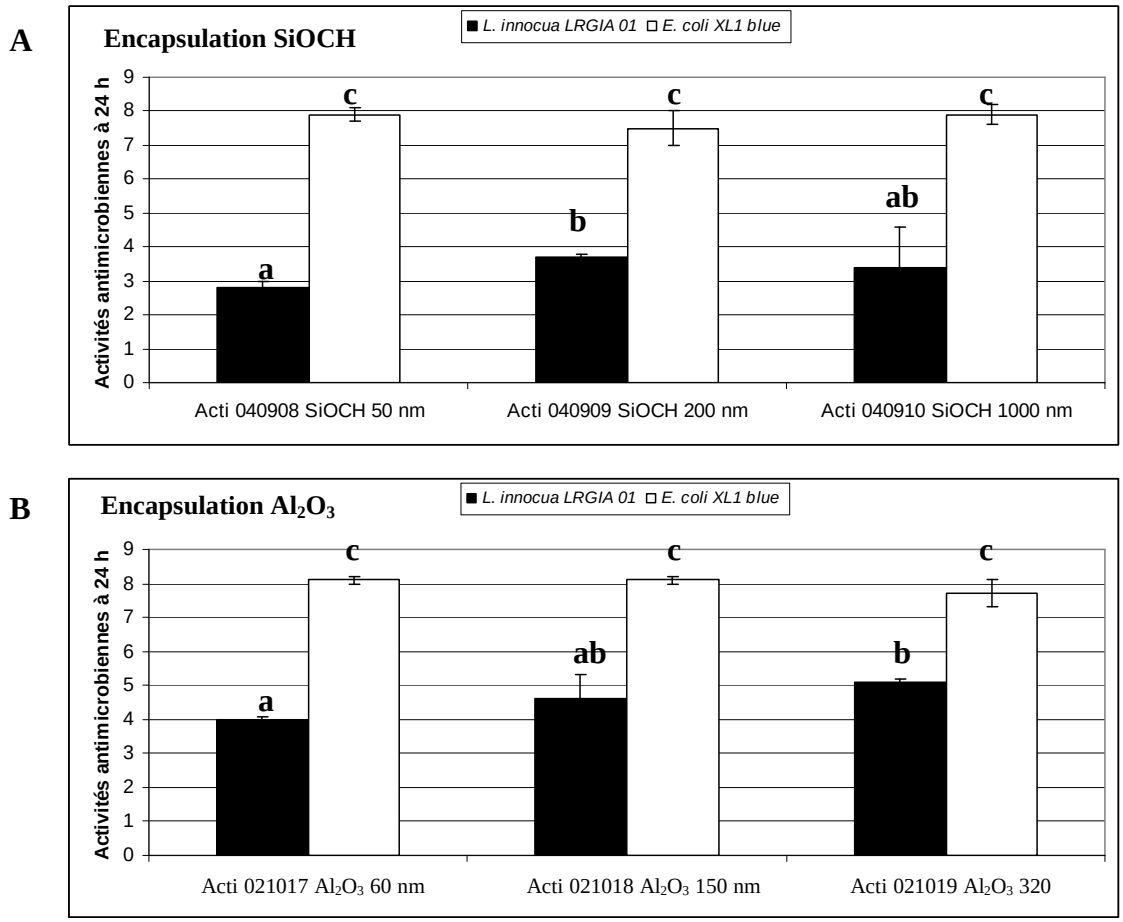


Figure 4-15 : Résultats des activités antimicrobiennes vis-à-vis de *L. innocua* LRGIA 01 et *E. coli* XL1 après 24 h de contact selon la norme ISO 20743-2005 pour les textiles traités par méthodologie plasma Ag-SiOCH puissance de dépôt de 300 W encapsulés SiOCH (A) et Al_2O_3 (B). n = 2. Chaque lettre (a, b ou c) indique un groupe statistique homogène. Les nombres représentés par les lettres a, b ou c dans chaque cas sont différentes (a<b<c). Les résultats avec différentes lettres sont ainsi significativement différenciés par le test de Fisher ($p<0,05$).

Si l'on compare le type d'encapsulation utilisée (Al_2O_3 ou SiOCH) on peut voir que les activités sont significativement plus fortes (test de Fisher $p < 0,05$) dans le cas de l'encapsulation par l'Al_2O_3 surtout vis-à-vis de *L. innocua* LRGIA 01. En effet les activités sont comprises entre 4,0 et 5,1 dans le cas de l'encapsulation par l'Al_2O_3 alors qu'elles sont comprises entre 2,8 et 3,7 dans le cas de l'encapsulation par le SiOCH. Il faut cependant noter que les épaisseurs d'encapsulation ne sont pas les mêmes pour les 2.

Les tests statistiques ont été réalisés pour chaque type d'encapsulation dans le but de déterminer si l'épaisseur des couches pouvait avoir une influence sur l'activité antimicrobienne des textiles pour les 2 souches testées.

Pour *E. coli* XL1 blue, aucune différence significative n'a pu être observée en fonction de la couche d'encapsulation. Pour *L. innocua* LRGIA 01, dans le cas de SiOCH, l'épaisseur de

l'encapsulation n'a pas d'influence sur cette activité antimicrobienne alors que pour l'encapsulation par Al_2O_3, plus l'épaisseur est importante, plus l'activité antimicrobienne est importante donnant ainsi un textile plus actif. On peut supposer qu'il y a un relarguage d'argent selon la couche d'encapsulation

Ces différences de résultats liés à l'épaisseur sont également confirmées par les analyses de surface. Elles montrent par ailleurs que les informations quantitatives, c'est-à-dire les teneurs en argent détectées en surface ou au sein du dépôt, sont plus importantes pour les dépôts SiOCH. Elles ne peuvent donc pas expliquer la différence observée entre les 2 dépôts. L'épaisseur ne semble toutefois pas être le seul paramètre à prendre en compte. Il existe probablement un rôle de la nature de l'agent servant à l'encapsulation (propriétés physico-chimiques dont les propriétés de surface : hydrophobicité, hydrophilie) et/ou des différences de structure du dépôt lorsqu'il est déposé sur le textile notamment des différences de porosité ou encore d'homogénéité du dépôt à la surface du textile. Ceci n'est cependant pas observé pour *E. coli* XL1 blue. Il faut également noter que les analyses de surface ont été réalisées sur lame de verre alors que les mesures d'activités antimicrobiennes ont été faites sur textiles.

Dans le cas d'*E. coli* XL1 blue, pour la condition H, les activités antimicrobiennes sont plus importantes quel que soit le type d'encapsulation. Pour cette souche, la quantité d'argent en contact avec les bactéries est suffisante pour inhiber le développement sur ce textile et par conséquent il s'agit d'une souche plus sensible. Le matériau utilisé pour l'encapsulation n'a pas d'incidence sur l'action de l'argent, on peut supposer que la quantité d'argent qui diffuse est largement suffisante pour inhiber la souche.

Serier *et al.* [22] ont montré le rôle de la diffusion de l'argent à travers une couche de céramique lors d'un procédé de dépôt de solide. Les auteurs ont mis en évidence que l'argent était capable de diffuser à travers la couche d'alumine à l'interface Ag/Al_2O_3. Cette diffusion est corrélée à la diminution de la dureté de l'alumine observée en même temps près de l'interface métallique-céramique. Il semblerait également que la diffusion de l'argent contrôle les propriétés mécaniques de l'alumine au niveau de l'interface Ag/Al_2O_3. Ces résultats peuvent être comparés avec ceux que nous avons obtenus avec les textiles traités plasma Ag-SiOCH encapsulés Al_2O_3. En effet, l'activité antimicrobienne de ces textiles vis-à-vis des 2 souches bactériennes testées (*L. innocua* LRGIA 01 et *E. coli* XL1 blue) est plus importante que pour les textiles encapsulés SiOCH. On peut donc supposer que l'argent diffuse à travers la couche d'encapsulation et se trouve sous forme d'ions non détectables par les techniques d'XPS et ToF-SIMS. Dans ce cas, l'argent serait plus disponible pour atteindre sa cible, les cellules bactériennes, ce qui pourrait contribuer à expliquer l'activité antimicrobienne plus

élevée dans le cas des textiles encapsulés avec Al_2O_3 que pour les textiles encapsulés avec SiOCH.

La tenue au lavage était un des critères pour l'utilisation des textiles en industries agro-alimentaires. Certains textiles traités par méthodologie plasma ont été lavés et l'activité antimicrobienne n'était pas maintenue au cours des lavages mêmes ménagers. Le traitement plasma sur textile avec comme objectif un maintien du traitement antimicrobien est encore peu développé. Il serait nécessaire d'étudier de façon plus approfondie la tenue au lavage des traitements plasma en envisageant une fonctionnalisation au préalable du textile pour une meilleure accroche du traitement.

La société HEF a donc mis au point des textiles antimicrobiens en déposant de l'argent par traitement plasma capables d'avoir une activité antimicrobienne vis-à-vis de 2 souches : *L. innocua* LRGIA 01 souche à Gram positif et *E. coli* XL1 blue souche à Gram négatif. Les différents essais réalisés par HEF ont permis au final de contrôler la quantité d'argent déposée et éventuellement la diffusion de l'argent à travers les couches d'encapsulation. Le fait d'encapsuler cette couche de départ avec du SiOCH permet de diminuer cette activité probablement parce que cette couche d'encapsulation possède un rôle « barrière » à la diffusion de l'argent. Dans le cas des encapsulations Al_2O_3, les activités antimicrobiennes sont plus fortes et par conséquent, on peut supposer que la couche Al_2O_3 joue un rôle plus faible de « protection » de la couche antimicrobienne.

L'argent déposé par traitement plasma permet donc d'obtenir des textiles possédant de fortes activités antimicrobiennes vis-à-vis de ces 2 souches bactériennes. Dans un second temps, un traitement sol-gel permettant de déposer également de l'argent a été réalisé pour fonctionnaliser les textiles.

5. Evaluation de l'activité antimicrobienne d'un textile traité par méthodologie sol-gel

La méthodologie sol-gel a également été employée pour déposer de l'argent sur des textiles dans le but de les rendre antimicrobiens. Ce travail a été réalisé au Laboratoire des Matériaux et du Génie Physique (LMGP) de Grenoble dans le cadre de la thèse de Mouna Messaoud. En effet, le LMGP est spécialiste du traitement sol-gel et a proposé dans le cadre du projet Actiprotex une fonctionnalisation des textiles grâce à cette méthodologie. Le matériau textile est pour ce laboratoire un matériau nouveau et il a donc été indispensable de réaliser différents essais préliminaires avec notamment la mise au point d'une suspension de nanoparticules

d'argent dans l'éthanol mais aussi des essais pour maîtriser le dépôt de cette suspension sur textile.

5.1. Méthodologie Sol-Gel [23]

La problématique du LMGP dans le cadre du projet Actiprotex est double. En effet, elle consiste tout d'abord à formuler des solutions liquides à base d'espèces biocides actives (l'argent), et d'autre part à étudier la compatibilité de ces solutions avec les supports textiles.
Ces deux aspects n'ayant jamais fait l'objet d'études antérieures au LMGP, il a été décidé d'utiliser une méthodologie permettant de les découpler. Les solutions étudiées ont tout d'abord été déposées sur des supports en silicium ou verre, supports que le LMGP maîtrise de façon routinière et qui sont compatibles avec une mise en œuvre simple de différentes méthodes de caractérisation. Les solutions présentant des intérêts notamment de stabilité ont ensuite fait l'objet de tests d'imprégnation sur textile, les échantillons imprégnés ont été caractérisés par le LMGP, par le LSA et par la société Sciences et Surface. Dans tous les cas, les solutions conduisant à une fonctionnalité ne nécessitant pas de traitement thermique post-imprégnation à une température supérieure à 100°C ont été testées, du fait de la faible tenue thermique des supports textiles. La fonctionnalité principale visée par le LMGP porte sur l'activité biocide et parmi les deux grandes classes d'espèces biocides répertoriées, espèces organiques (par exemple sels d'ammonium quaternaire) ou espèce métalliques (argent, cuivre, zinc…), c'est sur la deuxième que le LMGP s'est orienté dans un premier temps en étudiant la formulation de solutions à base d'argent. Comme indiqué dans le chapitre 1 « étude bibliographique » mais aussi en début de ce chapitre, les ions argent sont intéressants de par leur activité antimicrobienne et peuvent être générés directement en utilisant des sels d'argent par exemple, mais la stabilité chimique de ces derniers est extrêmement faible. Le LMGP s'est donc intéressé à la formulation de suspensions liquides à base de nanoparticules d'argent métallique, les cations argent étant formés dans la couche d'oxyde natif encapsulant naturellement les particules métalliques. La formation de particules d'argent ne relève pas du procédé sol-gel et c'est la raison pour laquelle le LMGP s'est orienté vers des méthodes de réduction photochimique, déjà expérimentées.

Le protocole sol-gel mis au point antérieurement au LMGP conduisant à des nanoparticules de TiO_2 en suspension liquide, la possibilité de former des particules d'argent métallique en suspension liquide par réduction photocatalytique au contact des particules de TiO_2 a été étudiée. Pour cela, la suspension de TiO_2 a été diluée dans l'éthanol absolu à une

concentration de $2,4.10^{-3}$ mol/L, de façon à permettre une pénétration efficace du rayonnement UV dans la solution mais aussi à minimiser l'absorption des UV par les particules de TiO_2. De nombreux paramètres expérimentaux ont été testés, incluant la concentration de nitrate d'argent, la durée d'exposition aux UV, ou encore la nature du milieu de dilution.

Différentes méthodes de caractérisation ont été mises en place (spectrophotométrie UV visible, MEB, XPS) dans le but de caractériser les solutions mises au point au LMGP et ces analyses ont été faites directement au sein du LMGP à Grenoble. Les principales conclusions tirées de ces analyses sont les suivantes :

- La réduction du nitrate d'argent en particules d'argent métallique prend place graduellement au cours de l'exposition aux UV, puis elle atteint un pallier dépendant des conditions expérimentales. Ces particules sont nécessairement recouvertes d'oxyde natif, mais les caractérisations mises en œuvre ne permettent pas d'évaluer le ratio entre argent métallique et argent oxydé.

- La réduction est possible aussi bien en milieu aqueux qu'en suspension d'éthanol. Toutefois, la cinétique de réduction augmente en accroissant le ratio éthanol / eau. Ceci s'explique par le fait que l'éthanol est un composé oxydable qui peut consommer les trous photo-générés par le TiO_2 sous exposition UV. La recombinaison avec les électrons photo-générés est donc moindre, ce qui favorise une meilleure efficacité de réduction.

- La réduction prend place selon un mécanisme bi-régime. En effet, des espèces transitoires de nature non définie présentant une bande de plasmon vers 500 nm sont tout d'abord formées et ces espèces conduisent ensuite à des particules présentant une bande de plasmon vers 400-450 nm, laquelle est caractéristique de nanoparticules d'argent métallique (ce qui a également été mis en évidence lors du traitement plasma).

- Les particules d'argent formées après une exposition de courte durée aux UV présentent une taille d'environ 50-100 nm et tendent à s'agréger au cours d'une exposition UV prolongée, ce qui augmente la dispersion de tailles et favorise une décantation au cours de l'exposition aux UV ou lors d'un vieillissement post-exposition.

- A concentration égale en TiO_2 dans la solution, une augmentation de la concentration initiale en nitrate d'argent favorise une forte augmentation de la concentration finale en particules d'argent métallique, en particulier lors d'une variation entre 10^{-4} et 10^{-3} mol/L. Toutefois, l'augmentation de la concentration d'argent s'accompagne également d'une agrégation / sédimentation plus rapide.

Ces différentes caractéristiques ont permis au LMGP de définir des conditions expérimentales répondant à un compromis entre différents critères de qualité des suspensions d'argent : teneur des solutions en argent métallique, homogénéité en taille des particules formées, stabilité des solutions dans le temps. Ce compromis a été obtenu pour des solutions de nitrate d'argent à 10^{-3} mol/L dans de l'éthanol absolu et exposées aux UV pendant 15 à 30 minutes. L'activité antimicrobienne de ces solutions n'a pas pu être testée d'un point de vue antimicrobien au sein du LRGIA. En effet, les solutions de nanoparticules d'argent sont composées essentiellement d'éthanol ce qui ne permet pas la détermination de la CMI de l'argent présent dans la solution. En effet, la valeur de CMI mesurée ne pourrait pas être attribuée aux nanoparticules d'argent car l'éthanol possède également une activité antimicrobienne.

En d'autres termes, des suspensions liquides de cristallites de TiO_2 ont été préparées par sol-gel puis des nanoparticules d'argent ont été générées par réduction photocatalytique du nitrate d'argent dilué dans les suspensions de TiO_2 et exposées aux UV. Ces étapes résultent en la formation de suspensions d'Ag°-TiO_2. Après la mise au point de ces suspensions, les textiles C/P ont été imprégnés par foulardage avec ces différentes suspensions. Les observations par MEB indiquent que si l'argent métallique semble bien s'accrocher à la fibre textile, les particules tendent à s'agréger localement et conduisent à une imprégnation très hétérogène. Des travaux au sein du LMGP ont donc été conduits pour prévenir l'agrégation lors de l'imprégnation sur textile. Par la suite l'activité antimicrobienne des textiles imprégnés par foulardage avec la solution sol-gel a été évaluée au LRGIA sur 2 souches : *L. innocua* LRGIA 01 et *E. coli* XL1 blue.

5.2. Activités antimicrobiennes de textiles fonctionnalisés par Sol-Gel à l'argent

Les textiles C/P ont été imprégnés par « pad-coating » ou foulardage avec une solution d'Ag°-TiO_2 préparées à partir de solutions à 0,5 mmol/L d'$AgNO_3$ et 2,4 mmol/L de TiO_2 qui ont été exposées pendant 60 min à la lumière UV. La solution d'$AgNO_3$ a ensuite été diluée dans l'éthanol absolu pour obtenir des concentrations finales de 0,05 ; 0,1 et 0,5 mmol/L avec une concentration en TiO_2 de 2,4 mmol/L. Plus la concentration en $AgNO_3$ est élevée, plus la quantité de nanoparticules d'argent est importante. Il faut rappeler que dans le principe du foulardage, le tissu passe en continu dans un bac rempli de la solution sol-gel à déposer en

l'essorant entre deux rouleaux. La vitesse de tirage utilisée est de 5 m/min. Par la suite, les textiles ont été séchés à 110°C pendant 5 minutes dans le but d'éliminer le solvant et de fixer le dépôt. Après, le dépôt l'éthanol est donc totalement évaporé et n'influence donc plus l'activité antimicrobienne des textiles.

La croissance sur textile témoin non traité et sur les textiles traités avec une suspension de TiO_2 seule a été évaluée (figure 4-16). Les essais ont montré une croissance d'environ 3 log UFC/g sur les 2 textiles en 24 h. Ces résultats indiquent que le textile traité uniquement au TiO_2 n'inhibe pas le développement des micro-organismes testés.

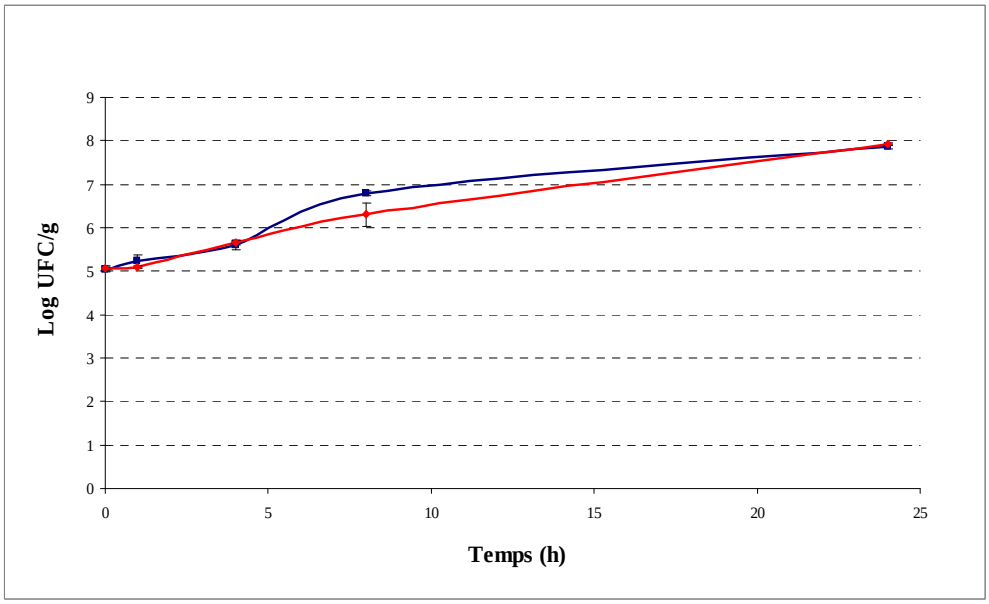
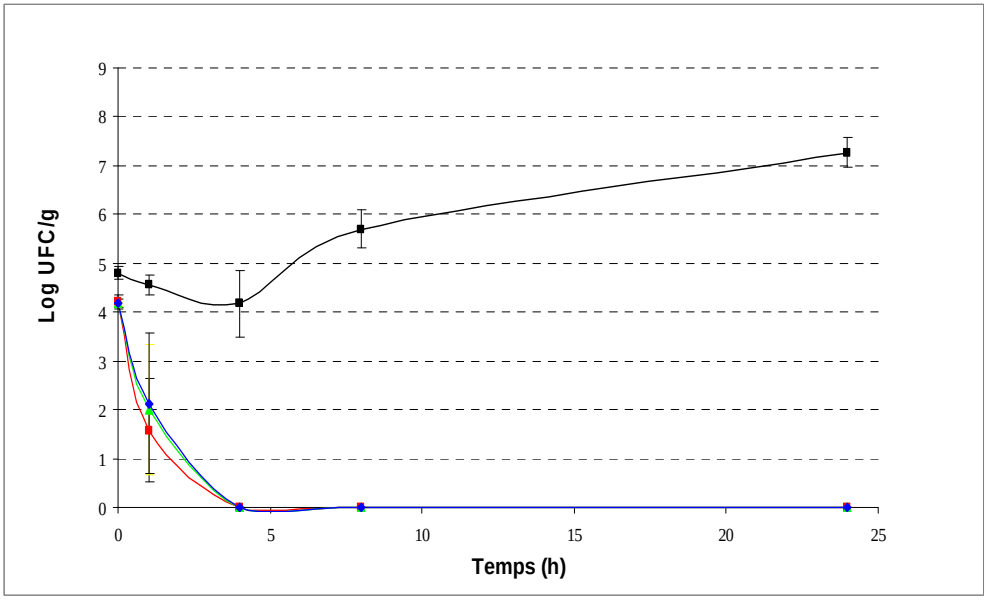


Figure 4-16 : Suivi cinétique de croissance de *L. innocua* LRGIA 01 sur textiles C/P non traité (■) et textiles imprégnés de suspensions d'Ag°-TiO_2 par sol-gel (■). n = 2

Après imprégnation des textiles, leurs activités antimicrobiennes ont été évaluées selon la norme ISO 20743/2005 et des cinétiques de croissance ont été réalisées (Figure 4-17).

***E. coli* XL1 blue**



■ **Non traité** ■ **0,5 mmol/L $AgNO_3$** ▲ **0,1 mmol/L $AgNO_3$**
◆ **0,05 mmol/L $AgNO_3$**

***L. innocua* LRGIA 01**

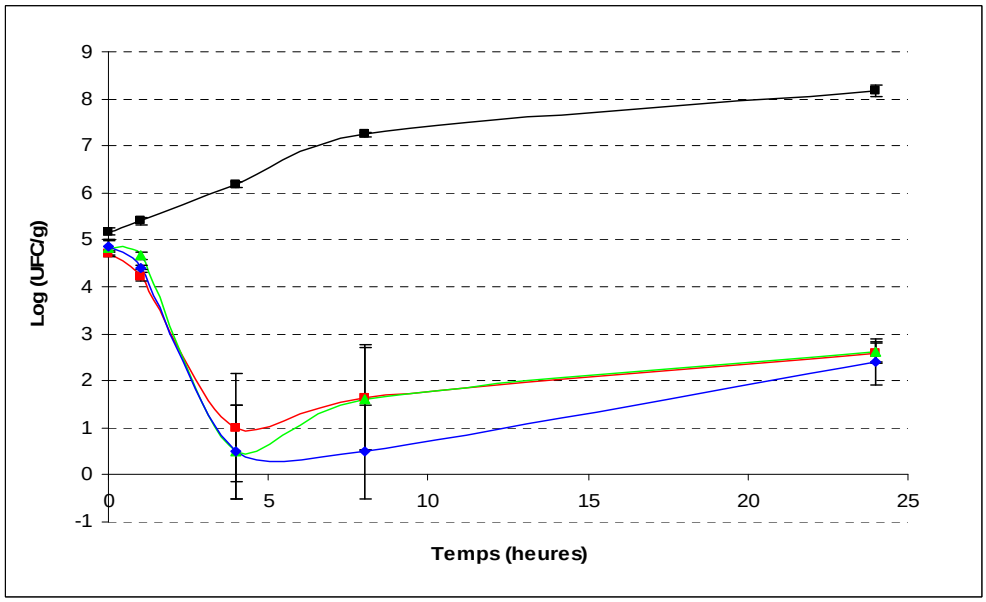


Figure 4-17 : Cinétique de croissance d'*E. coli* XL1 blue (en haut) et *L. innocua* LRGIA 01 (en bas) sur textiles C/P non traité et textiles imprégnés de suspensions d'Ag°-TiO_2 par sol-gel, après 60 min d'exposition à la lumière UV, 0,5 ; 0,1 et 0,05 mmol/L d'$AgNO_3$ et 2,4 mmol/L TiO_2. n = 2

Pour les 2 souches testées, la croissance sur textiles témoins non traités est d'environ 2 log UFC/g en 24 h ce qui est une croissance classique sur textile témoin (C/P).

Pour les textiles traités par méthodologie sol-gel avec une suspension d'Ag°-TiO_2, la diminution du nombre de bactéries apparait rapide et importante. En effet, dès 4 h de contact,

le nombre de cellules diminue d'environ 2,5 log UFC/g pour *E. coli* et de moins d'un log UFC/g pour *L. innocua* LRGIA 01. A partir de 8 h, plus aucune cellule d'*E. coli* XL1 blue n'a pu être dénombrée sur milieu TSA alors qu'environ 1 log UFC/g est encore dénombré pour *L. innocua* LRGIA 01. Il en est de même après 24h de contact. Il s'avère donc qu'*E. coli* XL1 blue est plus sensible que *L. innocua* LRGIA 01 après exposition aux textiles imprégnés d'une suspension d'Ag°-TiO_2 par sol-gel. Il faut également noter que pour les concentrations en $AgNO_3$ testées, la concentration en argent n'a pas d'influence sur l'activité antimicrobienne des textiles sur les 2 souches testées. En effet, que la solution d'imprégnation soit diluée ou non, le comportement des 2 souches reste sensiblement le même selon les concentrations de principe actif. L'influence de la quantité de nanoparticules d'argent déposée peut également être évaluée en calculant les activités antimicrobiennes comme dans les paragraphes consacrés aux traitements plasma et les activités à 24 h calculées selon la norme ISO 20743/2005 peuvent être comparées pour les 2 souches testées. Ces différentes activités antimicrobiennes sont présentées dans la figure 4-18.

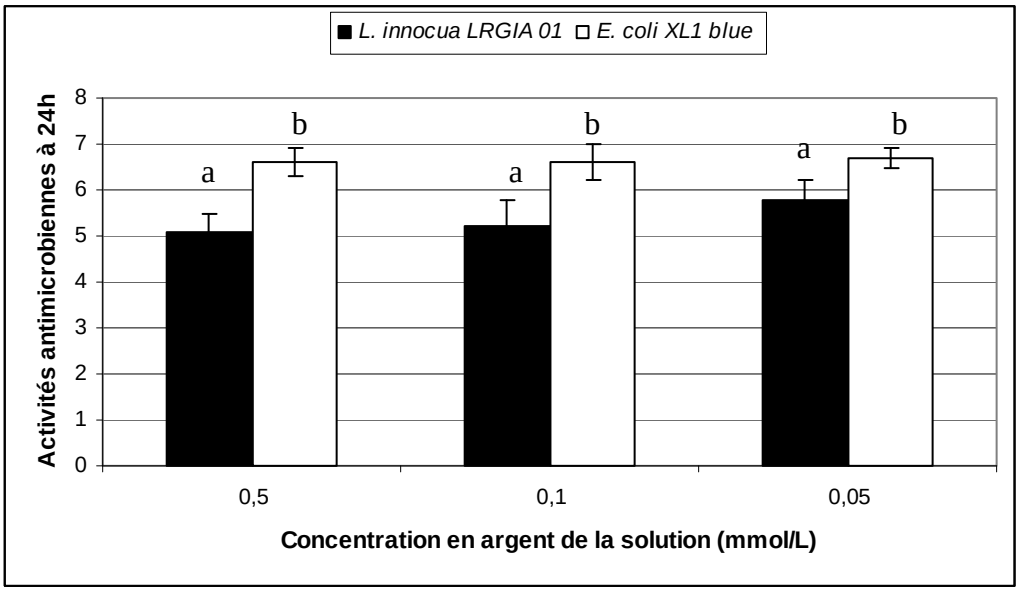


Figure 4-18 : Activités anti- *L. innocua* (noir) et anti- *E. coli* (blanc), suivant la norme 20743/2005, pour les textiles imprégnés de suspensions d'Ag°-TiO_2 par sol-gel, après exposition 60 min à la lumière UV, 0.,5 ; 0,1 et 0,05 mmol/L d'$AgNO_3$ et 2,4 mmol/L TiO_2. n = 2. Chaque lettre (a ou b) indique un groupe statistique homogène. Les nombres représentés par les lettres a ou b dans chaque cas sont différentes (a<b). Les résultats avec différentes lettres sont ainsi significativement différenciés par le test de Fisher (p<0,05).

Pour les 3 concentrations en $AgNO_3$ employées, les activités antimicrobiennes à 24 h pour les textiles imprégnés par sol-gel d'une suspension d'Ag°-TiO_2 sont statistiquement plus importantes pour *E. coli* XL1 blue que pour *L. innocua* LRGIA 01.

Les activités mesurées sont respectivement de 6,7 ± 0,2 ; 6,6 ± 0,4 et 6,6 ± 0,3 pour *E. coli* XL1 blue et de 5,8 ± 0,4 ; 5,2 ± 0,6 et 5,1 ± 0,4 pour *L. innocua* LRGIA 01 pour les 3 concentrations d'$AgNO_3$ déposées (0,05 ; 0,1 et 0,5 mmol/L). Ces résultats indiquent donc une forte activité des 3 textiles contre les 2 souches testées. *E. coli* XL1 blue est plus sensible que *L. innocua* LRGIA 01 à ce type de textiles antimicrobiens et par conséquent à l'activité induite par les nanoparticules d'argent formées lors du dépôt sur textiles. De la même façon que pour le traitement plasma, il n'y a pas d'influence de la concentration en argent. En effet, l'activité antimicrobienne n'est pas plus importante lorsque la quantité d'argent augmente. Ces informations sont importantes pour les 2 méthodologies car, dans les 2 cas, une coloration brune voire grise apparaissait au niveau du textile lorsque la concentration en argent était élevée comme dans le cas du traitement plasma avec de fortes épaisseurs d'argent.

De façon générale, l'activité antibactérienne des ions Ag^+ et plus récemment des nanoparticules d'argent a été établie. Plusieurs études ont montré que les nanoparticules d'argent peuvent s'attacher à la surface membranaire et perturber la perméabilité membranaire et les fonctions de respiration de la cellule. D'une façon générale, les nanoparticules d'argent de petites tailles ont une plus grande surface de contact avec les cellules ce qui leur confère une meilleure activité antimicrobienne que les nanoparticules de grande taille [25]. Dans le cadre de cette étude, il a été montré que les nanoparticules d'argent déposées sur les textiles ont des diamètres de 2 à 15 nm. Le mécanisme d'action antibactérien des nanoparticules d'argent semble être lié à l'aire spécifique de ces dernières. En effet, les plus petites particules possèdent une plus grande aire spécifique ce qui entraîne une meilleure activité antimicrobienne. Morones *et al.* [26] ont étudié l'effet de nanoparticules d'argent de différentes tailles (de 1 à 100 nm) sur une bactérie à Gram négatif (*E. coli*) en utilisant notamment la microscopie électronique à transmission (MET). Dans cette étude, des nanoparticules ont été introduites dans l'eau et la caractérisation de ces dernières a été effectuée par MET. Dans le but d'étudier l'interaction des nanoparticules d'argent de différentes tailles avec *E. coli*, une série de milieux gélosés a été coulée en incorporant différentes concentrations d'argent (0, 25, 50, 75 et 100 µg/mL) et 10 µL d'une culture bactérienne d'*E. coli* ont été inoculés en surface. Il a été montré qu'une concentration de 75 µg/mL empêchait la croissance de la souche de façon significative pour une taille de nanoparticules d'environ 16 nm et les observations par microscopie électronique à

transmission (MET) ont confirmé que des nanoparticules d'argent étaient présentes au niveau de la membrane bactérienne. De plus, il a été montré que la plus petite taille de nanoparticules (5 nm) entraînait une très bonne activité vis-à-vis de cette souche ce qui montre que l'activité antibactérienne des nanoparticules d'argent dépend de leur taille. Dans notre étude la petite taille des nanoparticules (de 2 à 25 nm) contribue probablement à la forte activité vis-à-vis des 2 souches bactériennes testées notamment vis-à-vis d'*E. coli* XL1 blue. Dans l'étude de Shrivastava *et al.* [27], les auteurs ont étudié les propriétés antibactériennes de nanoparticules d'argent. Les essais ont été réalisés aussi bien sur des souches à Gram positif que des souches à Gram négatif résistantes ou non à des antibiotiques ainsi que sur une souche multi résistante. L'effet de ces nanoparticules d'argent sur les différentes souches (Gram positives et Gram négatives) a été étudié en cultivant les différentes souches à une concentration de 10^6 UFC/boîte sur des milieux de culture supplémentés de nanoparticules à des concentrations de 5, 10, 25 ou 35 µg/mL. Des boîtes sans nanoparticules servant de témoin ont également été ensemencées servant de témoin. Les boîtes ont ensuite été incubées 24 h à 37°C et le nombre de colonies a ensuite été dénombré. En parallèle, une étude en milieu liquide a été réalisée. L'effet des nanoparticules d'argent s'est avéré être plus prononcé envers les bactéries à Gram négatif qu'envers les bactéries à Gram positif, indépendamment du fait que les souches soient résistantes aux antibiotiques.

Pour les 2 types de bactéries, il a été montré par que les nanoparticules sont capables de traverser la paroi cellulaire des bactéries, de rompre le peptidoglycane et par la suite d'entraîner la destruction des cellules [28]. Bien que le mécanisme d'action de ces nanoparticules d'argent ne soit pas connu précisément, des propositions de mode d'action basées sur les observations de différents auteurs sur les changements structuraux des cellules après traitement ont pu être proposées. Les nanoparticules d'argent métalliques montrent des activités antimicrobiennes plus importantes que les sels d'argent en solution du fait de leurs surfaces de contact plus grandes avec les micro-organismes. Les nanoparticules sont capables de s'attacher à la membrane des cellules et pénètrent à l'intérieur des bactéries. Elles interagissent avec les protéines de la membrane contenant du soufre et les molécules telles que l'ADN contenant du phosphore [29, 30]. De plus, les nanoparticules d'argent sont capables de libérer des ions argent [31] suite à l'oxydation de leur surface, ce qui entraîne une augmentation de leur activité.

Dans le cadre de cette étude, l'argent a été associé au TiO_2 dans le but de réaliser des dépôts sur textiles par méthodologie sol-gel et il faut noter que les surfaces associant l'argent au TiO_2 ont des propriétés intéressantes telles que la photocatalyse de la lumière visible ou encore la

biocompatibilité [32], en plus de leur activité antimicrobienne. En utilisant l'énergie lumineuse, l'eau et l'oxygène de l'air, les photocatalyseurs engendrent la formation de radicaux libres, capables notamment de détruire les micro-organismes. A l'activité antimicrobienne de l'argent s'associe donc l'activité antimicrobienne des radicaux libres formés en présence de lumière par le TiO_2. Sur ce type de textiles traités par méthodologie sol-gel à l'argent, aucun test de lavage n'a été réalisé et il s'agira donc d'une seconde étape à réaliser après la mise au point du traitement.

6. Conclusion

L'argent est un métal de choix dans cette étude car il possède des propriétés antimicrobiennes et un large spectre d'action. Depuis quelques années, il a été utilisé pour différentes applications telles que les pansements, les cathéters [33] ou les emballages antimicrobiens [34]. L'activité antimicrobienne de l'argent dépendrait essentiellement des ions Ag^+ qui se fixent sur les groupes donneurs d'électrons présents au niveau de la membrane des bactéries. Les caractères de surface des souches microbiennes peuvent également conditionner leur adhésion. En effet, chaque souche possède des caractères hydrophobes ou hydrophiles différents ce qui lui permet d'adhérer plus ou moins facilement sur des surfaces hydrophiles ou hydrophobes. La technique de MATS, décrite dans le chapitre 3, a permis de mettre en évidence des différences de propriétés de surface des souches utilisées dans le projet. En effet, *S. aureus* méthi-R nosoco 3011 et *L. innocua* LRGIA 01 seraient des souches plutôt hydrophobes et *P. aeruginosa* ATCC 15742 et *L. monocytogenes* AER 102 seraient plutôt des souches hydrophiles, les 4 étant donneuses d'électrons.

La technologie plasma est utilisée à l'échelle industrielle pour modifier la surface de textiles dans le but de leur apporter certaines fonctionnalités [35, 36]. Cette technologie permet de réaliser des modifications chimiques de la première couche de la surface du textile et le dépôt de matériaux variés [36]. Différents protocoles ont été développés par la société HEF pour, dans un premier temps obtenir des textiles blancs sans coloration. En effet, lors des premiers dépôts, la couche d'argent déposée était tellement importante que la coloration des textiles était trop marquée (du gris au jaune clair). Les activités antimicrobiennes vis-à-vis de *L. innocua* LRGIA 01 pour les textiles avec dépôt d'une simple couche d'argent à leur surface se sont avérées être très importantes. En effet toutes les activités antimicrobiennes de ces textiles étaient largement supérieures à 2. Grâce à ces analyses, il a été montré qu'une faible quantité

d'argent déposée était suffisante pour avoir une bonne activité antimicrobienne vis-à-vis de *L. innocua* LRGIA 01.

L'utilisation d'une faible quantité d'argent est également un point important à maitriser pour limiter la cytotoxicité des textiles antimicrobiens. Plusieurs études concernant la cytotoxicité de l'argent sont disponibles. En effet, il a été montré que l'argent n'avait pas d'effet sur des cellules de souris *in vitro* [11] et Lee *et al.* [37] ont montré que l'argent fixé à la surface de textiles à base de coton n'entraînait pas d'irritation cutanée sur des cochons d'Inde. Cependant, Braydich-Stolle *et al.* [38] ont mis en évidence la toxicité de nanoparticules d'argent sur une lignée de cellules (cellules souches de la spermatogénèse) lors d'exposition à de fortes concentrations (entre 5 et 10 µg/mL de nanoparticules d'argent de 15 nm de diamètre). Il est donc important d'avoir une concentration en nanoparticules d'argent faible à la surface des textiles fonctionnalisés.

Des textiles P/C ont été fonctionnalisés avec une couche d'Ag-SiOCH puis encapsulé avec une couche d'Al_2O_3 ou de SiOCH dans l'objectif de « protéger » la couche contenant l'agent actif. Dans le cas de ces textiles traités Ag-SiOCH et encapsulés Al_2O_3 ou SiOCH, différents cas de figures se sont présentés. En effet, 2 types de conditions de dépôt de l'argent (100 et 300 W de puissance de dépôt) et d'encapsulation (SiOCH et Al_2O_3) ont été considérées.

D'après les analyses, la teneur en argent dans les dépôts sans encapsulation est plus importante pour la condition H (puissance de dépôt de 300 W) que pour la condition L (puissance de dépôt de 100 W) alors que les épaisseurs des dépôts sont quasiment identiques (4,8 nm pour la condition L contre 4,7 pour la condition H). Dans le cas des encapsulations, l'argent n'est pas détecté en surface par méthode XPS mais il est très faiblement détecté par méthode ToF-SIMS. Le fait d'avoir malgré tout une bonne activité antimicrobienne peut être expliquée par le fait que lors du dépôt des cellules bactériennes, apportées par un milieu liquide, il y aurait diffusion d'ions argent de la couche Ag-SiOCH à travers la couche d'encapsulation et jusqu'aux cellules bactériennes en contact ce qui entraînerait une activité antimicrobienne mais l'argent sous forme d'ions ne serait pas détecté par les méthodes d'analyses de surface utilisées.

Si on compare les matrices d'encapsulation employées, les activités sont plus fortes dans le cas de l'alumine (entre 4,0 et 5,1 pour l'alumine contre 2,8 à 3,7 pour le SiOCH). Il faut cependant noter que les épaisseurs d'encapsulation ne sont pas les mêmes (50, 200 et 1000 nm pour les encapsulations SiOCH et 60, 150 et 320 nm pour les encapsulations Al_2O_3). La différence d'activité antimicrobienne avec ces 2 types de matrice d'encapsulation pourrait être

lié à des différences au niveau de leurs propriétés physico-chimiques : différence d'hydrophobicité et/ou différence de structure du dépôt et/ou différence de diffusion à travers la couche de SiOCH ou d'alumine avec notamment une différence de porosité entre les 2 types de matériaux ou des phénomènes électrochimiques.

Si on compare les deux types de technologie (sol-gel et plasma) pour la fonctionnalisation des textiles : dans le cas des textiles les plus aboutis pour le traitement plasma, les textiles encapsulés Al_2O_3 ou SiOCH, dans les deux cas, des nanoparticules d'argent ont été déposées à la surface des textiles. En effet, dans le cas du traitement plasma Ag-SiOCH encapsulé, une couche d'argent d'environ 1 nm a été déposée ce qui a entraîné l'agrégation des particules d'argent entre elles formant des nanoparticules. Ces nanoparticules ont pu être observées au MEB. Dans le cas du sol-gel, le principe du traitement était de mettre au point des nanoparticules d'argent en solution grâce à un mélange d'$AgNO_3$ et de TiO_2.

Le mode d'action de l'argent n'est à ce jour, pas encore décrit de façon détaillée. Chaw *et al.* [39] ont montré que les ions argent étaient capables de déstabiliser la matrice d'un biofilm en se fixant aux groupes donneurs d'électrons des membranes biologiques. Après 60 min de contact entre les ions argent et un biofilm de 2 jours de *Staphylococcus epidermidis*, la structure du biofilm apparait partiellement détruite. Dans notre étude, il peut être suggéré que les cellules de *L. innocua* LRGIA 01 en contact avec le textile fonctionnalisé à l'argent par méthodologie plasma sont altérées et se détachent de la surface du textile. De ce fait aucune bactérie ne peut être observée par MEB après 24 h de contact. Quelques cellules déformées ont également été observées après contact avec le textile traité ce qui a été observé auparavant par d'autres auteurs [18, 19].

Des textiles fonctionnalisés par la méthodologie plasma PVD/PECVD ont présenté une activité antimicrobienne marquée vis-à-vis de *L. innocua* LRGIA 01 et *E. coli* XL1 blue avec un dépôt totalement transparent. Un textile antimicrobien a également obtenu par méthodologie sol-gel avec de l'argent. Ce textile s'est avéré être très efficace vis-à-vis des 2 souches testées. Il faut cependant prendre en compte l'effet de l'argent sur les cellules eucaryotes d'où la nécessité de disposer de tests *in vivo* développés par la société Biomatech (Châsse sur Rhône) partenaire du projet Actiprotex.

7. Références bibliographiques

[1] K. Catchpole, S. Pillai, K. Lin. Novel applications for surface plasmons in photovoltaics. *Photovoltaic Energy Conversion, Proceedings of 3rd World Conference* (2003) **3**: pp. 2714-2717.

[2] K. S. Virender, A. Y. Ria, Y. Lin. Silver nanoparticles: green synthesis and their antimicrobial activities. *Advances in Colloid and Interface Science* (2009) **145**: pp. 83-96.

[3] K. Vimala, Y. Murali Mohan, K. Samba Sivudu, K. Varaprasad, S. Ravindra, N. Narayana Reddy, Y. Padma, B. Sreedhar, K. MohanaRaju. Fabrication of porous chitosan films impregnated with silver nanoparticles: a facile approach for superior antibacterial application. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* (2010) **76 (1)**: pp. 248-258.

[4] S. K. Chettra. Microscopy and surface chemical investigations of dyed cellulose textiles. Thesis, University of Nottingham. 2006.

[5] M. R. Beresford, P. W. Andrew, G. Shama. *Listeria monocytogenes* adheres to many materials found in food-processing environments. *Journal of Applied Microbiology* (2001) **90**: pp. 1000-1005.

[6] H. Takahashi, T. Suda, Y. Tanaka, B. Kimura. Cellular hydrophobicity of *Listeria monocytogenes* involves initial attachment and biofilm formation on the surface of polyvinyl chloride. *Letters in Applied Microbiology* (2010) **50 (6)**: pp. 618-625.

[7] R. Briandet, T. Meylheuc, C. Maher, M. N. Bellon-Fontaine. *Listeria monocytogenes* scott A: cell surface charge, hydrophobicity, and electron donor and acceptor characteristics under different environmental growth conditions. *Applied and Environmental Microbiology* (1999) **65**: pp. 5328-5333.

[8] N. Oulahal, W. Brice, A. Martial, P. Degraeve. Quantitative analysis of survival of *Staphylococcus aureus* or *Listeria innocua* on two types of surfaces: polypropylene and stainless steel in contact with three different dairy products. *Food Control* (2008) **19**: pp. 178-185.

[9] J. Harvey, K.P. Keenan, A. Gilmour. Assessing biofilm formation by *Listeria monocytogenes* strains. *Food Microbiology* (2007) **24**: pp. 380-392.

[10] E. Sinde, J. Carballo. Attachment of *Salmonella spp.* and *Listeria monocytogenes* to stainless steel, rubber and polytetrafluorethylene: the influence of free energy and the effect of commercial sanitizers. *Food Microbiology* (2000) **17**: pp. 439-447.

[11] T. J. Berger, J. A. Spadaro, S. E. Chapin, R. O. Becker. Electrically generated silver ions: quantitative effects on bacterial and mammalian cells. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* (1976) : pp. 357-358.

[12] K. I. Batarseh. Anomaly and correlation of killing in the therapeutic properties of silver (I) chelation with glutamic and tartaric acids. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* (2004) **54**: pp. 546-548.

[13] M. M. Cowan, K. Z. Abshire, S. L. Houk, S. M. Evans. Antimicrobial efficacy of a silver-zeolite matrix coating on stainless steel. *Journal of Industrial Microbiology Biotechnology* (2003) **30**: pp. 102-106.

[14] M. Yamanaka, K. Hara, J. Kudo. Bactericidal actions of a silver ion solution on *Escherichia coli*, studied by energy-filtering transmission electron microscopy and proteomic analysis. *Applied and Environmental Microbiology* (2005) **71**: pp. 7589-7593.

[15] H. Wang, J. Wang, J. Hong, Q. Wei, W. Gao, Z. Zhu. Preparation and characterization of silver nanocomposite textile. *Journal of Coatings Technology and Research* (2007) **4**: pp. 101-106.

[16] J. W. Costerton, P. S. Stewart, E. P. Greenberg. Bacterial biofilms: a common cause of persistent infections. *Science* (1999) **284 (5418)**: pp. 1318-1322.

[17] K. Lewis. Riddle of biofilm resistance. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* (2001) **45 (4)**: pp. 999-1007.
[18] D. Lindsay, V. S. Brözel, J. F. Mostert, A. Von Holy. Differential efficacy of a chlorine dioxide-containing sanitizer against single species and binary biofilms of a dairy-associated *Bacillus cereus* and a *Pseudomonas fluorescens* isolate. *Journal of Applied Microbiology* (2002) **92**: pp. 352-361.
[19] G.A DeQueiroz, D. F. Fay. Antimicrobial activity and effectiveness of a combination of sodium hypochlorite and hydrogen peroxide in killing and removing *Pseudomonas aeruginosa* biofilms from surfaces. *Journal of Applied Microbiology*, (2007) **103**: pp. 794-802.
[20] A. I. Maaroof, G. B. Smith. Effective optical constants of nanostructured thin silver films and impact of an insulator coating. *Thin Solid Films* (2005) **485**: pp. 198-206.
[21] M. Ip, S. Lai Lui, V. K. M. Poon, I. Lung, A. Burd. Antimicrobial Activities of silver dressings: an in vitro comparison. *Journal of Medical Microbiology* (2006) **55**: pp. 59-63.
[22] B. Serier, A. Berroug, D. Juve, D. Tréheux, E. G. Moya. Silver-alumina solid state bonding: Study of diffusion and toughness close to the interface. *Journal of the European Ceramic Society* (1993) **12**: pp. 385-390.
[23] H. W. Kim, B. R. Kim, Y. H. Rhee. Imparting durable antimicrobial properties to cotton fabrics using alginate–quaternary ammonium complex nanoparticles. *Carbohydrate Polymers* (2010) **79 (4)**: pp. 1057-1062.
[24] L. Kvitek, A. Panacek, J. Soukupova, M. Kolar, R. Vecerova, R. Prucek, M. Holecova, R. Zboril. Effect of surfactants and polymers on stability and antibacterial activity of silver nanoparticles (NPs). *Journal of Physical Chemistry* (2008) **112 (15)**: pp. 5825-5834.
[25] J. R. Morones, J. L. Elechiguerra, A. Camacho, K. Holt, J. B. Kouri, J. T. Ramirez, M. J. Yacaman. The bactericidal effect of silver nanoparticles. *Nanotechnology* (2005) **16**: p. 2346–2353.
[26] S. Shrivastava, T. Bera, A. Roy, G. Singh, P. Ramachandrarao, D. Dash. Characterization of enhanced antibacterial effects of novel silver nanoparticles. *Nanotechnology* (2007) **18**: pp. 103-112.
[27] V. K. Sharma, R. A. Yngard, Y. Lin. Silver nanoparticles: green synthesis and their antimicrobial activities. *Advances in Colloid and Interface Science* (2009) **145 (1-2)**: pp. 83-96.
[28] D. W. Hatchett HSW. Electrochemistry of sulfur adlayers on the low-index faces of silver. *The Journal of Physical Chemistry* (1996) **100 (23)**: pp. 9854-9859.
[29] S. Ahrland. The relative affinities of ligand atoms for acceptor molecules and ions: a long story revisited. *Coordination Chemistry Reviews* (1996) **154**: pp. 13-18.
[30] Q. L. Feng, J. Wu, G. Q. Chen, F. Z. Cui, T. N. Kim, J. O. Kim. A mechanistic study of the antibacterial effect of silver ions on *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus*. *Journal of Biomedical Materials Research Part A* (2000) **52**: pp. 662-668.
[31] Y. Liu, X. Wang, F. Yang, X. Yang. Excellent antimicrobial properties of mesoporous anatase TiO_2 and Ag/TiO_2 composite films. *Microporous and Mesoporous Materials* (2008) **114 (1-3)**: pp. 431-439.
[32] D. P. Dowling, K. Donnelly, M. L. Mc Connell, R. Eloy, M. N. Arnaud. Deposition of anti-bacterial silver coatings on polymeric substrates. *Thin Solid Films* (2001) **398-399**: pp. 602-606.
[33] L. Vermeiren, F. Devlieghere, J. Debevere. Effectiveness of some recent antimicrobial packaging concepts. *Food Addititves and Contaminants* (2002) **19**: pp. 163-171.
[34] J. Meichsner, M. Nitschke, R. Rochotzki, M. Zeuner. Fundamental investigations in plasma modification of polymers. *Surface Coating Technology* (1995) **74**: pp. 227-231.

[35] F. Leroux. Etude des traitements plasma à pressions atmosphériques - Applications à l'industrie textile. Thèse de l'Université de Valencienne (2007) **N° 07/52**.

[36] H. Y. Lee, H. K. Park, Y. M. Lee, K. Kim, S. B. Park. A practical procedure for producing silver nanocoated fabric and its antibacterial evaluation for biomedical applications. *Chemical Communication* (2007) **10**: pp. 2959-2961.

[37] L. Braydich-Stolle, S. Hussain, J. J. Schlager, M. C. Hofmann. *In Vitro* cytotoxicity of nanoparticles in mammalian germline stem cells. *Toxicological Sciences* (2005) **88**: pp. 412-419.

[38] K. C. Chaw, M. Manimaran, F. E. H. Tay. Role of silver ions in destabilization of intermolecular adhesion forces measured by atomic force microscopy in *Staphylococcus epidermidis* biofilms. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* (2005) **49**: pp. 4853-4859.

Chapitre 5 : Activité antimicrobienne d'un textile fonctionnalisé avec du PHMB par foulardage et co-précipitation du PHMB avec du laurylsulfate (suivant le procédé décrit dans le brevet n° EP 0 955 069 de l'IFTH)

Chapitre 5 : Activité antimicrobienne d'un textile fonctionnalisé avec du PHMB par foulardage et co-précipitation du PHMB avec du laurylsulfate (suivant le procédé décrit dans le brevet n° EP 0 955 069 de l'IFTH)

1. Fonctionnalisation et caractérisation de la composition chimique de l'extrême surface d'un textile traité par foulardage au PHMB selon le brevet EP n° 0955069 de l'IFTH 232
1.1. Fonctionnalisation 232
1.2. Analyse par XPS de la composition chimique de surface des textiles traités au PHMB/LS 233
1.3. Analyse par ToF-SIMS de la composition chimique de surface des textiles traités au PHMB/LS 234

2. Effet du contact avec le textile traité au PHMB/LS sur les micro-organismes : activité antimicrobienne sur différentes souches et évaluation de l'état physiologique des micro-organismes..... 236
2.1. Activités antimicrobiennes des textiles traités au PHMB/LS avant et après lavage ……..... 237
2.2. Etude de l'état physiologique par microscopie à épifluorescence de *L. innocua* LRGIA 01, *S. aureus* méthi-R nosoco 3011 et *P. aeruginosa* ATCC 15742 après contact avec un textile traité au PHMB/LS 241
2.3. Observation des textiles traités au PHMB/LS par MEB après contact avec *Listeria innocua* LRGIA01 247

3. Etude de la fluidité membranaire de *Listeria innocua* LRGIA 01 après contact avec le PHMB en milieu liquide 249
3.1. Etude de la fluidité de la membrane de *L. innocua* LRGIA 01 après contact avec le PHMB en milieu liquide 249
3.2. Utilisation du DPH et du TMA-DPH pour évaluer la fluidité de la membrane de *L. innocua* LRGIA 01 après contact avec le PHMB en milieu liquide..... 251

4. Evaluation des changements au niveau la membrane de *Listeria innocua* LRGIA 01 après contact avec le PHMB en milieu liquide par spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier (IRTF)..... 258
4.1. Spectre infrarouge type de *L. innocua* LRGIA 01 avant contact avec le PHMB 259
4.2. Comparaison des spectres infrarouges des cellules de *L. innocua* LRGIA 01 avant et après contact avec le PHMB 261

5. Conclusion..... 268

6. Références bibliographiques 270

Chapitre 5 : Activité antimicrobienne d'un textile fonctionnalisé avec du PHMB par foulardage et co-précipitation du PHMB avec du laurylsulfate (suivant le procédé décrit dans le brevet n° EP 0 955 069 de l'IFTH)

Ce chapitre porte sur l'étude de l'activité antimicrobienne de textiles fonctionnalisés avec du PHMB. Le PHMB a été déposé à la surface des textiles par foulardage dans une solution contenant 0,2 % (m/v) de PHMB et 1% (m/v) de laurylsulfate ce qui permet d'obtenir le dépôt d'un précipité insoluble dans les conditions décrites dans le brevet EP n° 0955069 de l'IFTH. L'évolution de la composition chimique de l'extrême surface des textiles suite à ce dépôt a été analysée par XPS et ToF-SIMS (au LSA et par la société Sciences et Surfaces) avant et après différents cycles de lavages. Parallèlement, l'activité antimicrobienne des textiles immédiatement après foulardage puis après différents cycles de lavage a également été évaluée. La mise en relation des résultats d'analyse de composition chimique et d'activité antimicrobienne a aussi permis d'évaluer la stabilité au lavage du dépôt effectué et de l'activité antimicrobienne vis-à-vis de 3 souches (*L. innocua* LRGIA 01, *S. aureus* méthi-R nosoco 3011 et *P. aeruginosa* ATCC 15742). La mesure d'activité antimicrobienne des textiles permet de mesurer l'évolution des populations de bactéries cultivables sur les textiles mais elle ne permet pas d'évaluer si les cellules bactériennes non cultivables sont mortes ou encore viables. En effet, les cellules viables non cultivables sont, suite à des stress comme l'exposition à un agent antimicrobien, dans un état qui peut évoluer vers la mort cellulaire ou sous certaines conditions vers une reprise de la division cellulaire. Le fait de ne pas prendre en compte, par les techniques de microbiologie dite « pasteurienne », reposant sur la multiplication des micro-organismes dans des milieux de culture, des bactéries viables non cultivables peut donc conduire à une sous-estimation de la présence de micro-organismes à risque. C'est pourquoi des observations microscopiques directes en présence de marqueurs de viabilité cellulaire fluorescents ont été effectuées. La comparaison des méthodes « pasteurienne » et de ces observations microscopiques a permis de distinguer les cellules de *L. innocua* LRGIA 01 viables de celles qui sont viables mais non cultivables et des cellules mortes. Enfin, dans le but de préciser le mécanisme d'action du PHMB sur une des bactéries cibles (*L. innocua* LRGIA 01), des mesures de fluidité membranaire ont été effectuées. Des mesures d'anisotropie de fluorescence en présence de 2 sondes fluorescentes (le DPH et le TMA-DPH) en présence de PHMB à différentes concentrations ont en effet permis de d'évaluer dans quelle mesure cet agent antimicrobien modifie la fluidité de la membrane des cellules de *L. innocua* LRGIA 01. L'interaction du PHMB avec les membranes des micro-organismes qui y sont sensibles est en effet un des mécanismes décrits dans la littérature comme étant à l'origine de son action antimicrobienne. Les spectres infrarouges des cellules de *L. innocua* LRGIA 01 avant et après exposition au PHMB à différentes concentrations et pendant différentes durées ont été comparés. La spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier est en effet une technique qui permet d'apprécier des modifications chimiques et/ou de structure de composant des cellules bactériennes tels que les lipides ou les protéines par exemple. Une partie de ce chapitre a fait l'objet de la rédaction d'une publication parue présentée en annexe 4.

1. Fonctionnalisation et caractérisation de la composition chimique de l'extrême surface d'un textile traité par foulardage au PHMB selon le brevet EP n° 0955069 de l'IFTH

Dans un premier temps, le procédé de fonctionnalisation du textile par le PHMB/LS par l'IFTH est présenté. Dans le cadre du projet Actiprotex, l'IFTH a fonctionnalisé des textiles avec différents agents antimicrobiens tels que le PHMB, un ammonium quaternaire ou encore une solution à base d'argent. Dans le cadre de ce chapitre, seuls les textiles fonctionnalisés avec du PHMB dont l'activité antimicrobienne s'est révélée efficace sont présentés.

1.1. Fonctionnalisation

L'IFTH possède un savoir faire dans le domaine du textile et a testé différentes formulations de liants pour fixer le PHMB à la surface du textile. Comme indiqué dans le chapitre 2 « Matériels et Méthodes », un mélange de 0,2 % (m/v) de PHMB (1 % v/v d'une solution à 200 g/L) et de 1% de LS (m/v) ont été mis en contact dans le but d'obtenir un précipité insoluble (brevet EP n° 0955069) car au-delà de 1% pour le LS, ce dernier n'est pas stable en mélange avec le PHMB. Le textile est trempé dans ce mélange puis passé dans un foulard (foulardage). Le textile est exprimé entre les rouleaux (à une pression de 1 bar) puis séché à 100°C.

Dans un second temps, des lavages « ménagers » (notés par la suite lavages « TDV » car réalisés au sein de la société TDV) pour un premier criblage ou industriels (notés par la suite « CTTN » pour Centre Technique de la Teinture et du Nettoyage) ont également été testés. Les vêtements de travail en industrie nécessitent un nettoyage régulier et drastique dans le but d'éliminer les souillures et contaminations. Le traitement antimicrobien se doit donc de résister à ces lavages. Les lavages industriels sont une composante majeure à prendre en compte dans le cadre d'une utilisation en industrie agro-alimentaire.

Des analyses XPS et ToF-SIMS ont été réalisées pour caractériser l'extrême surface des textiles fonctionnalisés avant et après lavages industriels. Pour la caractérisation des textiles, le textile de référence utilisé est un textile lavé rincé (appelé ECE par la suite) de façon à éliminer les impuretés qui pourraient fausser les mesures et le lavage réalisé à l'aide de la norme ISO 15797 (lavage industriel) sera appelé lavage CTTN. Ce type de lavage inclus un cycle lessiviel, avec une lessive de référencé dans la norme, de 20 minutes à 85°C suivi d'un rinçage, d'une javellisation et d'une finition en cabine à une température de 155°C. Les

lavages ménagers consistent en une étape de lavage à 90°C avec la lessive Bahia (lessive industrielle). La composition des 2 types de lessives employées est indiquée dans le chapitre « Matériels et Méthodes ». Les échantillons qui ont été comparés sont présentés dans le tableau 5-1 avec les références associées pour une lecture simplifiée.

Tableau 5-1 : Liste des échantillons étudiés et identification des échantillons, textiles C/P, après lavage ECE (L ECE), après traitement antimicrobien PHMB/LS (LS/PHMB) et après lavage industriel selon la norme ISO 15797 (L CTTN) appliqués sur les textiles traités et non traités

Identification des échantillons	Traitements
Echantillon A	C/P seul
Echantillon B	C/P + 1 L ECE = REFERENCE
Echantillon C	REFERENCE + 1 L CTTN
Echantillon D	REFERENCE + 5 L CTTN
Echantillon E	REFERENCE + LS/PHMB
Echantillon F	REFERENCE + LS/PHMB + 1 L CTTN
Echantillon G	REFERENCE + LS/PHMB + 5 L CTTN

Avant tout traitement avec le brevet de l'IFTH, les textiles ont subi systématiquement un lavage ménager standardisé avec la lessive normalisée ECE de façon à éliminer les impuretés : il s'agit de l'échantillon noté « REFERENCE » dans le tableau 5-1.

1.2. Analyse par XPS de la composition chimique de surface des textiles traités au PHMB/LS

Les analyses XPS ont été réalisées au sein du LSA et de la société Sciences et Surfaces. Les résultats sont présentés dans le tableau 5-2. L'information la plus importante apportée par l'analyse XPS est la variation du pourcentage atomique des composants se trouvant à l'extrême surface des textiles, permettant de suivre la composition chimique des textiles avant et après traitement de surface.

Les signatures caractéristiques du traitement antimicrobien PHMB/LS à la surface des échantillons sont la présence de soufre (S) et d'azote (N) respectivement pour le LS et le PHMB. Les composés majoritaires de ces 2 molécules sont donc représentés par le soufre et l'azote. Les 2 lessives analysées ici contiennent également en majorité des composés à base de soufre. En effet, par XPS, il y a détection de 0,3 ± <0,1 % d'azote (N) et 1,5 ± <0,1 % de soufre (S) (en pourcentage atomique) pour la lessive utilisée pour les lavages industriels et il n'y a pas de détection d'azote mais 4,7 ± 0,1 % de soufre pour la lessive ECE. Lors de l'interprétation des résultats, il sera donc nécessaire de comparer le textile lavé sans traitement et le textile lavé avec un traitement PHMB/LS afin de prendre en compte les éventuels résidus de lessive encore présents.

Tableau 5-2 : Résultats des analyses XPS en concentration atomique (% atomique) à la surface des échantillons C/P non traités, lavés ECE et CTTN et après traitement antimicrobien au PHMB/LS avant et après lavages CTTN. Les lessives ECE et de la norme 15797 ont également été analysées. n = 3

Echantillons	C	**N**	O	Na	Si	P	**S**	Ca	Mg	Cl
Echantillon A	67,5 ± 0,2	**0,3 ± 0,1**	30,4 ± 0,2	nd	0,7 ± 0,2	0,1 ± <0,1	<0,1	0,7 ± <0,1	0,3 ± <0,1	<0,1
Echantillon B	62,6 ± 0,5	**0,3 ± <0,1**	35,2 ± 0,9	nd	0,5 ± 0,2	0,3 ± 0,1	**0,2 ± <0,1**	0,7 ± <0,1	0,2 ± 0,1	<0,1
Echantillon C	60,7 ± 0,8	**0,2 ± 0,1**	38,7 ± 1,2	0,2 ± <0,1	<0,1	<0,1	<0,1	0,2 ± <0,1	<0,1	<0,1
Echantillon D	60,2 ± 0,6	<0,1	39,5 ± 0,5	0,2 ± 0,1	<0,1	<0,1	<0,1	0,1 ± <0,1	<0,1	<0,1
Echantillon E	70,4 ± 0,6	**11,9 ± 0,5**	14,6 ± 0,1	nd	0,2 ± <0,1	<0,1	**2,8 ± 0,2**	0,1 ± <0,1	<0,1	<0,1
Echantillon F	65,1 ± 0,2	**5,2 ± 0,5**	28,5 ± 0,5	0,2 ± <0,1	0,1 ± <0,1	0,3 ± <0,1	**0,5 ± <0,1**	0,1 ± <0,1	<0,1	<0,1
Echantillon G	62,2 ± 1,5	**2,4 ± 1,5**	34,4 ± 3,3	0,2 ± 0,1	0,2 ± <0,1	0,3 ± <0,1	**0,2 ± <0,1**	0,1 ± <0,1	<0,1	<0,1
Lessive ECE	59,7 ± 0,7	<0,1	25,8 ± 0,3	8,9 ± 0,3	nd	0,7 ± <0,1	**4,7 ± <0,1**	<0,1	<0,1	0,2 ± <0,1
Lessive de la norme ISO 15797	62,5 ± 1,1	**0,3 ± <0,1**	28,2 ± 0,4	6,3 ± 0,4	0,7 ± 0,1	0,4 ± <0,1	**1,5 ± <0,1**	<0,1	<0,1	0,1 ± <0,1

D'après les résultats obtenus par XPS, le lavage ECE (échantillon A) n'entraîne pas de modification de la surface du textile et les résidus N et S sont très faiblement détectés. En effet, seulement 0,3 % et 0,2 % atomique sont retrouvés respectivement pour N et pour S et il en est de même avant lavage (échantillon B). Le fait de laver ce textile de façon industrielle une fois (échantillon C) et cinq fois (échantillon D) entraîne également une faible détection de N et de S ce qui montre que la lessive employée dans les lavages industriels est bien rincée au cours du processus de lavage.

Pour le textile traité au PHMB/LS (échantillon E), on retrouve 11,9 ± 0,5 % de N et 2,8 ± 0,2 % de S. Après 1 et 5 lavages industriels (échantillon F et G respectivement) les pourcentages de N et de S sont diminués et on retrouve 5,2 ± 0,5 % de N et 0,5 ± <0,1 % de S pour 1 lavage (échantillon F) et 2,4 ± 1,5 % de N et 0,2 ± < 0,1 % de S pour 5 lavages (échantillon G). Le traitement antimicrobien entraîne donc une détection significative des composés S (2,8 ± 0,2 %) et N (11,9 ± 0,5 %) par la technique XPS et lorsque le textile traité est lavé de façon industrielle, le traitement est partiellement éliminé et seul le composé N reste significativement détectable. Seul N reste une identification possible de la présence du traitement antimicrobien.

1.3. Analyse par ToF-SIMS de la composition chimique de surface des textiles traités au PHMB/LS

En complément des analyses XPS, des analyses ToF-SIMS ont été réalisées sur les mêmes échantillons de textiles. Les résultats sont présentés dans le tableau 5-3. Les analyses ToF-SIMS ont permis de montrer que les lavages ECE permettaient d'obtenir une surface propre sans contamination par des résidus de lessive. En effet il n'y a pas de différence significative

entre l'échantillon C/P seul (échantillon A) et celui après 1 lavage avec la lessive ECE (échantillon B). L'intensité représentant la signature caractéristique du polyester est de 53,6 ± 12,9 pour l'échantillon A et de 77,7 ± 18,4 pour l'échantillon B.

Tableau 5-3 : Intensités normalisées ToF-SIMS et rapport d'intensités de pics ToF-SIMS (%) à la surface de textiles C/P avant et après lavage ménager ECE puis après traitement antimicrobien PHMB/LS et après 1 ou 5 lavages industriels IOS 15742 . Les incertitudes ont été calculées à partir de mesures effectués à 3 endroits différents à la surface des échantillons. n.d. : non déterminé

Echantillons	Signature spécifique du Polyester	Signature spécifique du Coton	Signature spécifique du PHMB	Signature spécifique du LS
Echantillon A	53,6 ± 12,9	n.d.	n.d.	n.d.
Echantillon B	77,7 ± 18,4	n.d.	n.d.	n.d.
Echantillon C	73,7 ± 37,1	n.d.	n.d.	n.d.
Echantillon D	50,1 ± 37	n.d.	n.d.	n.d.
Echantillon E	95,8 ± 31,0	0,21 ± 0,04	1,99 ± 0,54	3,42 ± 1,50
Echantillon F	21,5 ± 5,8	0,41 ± 0,10	1,83 ± 0,39	1,98 ± 0,26
Echantillon G	7,6 ± 0,5	0,04 ± 0,02	0,71 ± 0,06	<0,01

Différents rapports ont pu être calculés avec des pics caractéristiques du polyester et du coton. Après lavage, il n'y a pas de différence significative permettant de dire que les lavages ont une influence sur ce rapport. En effet, pour le textile lavé une fois selon le protocole du CTTN (échantillon C) et le textile lavé 5 fois suivant le même protocole (échantillon D), les valeurs d'intensité obtenues sont respectivement de 73,7 ± 37,1 et 50,1 ± 37 (plus l'intensité d'un composé est élevée, plus l'élément est présent en grande quantité à la surface du textile).

Cependant, une différence marquée peut être observée lorsque le textile est traité au PHMB/LS (échantillon E) avec une intensité de 95,8 ± 31,0 pour la signature caractéristique du polyester. Les signatures caractéristiques du PHMB peuvent être facilement détectées et l'intensité est de 1,99 ± 0,54.

Les intensités obtenues montrent clairement la détection du dépôt sur l'échantillon E (textile traité au PHMB/LS avant lavage) ce qui confirme les résultats obtenus précédemment par XPS. Les résultats après lavage sont quelque peu surprenants. En effet, après 1 lavage industriel (échantillon F), l'intensité de la signature spécifique du coton est plus élevée qu'avant lavage (0,21 ± 0,04 avant lavage contre 0,42 ± 0,10 après 1 lavage industriel). Il semblerait dans ce cas que le PHMB soit partiellement éliminé et que la signature significative du coton apparaisse plus importante car la fibre de coton apparaît plus disponible pour l'analyse.

L'intensité spécifique du LS indique une rapide diminution de sa quantité même après 1 seul lavage industriel avec respectivement 3,42 ± 1,50 avant lavage et 1,98 ± 0,26 et <0,01 après 1 et 5 lavages. Il est possible que le LS (anion) soit remplacé par des composants anioniques contenus dans la lessive comme les phosphates. Le LS n'est plus détecté après 5 lavages industriels. En effet, Arunyadej *et al*. [1] ont mis en évidence grâce à une analyse ToF-SIMS qu'après 20 lavages, les tensioactifs anioniques présents dans la lessive utilisée se sont adsorbés directement sur les fibres de coton, avec pour conséquence la perte de la propriété d'hydrophilie du coton. Dans notre cas, il est donc possible que des composés anioniques se soient adsorbés à la surface du textile à la place du LS.

Pour le PHMB, les résultats montrent que sa signature caractéristique est encore détectée à la surface du textile avec 1,99 ± 0,54 avant lavage, 1,83 ± 0,39 et 0,71 ± 0,06 après 1 et 5 lavages industriels respectivement. On peut donc voir que même après 5 lavages industriels le PHMB est encore présent à la surface du textile et par conséquent, le traitement au PHMB résiste à 5 lavages industriels même si le LS est absent.

Par la suite, les analyses de surface (XPS et ToF-SIMS) seront exploitées en comparaison des mesures d'activités antimicrobiennes afin d'évaluer la corrélation entre la composition chimique de surface des textiles et leur activité antimicrobienne.

2. Effet du contact avec le textile traité au PHMB/LS sur les micro-organismes : activité antimicrobienne sur différentes souches et évaluation de l'état physiologique des micro-organismes

Le PHMB est un agent antimicrobien à spectre large ayant diverses applications. Ceci inclut son utilisation pour la désinfection des piscines (Baquacil™, Arch Chemicals) ou dans la préservation des PVC (Vanquish™, Arch Chemicals) mais également de façon plus générale comme désinfectant [2]. Il y a donc un certain intérêt pour son utilisation à la surface d'un textile dans le but de le rendre antimicrobien afin de lutter contre diverses contaminations notamment en industries agro-alimentaires.

Les résultats présentés dans le chapitre 3 ont pu mettre en évidence une très bonne activité bactériostatique en milieu gélosé du PHMB vis-à-vis de *L. innocua* LRGIA 01 et *S. aureus* méthi-R nosoco 3011 et une résistance plus marquée de *P. aeruginosa* ATCC 15742 qui présente une CMI environ 10 fois supérieure. En effet les CMI en milieu gélosé obtenues

étaient de 20 mg/L, 12,5 mg/L et 125 mg/L respectivement pour *L. innocua* LRGIA 01, *S. aureus* nosoco 3011 et *P. aeruginosa* ATCC 15742.

L'activité antimicrobienne des textiles traités au PHMB vis-à-vis de ces 3 souches a été évaluée directement après le traitement de fonctionnalisation et après 1, 5 et 10 lavages industriels.

2.1. Activités antimicrobiennes des textiles traités au PHMB/LS avant et après lavage

Les cinétiques de croissance de *L. innocua* LRGIA 01, *S. aureus* méthi-R nosoco 3011 et *P. aeruginosa* ATCC 15742 sur textiles témoins non traités C/P et sur les textiles traités au PHMB/LS avant et après 5 et 10 lavages industriels sont présentées dans la figure 5-1. Les courbes représentant la croissance de *L. innocua* LRGIA 01 et *S. aureus* méthi-R nosoco 3011 sur le textile traité au PHMB avant et après 1 lavage industriel ne sont pas représentées car le textile est biocide dès la mise en contact (c'est-à-dire qu'aucune cellule n'a pu être dénombrée sur milieu gélosé). Dans le cas de *P. aeruginosa* ATCC 15742, les analyses n'ont pas été faites avant et après 1 lavage industriel. Les activités antimicrobiennes des textiles traités au PHMB/LS suivant le brevet de l'IFTH ont ensuite été calculées avant et après lavages industriels selon la norme ISO 20743/2005 et sont présentées dans le Tableau 5-4. Les cinétiques de croissance de ces 3 souches (figure 5-1) sur textiles non traités apparaissent similaires à celles observées précédemment (croissance de 2 à 3 log (UFC/g) en 24 h).

Dans un premier temps, il a été vérifié que le textile non traité, avant et après lavages industriels, n'avait pas d'activité antimicrobienne vis-à-vis des 3 souches testées. Dans la figure 5-1, des croissances allant de 2 à 4 log UFC/g ont pu être mises en évidence pour ces 3 souches. La norme ISO 20743-2005 préconise une croissance de 1 log (UFC/g) sur un textile témoin non traité de la souche testée pour que le calcul soit correct, il est donc possible dans ce cas de déterminer l'activité antimicrobienne. En accord avec cette norme, pour qu'un textile soit actif il faut une activité supérieure à 2.

Pour ce qui est des textiles traités au PHMB, la croissance est différente d'une souche à l'autre. En effet, *P. aeruginosa* ATCC 15742 qui apparaissait la souche la plus résistante au PHMB lors de la détermination de la CMI (125 mg/L) est capable de se multiplier sur le textile traité au PHMB/LS après 5 et 10 lavages industriels : on peut observer une croissance

identique à la croissance sur témoin (3 logs (UFC/g) en 24 h) après 5 lavages industriels et une croissance d'environ 1 log (UFC/g) sur le textile lavé 10 fois. Ces résultats sont surprenants car il apparaît que sur le textile lavé 10 fois, *P. aeruginosa* a plus de difficultés à se multiplier. Or les résultats d'analyses de surface (XPS et ToF-SIMS) ont montré une diminution de la signature caractéristique du PHMB entre 1 et 5 lavages. L'échantillon 10 lavages n'ayant pas été analysé par XPS et ToF-SIMS, il est difficile de conclure. On peut cependant supposer que le traitement au PHMB diminue de façon moins nette après 10 lavages car la majorité de l'élimination du traitement a lieu dès les 5 premiers lavages. On peut également supposer que l'élimination du traitement au cours du lavage ne se fait pas forcément de façon homogène et qu'à certains endroits du textile des résidus de PHMB peuvent en quantité suffisante pour inhiber les cellules en contact qui peuvent persister.

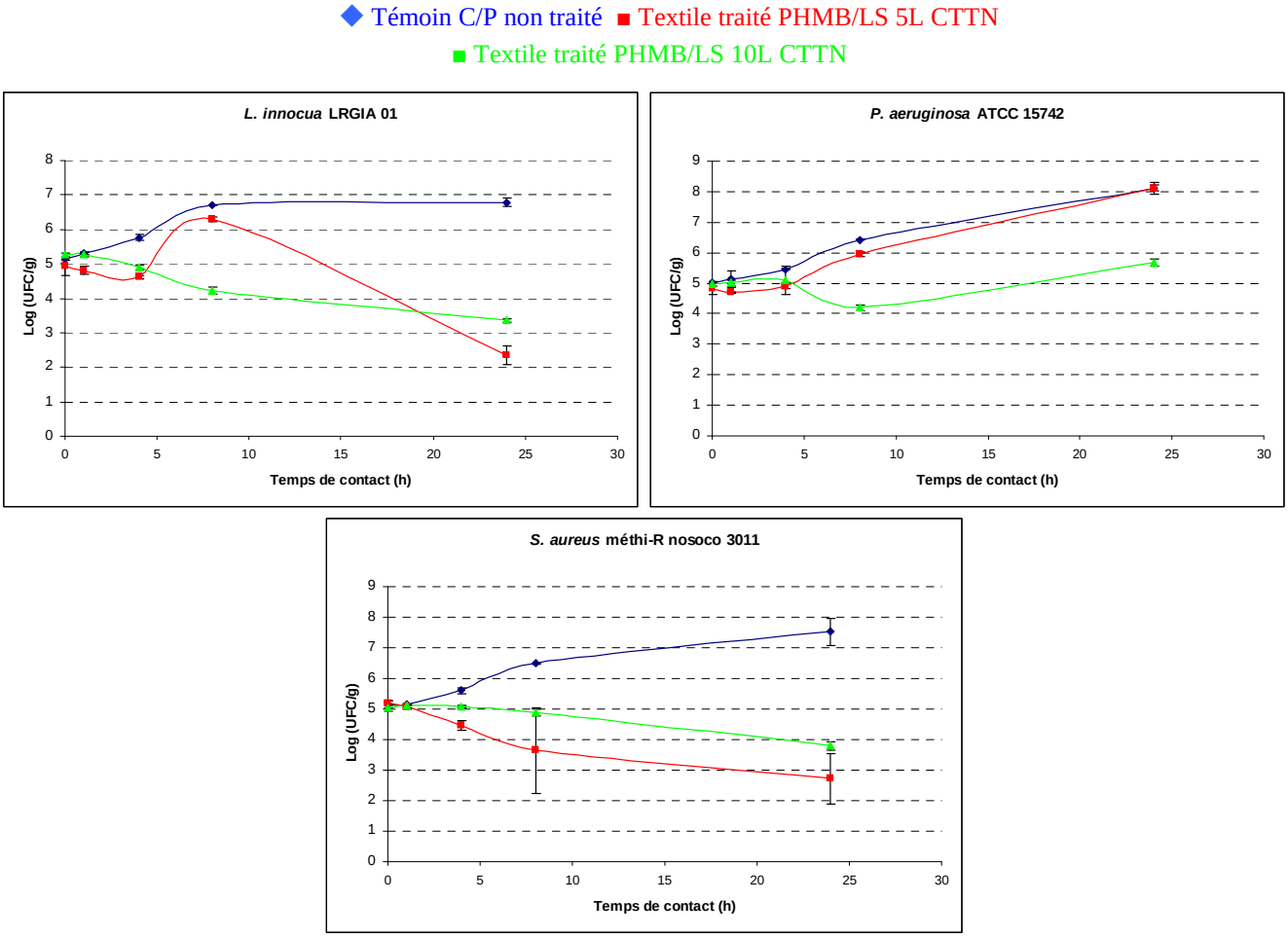


Figure 5-1 : Suivi de la population de *L. innocua* LRGIA 01, *S. aureus* méthi-R nosoco 3011 et *P. aeruginosa* ATCC 15742 sur textiles blancs non traités et traités au PHMB/LS avant et après 5 et 10 lavages industriels. n = 2

Tableau 5-4 : Activités antimicrobiennes (norme ISO 20743-2005) à 24h de textiles traités au PHMB/LS vis-à-vis de *L. innocua* LRGIA 01, *P. aeruginosa* ATCC 15742 et *S. aureus* NOSOCO 3011 méthi-R avant et après 1, 5 et 10 lavages industriels réalisés au CTTN. n.d. : non déterminé. n = 2

Echantillons	**lavages**	**A 24h *L. innocua***	**A 24h *P. aeruginosa***	**A 24h *S. aureus***
PHMB/LS	pas de lavage	biocide	n.d.	nd
PHMB/LS	1 L CTTN	biocide	non actif	biocide
PHMB/LS	5 L CTTN	3,9 +/- 0,6	non actif	5,4 +/- 1,1
PHMB/LS	10 L CTTN	3,8 +/- 0,1	non actif	3,0 +/- 0,1

Le textile traité au PHMB/LS présente une action bactéricide avant et après 1 lavage industriel pour *L. innocua* LRGIA01 et après 1 lavage industriel pour *S. aureus* NOSOCO 3011 méthi-R. En effet, l'activité observée est très rapide et en moins d'une heure de contact plus aucune bactérie n'a pu être observée sur milieu TSA. Ce textile peut donc être considéré comme « biocide » pour ces 2 souches et l'activité antimicrobienne correspondante ne peut pas être calculée dans ce cas. Kitahara *et al*. [3] ont également mis en évidence ce même type de comportement sur des textiles fonctionnalisés avec du carbone amorphe (diamond-like carbon). En effet, après mise en contact des cellules de *Staphylococcus aureus* et *Klebsiella pneumoniae*, plus aucune cellule n'a pu être dénombrée sur milieu gélosé.

Pour *S. aureus* méthi-R nosoco 3011, il n'y a pas de différence significative de la croissance sur textiles traités au PHMB/LS lavé 5 ou 10 fois de façon industrielle. Dans les 2 cas, une inhibition est observée avec une diminution du nombre de cellules dénombrées de 1 à 2 logs (UFC/g) en 24 h par rapport au nombre de cellules déposé au départ sur le textile correspondant à des activités antimicrobiennes de 5,4 ± 1,1 et 3,0 ± 0,1 respectivement après 5 et 10 lavages industriels. Cette diminution de la population microbienne sur le textile est donc lente et progressive.

Pour *L. innocua* LRGIA 01 et de la même façon que pour *S. aureus* méthi-R nosoco 3011, une diminution d'environ 2 log (UFC/g) en 24 h du nombre de cellules est observée pour les 2 textiles traités au PHMB/LS lavés 5 et 10 fois de façon industrielle. Il faut cependant noter un nombre plus important de cellules dénombrées après 8 h de contact sur le textile lavé 5 fois : 6 log (UFC/g) contre 4 log (UFC/g) pour le textile lavé 10 fois. Il faut rappeler que pour chaque essai un échantillon de textile différent est utilisé. Dans ce cas on peut supposer que sur une partie du textile le traitement antimicrobien a diminué au lavage de façon plus importante avec par exemple un frottement plus important au moment du cycle de lavage. Les acticités antimicrobiennes correspondantes sont de 3,9 +/- 0,6 et 3,8 +/- 0,1 respectivement après 5 et 10 lavages industriels.

Pour les deux souches testées (*S. aureus* méthi-R nosoco 3011 et *L. innocua* LRGIA 01), les textiles biocides avant lavage ou après un seul lavage industriel sont devenus simplement bactériostatique. Cette diminution de l'activité antimicrobienne engendrée par les lavages peut être corrélée avec la diminution de la concentration atomique à l'extrême surface de l'azote qui est un élément caractéristique de la présence de PHMB mise en évidence par ToF-SIMS et XPS. Ainsi, si les textiles traités conservent une activité vis-à-vis de ces 2 souches même après 10 lavages, en revanche, une diminution progressive de leur activité antimicrobienne imputable à une baisse progressive de la concentration en PHMB à leur surface a pu être observée au cours de ces dix premiers lavages.

De façon générale, pour les 2 textiles traités PHMB/LS et lavés 1, 5 et 10 fois de façon industrielle, il n'y a pas d'inhibition de *P. aeruginosa* ATCC 15742 car une multiplication de cette dernière sur textile est observée. Il s'avère que *P. aeruginosa* ATCC 15742 qui est beaucoup plus résistante que les 2 autres souches à l'action du PHMB en milieu gélosé (CMI 10 fois supérieure à celle des 2 autres souches) ne voit pas sa croissance inhibée sur les textiles sur lesquels est déposé le PHMB après 5 lavages industriels de celui-ci. La quantité de PHMB subsistant après lavages reste donc suffisante pour inhiber la croissance de *L. innocua* LRGIA 01 et *S. aureus* méthi-R nosoco 3011, souches qui s'avéraient être plus sensibles au PHMB lors de la détermination de la CMI en milieu gélosé que *P. aeruginosa* ATCC 15742.

La comparaison des résultats de CMI en milieu gélosé avec les résultats d'activités antimicrobiennes montrent bien que même fixé au textile, le PHMB est beaucoup moins actif sur *P. aeruginosa* ATCC 15742 que sur *L. innocua* LRGIA 01 et *S. aureus* méthi-R nosoco 3011. Ces résultats sont en accord avec les résultats de CMI en milieu gélosé obtenus qui indiquaient que *P. aeruginosa* ATCC 15742 était la souche la plus résistante (125 mg/L) que *S. aureus* méthi-R nosoco 3011 qui était la plus sensible (12,5 mg/L) et que *L. innocua* LRGIA 01 qui était intermédiaire (20 mg/L). Il faut cependant nuancer cette comparaison sur différents points. En effet, il faut noter que le comportement des souches testées sur textiles est probablement différent de leur comportement lors de la détermination de la CMI en milieu gélosé. Lors de la détermination de la CMI, les souches sont mises en contact avec le PHMB par l'intermédiaire d'un milieu gélosé contenant l'agent antimicrobien et lors du contact avec le textile traité les souches sont en contact avec le PHMB par l'intermédiaire du textile. De plus, les concentrations en PHMB sur le textile n'ont pas pu être déterminées mais sont largement supérieures aux concentrations testées lors de la détermination de la CMI puisque

la solution de PHMB déposée à la surface du textile est à environ 2 g/L (1 % (v/v d'une solution à 200 g/L) et que la CMI la plus forte est de 125 mg/L. Et enfin, lors du traitement du textile, l'ajout de LS pour « fixer » le PHMB au textile entraîne probablement aussi des effets sur les cellules et l'action de ce dernier n'a pas été déterminée seule.

Gilbert *et al*. [4] ont montré que le PHMB avait une action en deux temps, avec dans un premier temps, une fixation à la membrane cytoplasmique puis une action au niveau de la membrane externe. Ces auteurs ont montré que l'action du PHMB est 5 fois plus importante sur des sphéroplastes que sur la cellule entière ce qui inclut une action sur la membrane externe absente chez ces derniers. Le contact avec un agent antimicrobien peut s'accompagner d'une évolution de l'enveloppe bactérienne plus particulièrement de la composition lipidique membranaire des bactéries à Gram négatif [5]. Ces variations de composition de la paroi cellulaire peuvent ainsi entraîner une évolution des propriétés de surface des micro-organismes (hydrophobie ou charge de surface) [6] entraînant une modification des interactions entre cellules bactériennes et agents antimicrobiens. On peut donc également prendre en compte les résultats de l'hydrophobie de surface pour appuyer la plus forte résistance de *P. aeruginosa* au PHMB cette souche étant plutôt hydrophile. Le PHMB est une molécule cationique qui va interagir avec les groupements anioniques de la membrane externe des bactéries à Gram négatif, principalement avec les phospholipides acides [2]. Par conséquent, une modification de la composition lipidique de la membrane externe peut entraîner une évolution de l'adsorption des molécules de PHMB à la surface de bactéries. Il apparaît ici que les cellules plutôt hydrophiles comme *P. aeruginosa* sont plus résistantes, résistance qui pourrait être due à de possibles interactions répulsives à proximité des sites d'adsorption du PHMB.

Après avoir étudié la croissance de ces 3 souches sur textiles traités au PHMB/LS, l'état physiologique de ces dernières a été étudié après contact avec ce même textile.

2.2. Etude de l'état physiologique par microscopie à épifluorescence de *L. innocua* LRGIA 01, *S. aureus* méthi-R nosoco 3011 et *P. aeruginosa* ATCC 15742 après contact avec un textile traité au PHMB/LS

Le textile traité au PHMB/LS s'est avéré être efficace sur 2 souches testées sur 3. L'étude de la croissance sur textile après décrochage et dénombrement sur milieu gélosé ne permet pas d'évaluer si certaines cellules qui ont perdu leur capacité à se multiplier sur milieu gélosé sont

encore actives métaboliquement. L'état physiologique de ces cellules a donc été étudié pour savoir si le traitement au PHMB pouvait entraîner la formation de cellules viables mais non cultivables (ou VNC). Le cycle de vie d'une bactérie est composé de 2 parties : une étape de croissance et une étape de survie. La capacité des bactéries à survire dans l'environnement est essentielle à leur persistance. Lorsque les conditions sont défavorables à la croissance, les cellules non sporulantes sont capables d'entrer dans un état végétatif en modifiant leur métabolisme. Cet état défini comme un état « viable non cultivable » (VNC) [7] apparaît être très complexe et a souvent été un sujet de controverse. Cette définition peut s'appliquer à deux états physiologiques :

- des cellules revivifiables, c'est à-dire pouvant retrouver leur capacité à se multiplier sur gélose de laboratoire dans des conditions favorables, Dans ce cas il s'agit d'une stratégie de survie de la souche bactérienne soumise à un stress [8] ;
- des cellules en phase de transition vers la mort cellulaire, dans laquelle ces bactéries possèdent encore quelques activités métaboliques et de respiration mais sont en cours de dégradation [7].

Relativement peu d'études ont été faites faisant état de la présence de cellules VNC dans les aliments [9] et, bien que la possible transmission de VNC pathogènes ait été suggérée [10], cela reste un secteur peu exploré dans le domaine de la sécurité alimentaire.

La microscopie à épifluorescence en utilisant le kit Live/Dead® Baclight™ a permis de réaliser un dénombrement au microscope optique dans l'objectif de mettre en évidence d'éventuelles cellules VNC. Pour les 3 souches précédemment testées, une comparaison d'un dénombrement en milieu gélosé et d'un dénombrement des cellules vertes et rouges au microscope à épifluorescence a été effectué en comparant un textile non traité à un textile traité au PHMB/LS. Les 2 textiles ont été lavés une fois de façon industrielle (1 lavage industriel). Ce choix est justifié par le fait que la majorité du PHMB peu fixé au textile est éliminée au premier lavage industriel (Cf. résultats obtenus par XPS et/ou ToF-SIMS) et que l'activité de ce textile reste encore très importante. Les résultats de ces dénombrements sont présentés dans la figure 5-2.

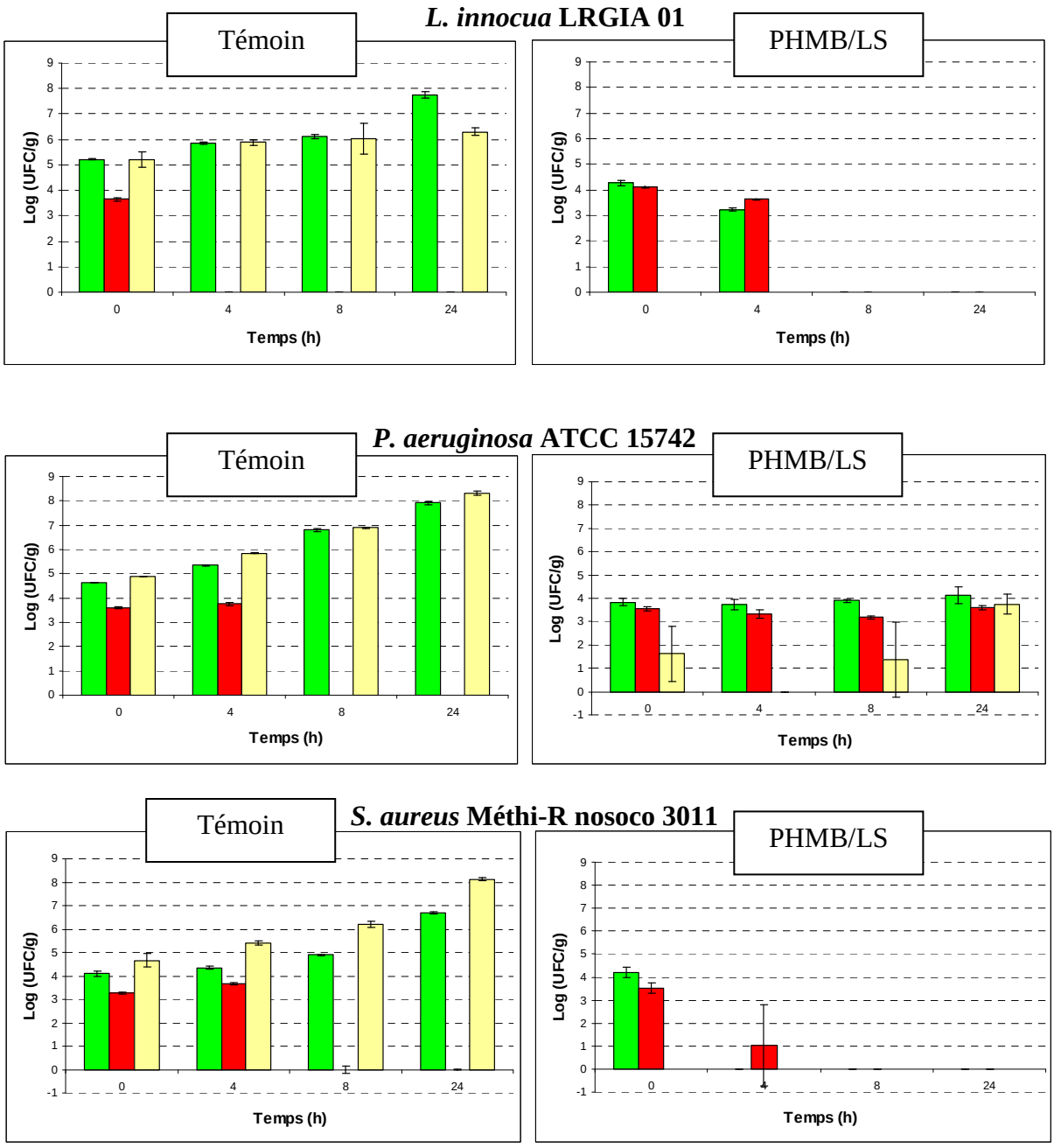


Figure 5-2 : Evolution de la croissance de *L. innocua* LRGIA 01, *S. aureus* méthi-R nosoco 3011 et *P. aeruginosa* ATCC 15742 sur un textile témoin et sur un textile traité au PHMB/LS 1L CTTN en log (Nb bactéries vertes/g) bactéries viables (vert) et non viables (rouges) dénombrées au microscope à épifluorescence et en log (UFC/g) dénombrées sur milieu gélosé, n = 2

Pour les 3 souches testées, les bactéries sont capables d'adhérer et de se multiplier sur textiles témoins. En effet, que ce soit dans le cas du dénombrement sur milieu gélosé ou par dénombrement au microscope des cellules viables, le nombre de cellules augmente au cours du temps de 5 à 8 logs (UFC/g) pour *L. innocua* LRGIA 01 et *P. aeruginosa* ATCC 15742 et de 4 à 7 logs (UFC/g) pour *S. aureus* méthi-R nosoco 3011. On constate également que pour

ces 3 souches le nombre de cellules viables dénombrées au microscope est sensiblement le même que le nombre de cellules dénombrées sur milieu gélosé. Les bactéries rouges, qui représentent les bactéries non viables suite à l'altération de leurs membranes [11] sont présentes seulement au moment du dépôt des bactéries sur le textile et après 4 h de contact pour *S. aureus* méthi-R nosoco 3011 et *P. aeruginosa* ATCC 15742.

Les graphes représentant les dénombrements sur textiles traités au PHMB/LS montrent clairement la différence de comportement des bactéries sur un textile traité par rapport au textile témoin.

En effet, dans le cas de *S. aureus* méthi-R nosoco 3011 et *L. innocua* LRGIA 01, aucune colonie n'a été dénombrée sur les milieux gélosés pendant les temps de contact après 4 h, témoignant d'une action efficace et immédiate de l'agent antimicrobien sur les cellules. On peut donc dire que le PHMB a causé une perte de la capacité de développement des cellules sur milieu gélosé. Cependant après dépôt des cellules sur le textile et 4 h de contact pour *L. innocua* LRGIA 01 et au moment du dépôt pour *S. aureus*, 3 à 4 log (UFC/g) de bactéries viables ont été observées par dénombrement au microscope à épifluorescence. Ces cellules ont donc réussi à garder leur structure et leur intégrité membranaire mais, se trouvant dans des conditions de stress causées par la présence d'un agent antimicrobien, elles ont perdu leur capacité à se multiplier et former des colonies sur milieu gélosé. On peut supposer, que lorsqu'aucune bactérie n'est dénombrée sur milieu gélosé et que des cellules viables apparaissent au microscope, ces cellules sont des bactéries VNC [12].

Après 8 h de contact avec les textiles traités avec du PHMB, aucune bactérie ni colonie de *L. innocua* LRGIA 01 ou de *S. aureus* méthi-R nosoco 3011 n'ont été détectées par les deux techniques. Il reste donc moins de cellules viables à la surface du textile. Ceci montre bien que ces textiles possèdent une bonne activité antimicrobienne vis-à-vis de ces 2 souches.

Les résultats obtenus lors de la détermination des CMI ont montré que ces deux souches sont sensibles au PHMB (CMI de 12,5 et 20 mg/L respectivement pour *S. aureus* méthi-R nosoco 3011 et *L. innocua* LRGIA 01).

Dans le cas de *P. aeruginosa* ATCC 15742, à partir des dénombrements réalisés sur milieu gélosé et par épifluorescence, une importante croissance de cette souche sur le textile témoin a pu être mise en évidence, avec un dénombrement de 8 log (UFC/g) après 24 h de contact soit une croissance de 3,5 log (UFC/g). D'autre part, sur le textile traité le nombre de cellules dénombrées par épifluorescence entre les temps 0 et 8 h est d'environ 4 log (UFC/g) pour les 4 temps testés (0, 4, 8 et 24 h). Le nombre de cellules dénombrées sur textile traité au PHMB est donc moins important que sur un textile non traité et de plus, les cellules ne semblent pas

être capables de s'y multiplier car le nombre de cellules reste constant au cours du temps. Toutefois les dénombrements sur milieu gélosé montrent une variabilité de la croissance de *P. aeruginosa* ATCC 15742 et les écarts types apparaissent parfois importants. En effet, 1,5 log (UFC/g) sont dénombrés au moment du dépôt et après 8 h de contact, quasiment 4 log (UFC/g) après 24 h de contact et aucune cellule n'a pu être dénombré après 4 h de contact. L'hypothèse pour expliquer cette variabilité du nombre d'UFC de *P. aeruginosa* ATCC 15742 sur textile traité au PHMB et dénombré sur milieu gélosé peut être une répartition non homogène du traitement à la surface du textile. En effet, il est possible que certaines zones du textile soient plus concentrées en PHMB détruisant ainsi la totalité des cellules à la surface alors que sur d'autres parties moins concentrées quelques bactéries ont pu résister à l'action de ce dernier. Rappelons que des échantillons différents de textile ont dû être employés pour dénombrer les cellules après 0, 4, 8 et 24 h de contact. Pour tous les temps, excepté le temps 24 h de contact, le nombre de cellules dénombrées sur milieu gélosé est inférieur au nombre de cellules viables dénombrées par microscopie à épifluorescence avec respectivement 0 à 1,5 log (UFC/g) contre 4 log (UFC/g). Lors de la détermination de la CMI cette souche s'avérait être la plus résistante avec une CMI de 125 mg/L. Le comportement des bactéries sur textile peut être différent par rapport au comportement sur milieu gélosé. En effet, le milieu gélosé contient une certaine quantité d'eau ainsi que tous les nutriments nécessaires à une bonne croissance des bactéries. Le textile est moins riche en nutriments par rapport à un milieu de culture et les conditions y sont donc moins favorables à la croissance des bactéries. Pitt *et al.* [13] ont également mis en évidence des comportements différents de cellules en biofilm vis-à-vis d'un antibiotique par rapport à des cellules en mode planctonique. En effet, ces auteurs ont montré que la stimulation aux ultrasons pouvait restaurer la sensibilité de certains micro-organismes à une molécule antimicrobienne. Les hypothèses pouvant expliquer ce comportement peuvent être que les bactéries à la base du biofilm sont métaboliquement moins actives que celles qui se trouvent à la surface de celui-ci. Les cellules à la surface ont un accès privilégié à l'oxygène et aux nutriments, de plus leurs déchets métaboliques sont éliminés plus facilement. Les cellules qui se trouvent à la base du biofilm sont donc métaboliquement moins actives et ne peuvent pas transporter activement l'agent antimicrobien, de ce fait elles apparaissent plus résistantes.

Bien que le comportement de *P. aeruginosa* ATCC 15742 sur un textile traité au PHMB présente une certaine ambigüité vu les différents résultats obtenus, cette souche est celle qui a

montré le plus de résistance puisqu'elle est la seule à être capable de se multiplier et de former des colonies sur le milieu gélosé après 24 h de contact avec le textile.

Les résultats obtenus précédemment montrent qu'une quantité non négligeable (entre 3 et 4 logs) de cellules viables *L. innocua* LRGIA 01 et de *S. aureus* méthi-R nosoco 3011 et que quelques cellules de *P. aeruginosa* ATCC 15742 persistent après contact avec un textile traité au PHMB en milieu liquide. Ces cellules posséderaient donc une membrane intègre alors qu'elles sont non cultivables sur milieu gélosé. Ces cellules ont été par la suite remises en culture dans un bouillon BCC neuf et repiquées tous les jours pendant 15 jours mais aucune cellule n'a récupéré ses capacités à se multiplier sur ce milieu de culture. Ceci signifie probablement que soit les conditions testées ne sont peut être pas celles qui permettent aux cellules de retrouver toutes leurs capacités ou alors que les cellules se trouvent dans un état de transition vers la mort cellulaire.

Les cellules mises en évidence grâce à la microscopie à épifluorescence peuvent être considérées comme des cellules viables mais non cultivables (VNC). En effet, l'exposition à un stress tel que le traitement au PHMB peut entraîner la formation de ce type de cellules qui sont considérées comme représentant un risque potentiel de contamination des produits alimentaires lors de leur fabrication [14]. Les méthodes de dénombrements classiques n'avaient en effet pas permis de détecter la présence de ces cellules car elles sont basées sur la multiplication des cellules sur un milieu de culture. Il y a donc un certain intérêt à utiliser la microscopie à épifluorescence pour détecter ces cellules dont la présence peut représenter un risque potentiel. Le kit Live/dead® Baclight™ a été couramment utilisé au cours de ces dernières années dans ce but.

Baleux *et al.* [15] ont mis en évidence un lien entre la non cultivabilité de *Salmonella typhimurium* et l'exposition à des stress tels que la salinité et le rayonnement UV. Dans cette étude, ces auteurs ont comparé la capacité de cette souche à se multiplier avec des activités métaboliques telles que l'activité de la chaîne respiratoire mise en évidence par le fluorochrome CTC ou l'état de la membrane mis en évidence par le kit Live/dead® Baclight™. La disparition du caractère cultivable de toutes les cellules exposées à ces 2 stress se réalise en 1 h et les activités métaboliques que présentent ces cellules non cultivables sont proches de ceux présentés par les cellules d'une culture non exposée. Cependant, après 3 h d'exposition, 10 % seulement des cellules présentaient une activité de leur chaîne respiratoire (CTC) et la moitié des cellules présentaient une atteinte de la membrane cytoplasmique

(Live/Dead® Baclight™). Ceci montre bien que malgré la non cultivabilité des cellules, une certaine activité métabolique est maintenue par certaines cellules.

Enfin, Ercolini *et al.* [16] ont utilisé ce même kit pour évaluer l'efficacité d'un film fonctionnalisé avec une bactériocine active vis-à-vis de bactéries. L'utilisation de ce kit a permis de décrire en partie le mode d'action de la bactériocine testée avec une implication de la membrane plasmique de *L. monocytogenes*. Il en est de même lors du traitement avec le PHMB, il est probable que cette molécule ait aussi comme cible la membrane plasmique des cellules.

Les résultats obtenus dans cette partie mettent en évidence la nécessité d'utiliser une autre méthode que le dénombrement classique pour tester l'efficacité antimicrobienne d'un textile. En effet, cette méthode sous estime le nombre de cellules pouvant se trouver à la surface du textile mais pouvant entrainer des contaminations lors de la manipulation des aliments en ne prenant en compte que les cellules cultivables et ne considérant pas les cellules viables non cultivables. Même si dans le cas présent, les essais de revivification des cellules viables non cultivables n'ont pas révélé l'existence de cellules aptes à retrouver leurs capacités à se multiplier elles présentent tout de même un risque potentiel pour la sécurité microbiologique des productions alimentaires.

2.3. Observation des textiles traités au PHMB/LS par MEB après contact avec *Listeria innocua* LRGIA01

Après avoir calculé les activités antimicrobiennes du textile traité au PHMB/LS à partir du brevet de l'IFTH, et après avoir évalué l'état physiologique de différentes souches, des observations au microscope électronique à balayage (MEB) ont été réalisées en collaboration avec le LSA. Les textiles ont été préparés au LRGIA et observés au microscope de l'Ecole Centrale de Lyon (Ecully).

La figure 5-3 représente des clichés de textiles observés au MEB sans traitement (Figure 5-3 A et 3 B) et après traitement au PHMB/LS (Figure 5-3 C et 3 D) avant lavage après avoir été en contact avec *L. innocua* LRGIA 01 pendant 24 h. Deux grossissements ont été employés afin d'observer le mode de groupement des bactéries d'une part et des bactéries individualisées d'autre part. Le but de ces observations était, dans un premier temps de visualiser la présence éventuelle de bactéries sur le textile traité et dans un deuxième temps de

pouvoir observer comme dans le chapitre 1 de la section « résultats » concernant le traitement plasma, l'endroit où se logent les bactéries au niveau des fibres.

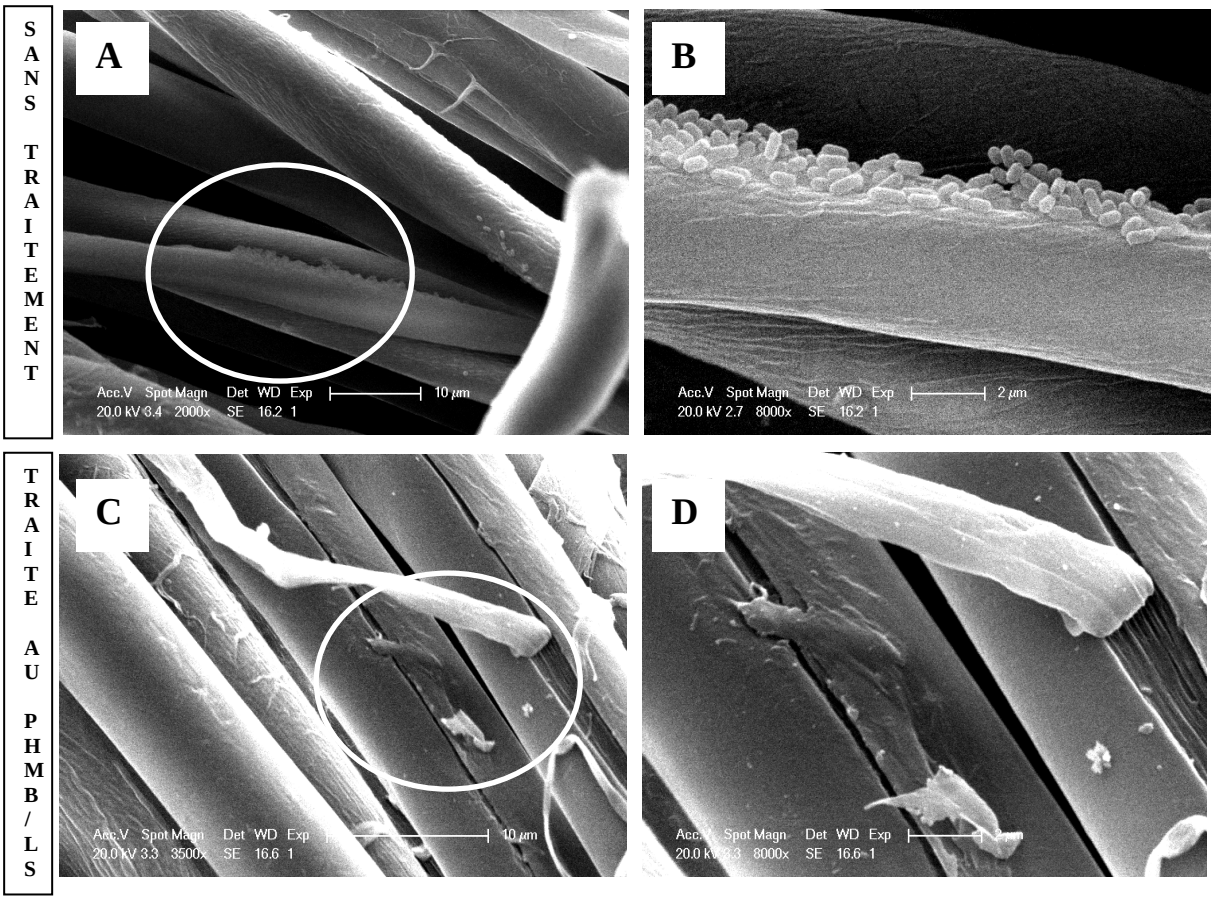


Figure 5-3 : Clichés de MEB de la surface des échantillons de textiles C/P, Textile non traité en contact avec *L. innocua* LRGIA 01 pendant 24 heures (grossissement X 2000 (A) et grossissement X 8000 (B)), textile traité au PHMB/LS lavé 10 fois selon le protocole du CTTN en contact avec *L, innocua* LRGIA 01 pendant 24 heures (grossissement X 2000 (C) et grossissement X 8000 (D)). Les cercles blancs correspondent à la zone sur laquelle on a appliqué un grossissement plus fort.

Sur le textile non traité, de nombreuses bactéries ont été observées le long des fibres et dans certains cas entre les fibres. Les clichés de la figure 5-3 sont représentatifs de ce qui a été observé sur la totalité de l'échantillon (1 cm^2 de textile). Les cellules de *L. innocua* LRGIA 01 se déposent le long des fibres et commencent à former une communauté de cellules qui peut être comparée à un « biofilm » comme le montre la figure 5-3 B où les cellules sont proches les unes des autres et en amas. Tsuchiya *et al.* [17] ont également mis en évidence la colonisation d'un textile composé à 100 % de coton par différentes espèces bactériennes (*Micrococcus luteus*, *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus*…) montrant la formation au bout de 7 jours d'une structure proche d'un biofilm avec production de polymères en forme

de fibrilles. Dans notre cas, il s'agit d'une souche différente et le temps de contact est bien moins long (24 h) mais il semblerait que les cellules commencent à constituer des microcolonies. Dans notre cas, la production de substances polymériques spécifiques d'un biofilm n'a pas pu être mise en évidence.

Aucune bactérie n'a pu être observée sur les 1 cm^2 de l'échantillon de textile traité au PHMB/LS. D'après les clichés, la surface des fibres paraît plus irrégulière que celle du textile non traité ceci étant probablement dû au dépôt de particules de PHMB et de LS à la surface des fibres. On a pu voir précédemment que le textile traité avant lavage était biocide vis-à-vis de *L. innocua* LRGIA 01 et qu'après 1 lavage industriel des cellules viables persistaient sur le même textile. On doit cependant préciser que la préparation des textiles a pu détacher les cellules encore viables, s'il y en avait, du textile et qui ne sont pas observées en MEB.

3. Etude de la fluidité membranaire de *Listeria innocua* LRGIA 01 après contact avec le PHMB en milieu liquide

Dans le chapitre 3 et les première parties du chapitre 4, l'étude de textiles antimicrobiens a été présentée. Il paraissait important de mieux comprendre le mode d'action vis-à-vis des souches étudiées des 2 agents antimicrobiens employés pour fonctionnaliser les textiles, l'argent et le PHMB.

Une étude de la fluidité membranaire des cellules de *L. innocua* LRGIA 01 a ainsi été réalisée pour comprendre le mode d'action sur les membranes des bactéries sensibles au PHMB afin de proposer un « modèle » du mode d'action de ce dernier. En effet ce mode d'action est peu connu et il a essentiellement été établi sur des modèles de membrane et très peu sur cellules entières. Le choix de *L. innocua* LRGIA 01 a été fait en se basant sur les études de microscopie à épifluorescence faites précédemment afin de pouvoir comparer les résultats obtenus par différentes méthodes. *L. innocua* LRGIA 01 a été retenue pour cette étude car son état physiologique après exposition au PHMB a également été étudié par microscopie à épifluorescence.

3.1. Etude de la fluidité de la membrane de *L. innocua* LRGIA 01 après contact avec le PHMB en milieu liquide

La spectroscopie de fluorescence est une technique pertinente pour évaluer la fluidité des membranes biologiques. Les mesures peuvent être réalisées *in situ* sur membrane entière ou *ex situ* après extraction et reconstitution. Dans le cadre de notre étude, nous avons réalisé une

étude sur membrane entière afin de rendre compte du mode d'action sur les cellules bactériennes.
Différentes sondes sont disponibles pour l'étude de structures cellulaires spécifiques, ainsi, les sondes fluorescentes utilisées pour l'étude des membranes sont des sondes qui se localisent spécifiquement dans les doubles couches lipidiques membranaires et qui sont sensibles aux altérations de la fluidité membranaire dues aux modifications structurales des lipides. Il existe de nombreuses sondes membranaires dont le DPH (1,6-DiPhényl-1,3,5-Hexatriène) et son homologue le TMA-DPH (TriMéthylAmmonium-DiPhénylHexatriène) qui ont été utilisés dans le cadre de ce travail.

Le DPH est une des sondes membranaires les plus utilisées pour étudier les membranes biologiques. Il s'agit d'une sonde hydrophobe sensible aux propriétés de son environnement en particulier dans les bicouches lipidiques, sa fluorescence dépend de la phase dans laquelle se trouvent les lipides dans le proche environnement de la sonde. Le TMA-DPH quant à lui se localise au niveau de la face externe de la membrane et donne donc une information sur la fluidité de l'extérieur de la membrane.

Le but de ces mesures est d'évaluer les changements de fluidité de la membrane de *L. innocua* LRGIA 01 après contact avec le PHMB dans le but de préciser le mécanisme d'action de ce dernier. Dans ce but, des mesures d'anisotropie de fluorescence (r) ont été réalisées par spectrofluorimétrie. L'anisotropie de fluorescence d'un marqueur dépend directement de sa capacité à se déplacer dans la membrane et par conséquent, de la fluidité de la membrane dans laquelle il est inséré. La fluidité membranaire évolue dans le sens contraire de l'anisotropie : lorsque la fluidité de la membrane diminue, l'anisotropie augmente, et inversement.

Lorsque la membrane forme une phase liquide-cristalline, correspondant à une membrane très fluide, les interactions entre les chaînes acylées sont réduites, permettant une plus grande rotation du marqueur membranaire, la lumière est alors émise dans toutes les directions. En revanche, quand la membrane forme un gel (membrane peu fluide), de par la modification de sa composition ou l'adsorption de certaines molécules comme par exemple un agent antimicrobien, la rotation du marqueur est limitée, et l'anisotropie augmente comme montré dans la figure 5-4 [18].

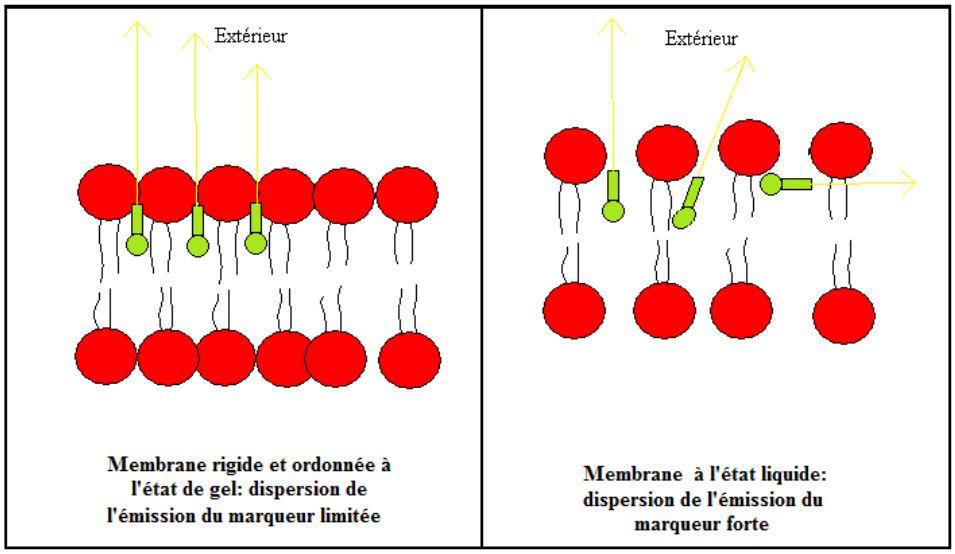


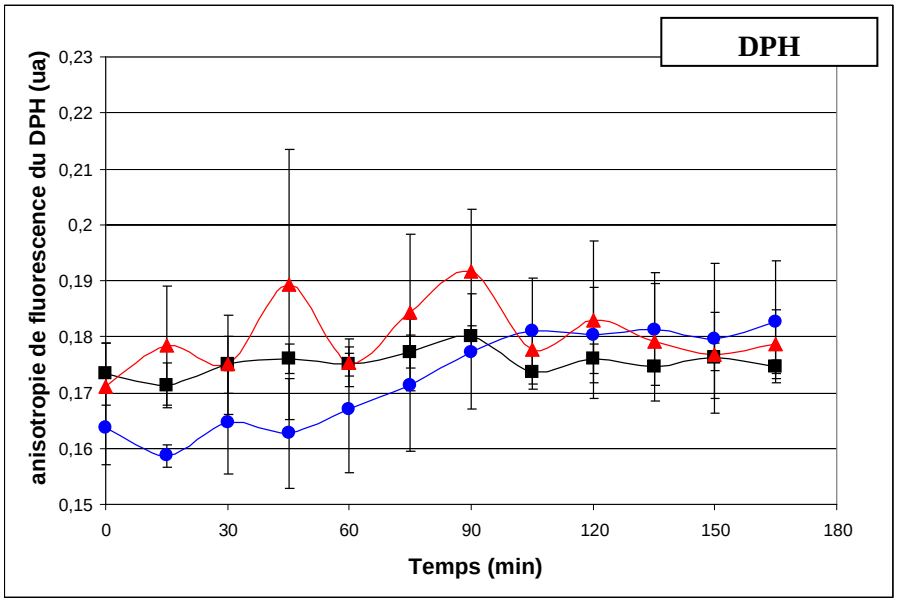
Figure 5-4 : Illustration de la rotation des marqueurs en fonction de la fluidité membranaire. Les sigles verts représentent le marqueur fluorescent et les cercles rouges représentent les têtes lipidiques.

3.2. Utilisation du DPH et du TMA-DPH pour évaluer la fluidité de la membrane de *L. innocua* LRGIA 01 après contact avec le PHMB en milieu liquide

Des mesures d'anisotropie de fluorescence du DPH et du TMA-DPH ont donc été réalisées dans le but de déterminer si le contact avec le PHMB en milieu liquide entraînait des changements de fluidité au niveau de la membrane de *L. innocua* LRGIA 01. Les résultats des anisotropies de fluorescence du DPH et du TMA-DPH après traitement ou non des cellules au PHMB (CMI et ½ CMI) sont présentés dans la figure 5-5.

L'ajout du PHMB a été réalisé à partir de 15 minutes. Cet ajout perturbe la mesure de l'anisotropie de fluorescence des 2 marqueurs utilisés. En effet, pour les 2 marqueurs, de fortes modifications d'anisotropie de fluorescence ont été observées au moment de la mise en contact du PHMB avec les cellules de *L. innocua* LRGIA 01. On observe notamment une augmentation brutale de l'anisotropie de fluorescence du TMA-DPH avec une valeur d'environ 0,303 ± 0,006 pour les cellules traitées à la CMI et 0,282 ± 0,006 pour les cellules traitées à la ½ CMI contre 0,244 ± 0,09 pour les cellules non traitées. On peut supposer dans ce cas que l'ajout d'une molécule aux cellules en suspension perturbe la lumière émise par le marqueur d'où un changement brutal d'anisotropie, ces molécules se fixant rapidement à la surface des membranes cellulaires dont elles perturbent rapidement la structure. Il faut également noter que ce changement est plus important dans le cas du TMA-DPH. En effet, ce

marqueur est situé au niveau de la face externe de la membrane, il est probablement plus facilement sujet à des variations que le DPH qui lui est situé à l'intérieur.



■ Cellules non traitées ▲ Cellules traitées au PHMB à la ½ CMI
● Cellules traitées au PHMB à la CMI

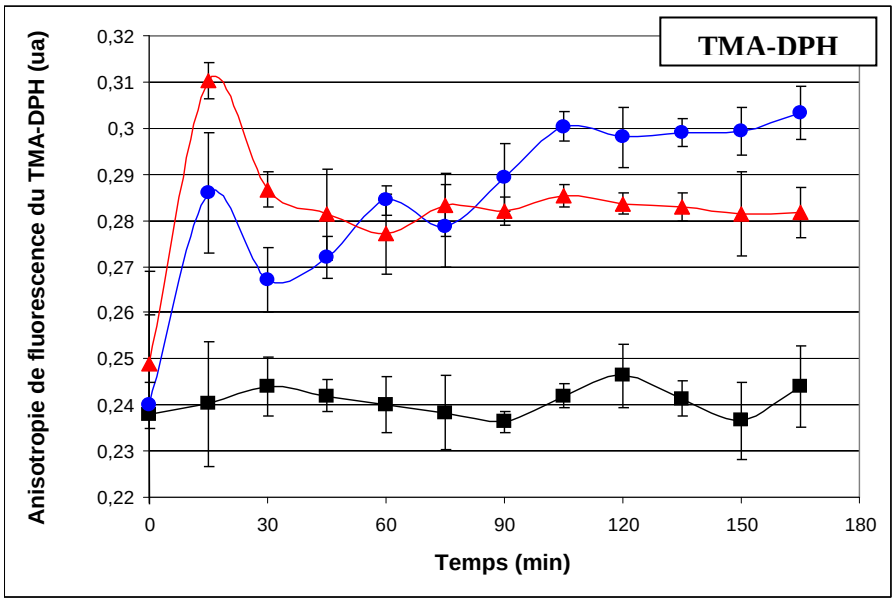


Figure 5-5 : Anisotropie de fluorescence du DPH (en haut) et du TMA-DPH (en bas) de cellules de *L. innocua* LRGIA 01 non traitées, cellules traitées à la ½ CMI et à la CMI du PHMB (n=3)

Par la suite, l'anisotropie de fluorescence se stabilise après environ 105 minutes pour le TMA-DPH et après environ 120 minutes pour le DPH. Pour ce qui est du témoin qui contient les cellules non traitées, l'anisotropie se stabilise dès 30 min pour les 2 marqueurs. Des

répétitions ont été réalisées et il a été montré que l'anisotropie de fluorescence des 2 marqueurs n'évoluait pas au-delà de 165 minutes de contact. C'est donc le temps 165 minutes qui sera choisi pour la comparaison des 3 essais (témoin cellules non traitées, cellules traitées au PHMB à la ½ CMI et cellules traitées à la CMI).

D'après la figure 5-5, on peut dans un premier temps remarquer que l'anisotropie de fluorescence du DPH est plus faible que l'anisotropie de fluorescence du TMA-DPH pour les cellules non traitées. On peut supposer que la lumière émise par le DPH est plus faible que celle émise par le TMA-DPH puisque ce dernier ce situe à la surface de la membrane.
Il faut noter que l'anisotropie de fluorescence du DPH lorsque les cellules ne sont pas en contact avec le PHMB (cellules témoin) reste stable pendant le temps de l'expérimentation et est de 0,175 ± 0,001 après 165 min de contact. L'anisotropie de fluorescence du DPH des échantillons exposés au PHMB n'augmente pas de manière significative que ce soit pour les cellules exposées à la ½ CMI ou à la CMI avec respectivement 0,179 ± 0,006 et 0,183 ± 0,011 pour la ½ CMI et la CMI après 165 min de contact.
D'après Ikeda *et al.* [19], le PHMB pénètre partiellement le cœur hydrophobe de la membrane des bactéries et il est donc possible de proposer, d'après les résultats obtenus et en accord avec ces auteurs, que le PHMB n'exerce pas d'effet sur la membrane interne de *L. innocua* LRGIA 01. On peut également supposer que le PHMB n'a pas été mis en contact assez longtemps pour agir au cœur même de la membrane de *L. innocua* LRGIA 01. La figure 5-5 semble également indiquer que le PHMB ne s'insère pas assez profondément pour perturber la rotation du DPH, et ainsi augmenter l'anisotropie de fluorescence émise par ce marqueur. La fluidité membranaire des cellules de *L. innocua* LRGIA 01 au niveau des chaînes acylées hydrophobes n'est pas altérée avant que la désorganisation de la membrane n'opère.

De même que pour les mesures d'anisotropie de fluorescence du DPH, la valeur d'anisotropie de fluorescence du TMA-DPH (Figure 5-5) pour les cellules non traitées au PHMB est constante au cours de l'expérimentation et est de 0,244 ± 0,009 après 165 min de contact.
Les valeurs d'anisotropie des cellules traitées au PHMB à la ½ CMI et à la CMI augmentent toutes deux avant de se stabiliser à une valeur de 0,282 ± 0,006 et de 0,303 ± 0,006 respectivement pour la ½ CMI et la CMI.
Cette augmentation d'anisotropie reliée à une diminution de la fluidité membranaire révèle le mécanisme d'agrégation du PHMB en surface de la membrane [19] de *L. innocua* LRGIA 01. Le TMA-DPH étant localisé en surface de la membrane, les variations observées se localisent

au niveau de la surface. L'adsorption de l'agent antimicrobien diminuerait l'espace libre entre les têtes lipidiques et par conséquent, la rotation du TMA-DPH serait plus limitée, ainsi la dispersion de l'émission du marqueur étant moins importante, l'anisotropie augmenterait. Le PHMB contribuerait donc à une diminution de la fluidité membranaire au niveau des têtes hydrophiles lipidiques.

Les tests de différenciation statistique effectués sur les valeurs d'anisotropie de fluorescence du TMA-DPH confirment que celles-ci sont différentes en fonction de la concentration en PHMB alors que celles de l'anisotropie de fluorescence du DPH ne sont pas différentes par la présence de PHMB (tableau 5-5).

Tableau 5-5 : Valeurs d'anisotropie de fluorescence de cellules non traitées au PHMB et de cellules au contact du PHMB à la ½ CMI et à la CMI après 165 minutes de contact. Chaque lettre a, b, c ou d représente des groupes statistiques homogènes (à observer par marquer). Les chiffres représentés par a, b et c sont significativement différents par le test de Fisher ($p<0,05$) avec a<b<c<d. ua = unité arbitraire

Anisotropie de fluorescence du TMA-DPH (ua)			**Anisotropie de fluorescence du DPH (ua)**		
Cellules non traitées	**½ CMI**	**CMI**	**Cellules non traitées**	**½ CMI**	**CMI**
0,244 ± 0,009[b]	0,282 ± 0,006[c]	0,303 ± 0,006[d]	0,175 ± 0,001[a]	0,179 ± 0,006[a]	0,183 ± 0,011[a]

Les tests de différenciation réalisés confirme que l'anisotropie de fluorescence du TMA-DPH des cellules traitées au PHMB à la CMI est significativement plus importante (0,303 ± 0,006) que celle des cellules traitées à la ½ CMI (0,282 ± 0,006), elle-même plus importante que celle des cellules non traitées (0,244 ± 0,009). Pour ce qui est de l'anisotropie de fluorescence du DPH, aucune différence significative n'a pu être mise en évidence aux mêmes concentrations en PHMB à laquelle *L. innocua* LRGIA 01 a été exposée.

Le PHMB entraîne donc une diminution de la fluidité membranaire de *L. innocua* LRGIA 01 au niveau de la surface (augmentation de l'anisotropie de fluorescence du TMA-DPH) mais pas au niveau de la membrane interne (pas de changement de l'anisotropie de fluorescence du DPH) comme on peut le voir dans la figure 5-5. Il faut noter que les expérimentations ont été réalisées sur un temps de contact assez court puisque les cellules ont été mises en contact avec le PHMB pendant environ 2h30.

Lors d'études précédentes, l'effet du PHMB sur *L. innocua* LRGIA 01 à la ½ CMI et à la CMI a été évalué au cours du temps. En effet un dénombrement a été réalisé avant et après contact avec le PHMB en milieu liquide à ces 2 concentrations. Nous avons pu montrer qu'en

2h30, la différence de croissance est très peu significative car elle représente moins d'un log (UFC/mL) pour la ½ CMI et un peu plus d'un log (UFC/mL) pour la CMI. Il est donc important de préciser que l'effet observé à l'échelle de la cellule à l'aide de la spectrofluorimétrie n'est pas réellement visible à l'échelle de la population lorsqu'on utilise le dénombrement sur milieu gélosé.

Les membranes cytoplasmiques des bactéries possèdent des caractéristiques différentes, tant d'un point de vue structural que fonctionnel. Ces membranes définissent la cellule par rapport à son environnement et délimitent le cytoplasme et les autres organites cellulaires. Elles régulent le mouvement de substances entrant ou sortant de la cellule, afin de fournir à la cellule toutes les molécules (ions, composés organiques…) dont elle a besoin. De plus, elles aident la cellule à réguler sa croissance et son métabolisme. Enfin, la membrane joue un rôle important dans la communication intercellulaire et la détection de signaux cellulaires, par l'intermédiaire de molécules « signal » et de récepteurs [20].
Au regard de l'importance de tous ces rôles, il est primordial de comprendre les facteurs qui peuvent altérer ces propriétés. Un des paramètres régulant ces activités est la fluidité membranaire, qui évolue en fonction de différents facteurs environnementaux.

La membrane est constituée de lipides, protéines et glucides, Ces trois éléments coopèrent pour former un film fluide et étanche isolant la cellule du milieu extérieur et qui lui permet d'interagir avec son environnement. Les lipides constituent le cœur de la membrane et représentent souvent 50 % de la masse de cette dernière [21]. Le côté polaire (hydrophile) est en contact avec le milieu extérieur et le côté apolaire (hydrophobe, les chaînes acylées) se situe à l'intérieur de la membrane. Deux couches de lipides constituent la bicouche lipidique, bloquant donc les molécules hydrophiles, mais laissant passer certaines molécules hydrophobes. Les phospholipides retrouvés dans ces membranes peuvent être polaires (majoritaires) ou non.
Les lipides sont directement responsables de la fluidité membranaire. En effet, cette fluidité est modifiée en fonction des stress auxquels la membrane est soumise. Par exemple, une modification de la température va influencer les changements de fluidité membranaire dans le même sens que la température [22] : pour modifier la fluidité de la membrane, la cellule peut synthétiser des lipides de nature différente. Des acides gras à longue chaîne rendront la membrane moins fluide, alors que des chaînes composées de plus d'insaturations la rendront plus fluide. Elle doit ensuite les incorporer à la bicouche lipidique et ce processus n'est

évidemment pas instantané. Par conséquent, la fluidité membranaire ne peut changer qu'après un certain temps sous l'influence du stress qu'elle subit.

De plus, l'interaction entre les lipides et les protéines confère un rôle à ces dernières dans la fluidité membranaire [20]. Les protéines sont intégrées à la membrane plasmique et possèdent deux rôles majeurs : celui de stabilisation de la membrane plasmique, et celui de favoriser les échanges moléculaires avec le milieu extérieur. Plus les protéines sont ancrées dans la membrane plasmique, plus elles limiteront la flexibilité des chaînes acylées, en diminuant leur amplitude de mouvement, et par conséquent entraîneront une diminution de la fluidité membranaire [23]. La bactérie peut donc modifier sa composition lipidique, de manière à diminuer la force des interactions protéines-lipides afin d'augmenter sa fluidité membranaire, par exemple en cas de diminution de la température de son environnement ou de contact avec un agent antimicrobien comme le PHMB [24].

En effet, nous avons pu mettre en évidence une diminution de la fluidité membranaire (augmentation de l'anisotropie de fluorescence) lors du contact des cellules de *L. innocua* LRGIA 01 avec les PHMB que ce soit à la ½ CMI ou à la CMI par rapport à des cellules non traitées. Ces changements de fluidité membranaire peuvent donc être liés à différents facteurs que sont :

- une synthèse de lipides à longues chaînes moins insaturés dans le but de s'adapter à ce stress
- une synthèse de protéines de la membrane ancrées fortement aux lipides grâce à des forces d'interactions importantes avec une diminution de la flexibilité de cette dernière.

Cependant, dans le cadre de ce travail les changements de fluidité de la membrane de *L. innocua* LRGIA 01 après contact avec le PHMB ont été observés après environ 2 h de contact, ce temps semble insuffisant pour que les cellules aient une réponse adaptative à cette variation de leur environnement impliquant une modification de la composition de leur membrane. Dans l'article de Badaoui Najjar *et al.* [24] il a été montré que des cellules de *L. monocytogenes* étaient capables d'induire des changements au niveau de leurs membranes suite à une diminution de la température en 3 heures. Giotis *et al.* [25] et Mastronicolis *et al.* [26] ont montré que les acides gras de la membrane de *Listeria* jouaient un rôle dans l'adaptation de cette dernière à des augmentations de température ou à des variations de pH. Ces auteurs ont montré que cette souche était capable de modifier sa composition membranaire en acides gras pour s'adapter à des stress tels que le pH ou la température en 5 jours environ.

Dans l'étude de Jasniewski *et al.* [27], le même type d'étude a été réalisé pour étudier le mode d'action de la mésenterocine 52 A, une bactériocine, vis-à-vis de différentes espèces de *Listeria*. Ces auteurs ont montré que la bactériocine testée semble affecter la membrane de *Listeria ivanovii* seulement en surface car seule une augmentation de l'anisotropie de fluorescence du TMA-DPH a été mise en évidence. Ces résultats sont similaires à ceux obtenus pour le PHMB vis-à-vis de *L. innocua* LRGIA 01. Ces auteurs ont décrit le modèle de « barrel-stave » et de « carpet » qui entraîne la formation de pores au niveau de la membrane plasmique des bactéries. Les deux modèles proposent un mécanisme en 4 étapes successives. Pour le modèle « barrel-stave » ces étapes sont : une étape d'adsorption du peptide sur la structure en hélice α des protéines membranaires, une reconnaissance entre les structures en hélice α et les monomères du peptide, une insertion dans les motifs en hélice du cœur hydrophobe de la membrane et enfin un recrutement d'autres monomères pour former un pore plus grand. Le modèle « carpet » comprend les 4 étapes suivantes : une adsorption préférentielle du monomère au niveau de la tête des phospholipides, l'alignement des peptides au niveau de la surface de la membrane, une rotation et une réorientation des résidus hydrophobes à travers le cœur hydrophobe de la membrane et enfin une désintégration de la membrane par le détachement des 2 couches de lipides. Il semblerait que le PHMB se rapproche du modèle « carpet ». En effet, lorsque la souche de *L. innocua* LRGIA 01 est en contact avec le PHMB cela entraîne une rapide augmentation de l'anisotropie de fluorescence du TMA-DPH ce qui semble indiquer que le PHMB interagit seulement avec la surface de la membrane et pas avec la double couche de phospholipides. Ces résultats suggèrent donc que cet agent antimicrobien agirait suivant le modèle « carpet » en se fixant à la surface de la membrane pour entraîner dans un second temps la formation de pores et une destruction de la cellule. Pour valider ce modèle il serait intéressant de vérifier le flux d'ions à travers la membrane *via* l'utilisation de marqueurs fluorescents ou de visualiser les pores formés par l'agent antimicrobien directement grâce à la microscopie électronique.

Enfin, le fait de travailler sur cellules entières permet d'obtenir une information plus proche de la situation réelle que lors d'un travail sur un modèle de membrane reconstituée. En effet, il est difficile de définir les limites de la fluidité membranaire d'une membrane biologique reconstituée *in vitro* et cela pose de nombreux problèmes [28]. Le fait que les lipides soient impliqués dans différents procédés au niveau de la membrane, leur rôle dans les fonctions cellulaires est difficile à élucider et est simplifié dans le cas de l'utilisation de membranes reconstituées [29]. De plus, sans contrôles génétiques, les liposomes ne peuvent pas être considérés comme une membrane fonctionnelle de par le manque de régulation de la structure

membranaire en réponse à son environnement. Le travail de différents auteurs notamment Fernandez Murga *et al.* [30] a mis en évidence que la stabilité et la perméabilité d'un complexe lipidique en comparaison d'une membrane intacte sont vraiment différentes. Il est donc primordial de travailler sur cellules entières pour comprendre de façon plus globale le mode d'action du PHMB. Cependant le fait de travailler sur cellules entières constitue également une difficulté. En effet, il est difficile de distinguer les changements de conformation de la membrane suite à l'interaction du PHMB à sa surface de la réponse adaptative de la cellule qui peut impliquer une modification de sa composition en activant ou réprimant des gènes codant pour la synthèse de ses composants. Les changements de conformation peuvent prendre quelques jours comme on a pu le voir précédemment avec les acides gras si bien que dans le cas présent, l'hypothèse de changements conformationnels de la membrane en réponse à l'exposition au PHMB semble plus probable.

En complément de la spectrofluorimétrie, la spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier pourra permettre de confirmer et/ou de préciser les informations obtenues grâce à la spectrofluorimétrie de fluorescence.

4. Evaluation des changements au niveau la membrane de *Listeria innocua* LRGIA 01 après contact avec le PHMB en milieu liquide par spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier (IRTF)

La méthode de spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier (IRTF) a été employée dans le but de compléter les informations obtenues par spectrofluorimétrie pour l'étude de la fluidité de la membrane de *L. innocua* LRGIA 01 lors du contact avec le PHMB en milieu liquide.

La spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier permet d'enregistrer des spectres infrarouges de matériels biologiques de membranes biologiques en particulier [31]. L'avantage de cette méthode est de pouvoir étudier les protéines et lipides d'une membrane biologique et observer leurs changements conformationnels après ou pendant son exposition à divers paramètres tels que la température, la présence d'agents antimicrobiens ou encore le pH et ce sur une cellule entière.

Dans notre cas, l'objectif sera de pouvoir évaluer les changements au niveau de la membrane des bactéries lors d'un traitement avec un agent antimicrobien : le PHMB. Ceci permettra de

compléter les observations des variations de fluidité. La spectroscopie IRTF donne une information sur les groupements chimiques qui composent la membrane mais aussi sur leurs interactions et leur conformation alors que la spectrofluorimétrie donne une information sur les mouvements de la membrane. En confrontant les mesures de ces 2 méthodes, on pourra donc apporter des informations complémentaires sur le mode d'action d'un antimicrobien.

4.1. Spectre infrarouge type de *L. innocua* LRGIA 01 avant contact avec le PHMB

Comme décrit dans le chapitre « Matériels et Méthodes », les cellules de *L. innocua* LRGIA 01 collectées en phase exponentielle de croissance, ont été mises en contact avec du PHMB à 10 mg/L et 20 mg/L (respectivement la 1/2 CMI et la CMI). Un témoin sans PHMB a également été réalisé en parallèle et les cultures ont été suivies pendant 1, 4, 9 et 24 h. Les cellules ont ensuite été rincées puis déposées sur pastille de CaF_2 dans le but de réaliser l'acquisition des spectres.

Avant de présenter les spectres de cellules traitées au PHMB, un profil spectral IR caractéristique de *L. innocua* (Figure 5-6) est présenté. Les spectres des bactéries ont été enregistrés entre 1000 et 4000 cm^{-1} et une moyenne de 40 scans a été réalisée pour chaque échantillon. Les spectres ont ensuite été traités dans le but de pouvoir les comparer entre eux par le logiciel OPUS NT 5.1 (Bruker Optics, Wissembourg, France) et chaque mesure a été répétée 8 fois. Un spectre de *L. innocua* LRGIA 01 avant contact avec le PHMB est présenté dans la figure 5-6.

Ces données spectrales, typiques des empreintes bactériennes, ont fait l'objet d'une littérature abondante et les principales bandes représentant les différentes liaisons au sein de la membrane ont été attribuées et sont reportées directement sur le spectre. Cependant, il est nécessaire de souligner que même si les principaux constituants de chacune des bandes ont été identifiés, la complexité de certains massifs demeure.

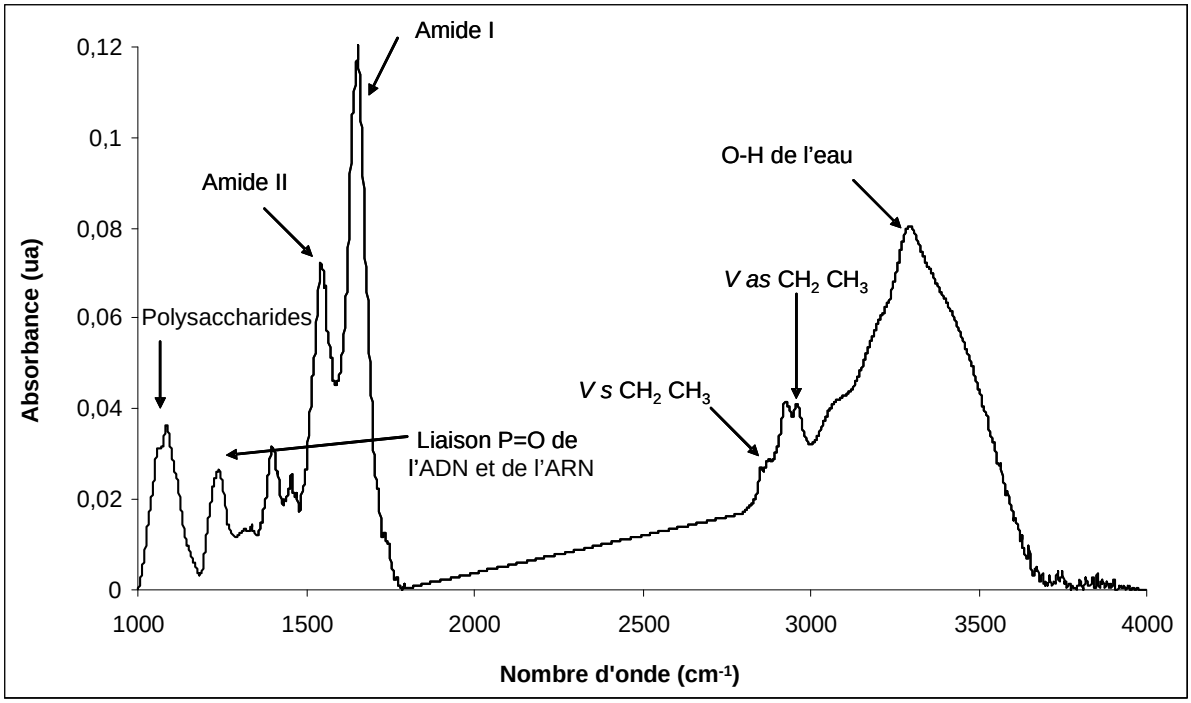


Figure 5-6 : Spectre IR témoin de *L. innocua* LRGIA 01, enregistré entre 1000 et 4000 cm^{-1} (40 scans ; résolution de 4 cm^{-1}), Vs : vibration symétrique, Vas : vibration asymétrique. ua : unités arbitraires

Lorsque les spectres infrarouges (IR) sont enregistrés, un spectre représentant les groupements chimiques qui composent majoritairement la membrane des bactéries est généré car il s'agit de la composition majoritaire des cellules.

Le profil spectral global de *L. innocua* (Figure 5-6) fait apparaître les principaux groupes de biomolécules présentes essentiellement dans la membrane des bactéries, à savoir : les protéines, les acides nucléiques, les polysaccharides et les lipides [32].

La région située entre 4000 et 3000 cm^{-1} est essentiellement représentée par les vibrations des amines présentes dans les acides nucléiques (adénine, guanine et/ou cytosine) et les protéines. Dans cette zone, la présence de molécules d'eau sous forme liée présente en grande quantité à l'intérieur des cellules bactériennes masque les autres pics pouvant être observés.

Concernant la région située entre 3000 et 2800 cm^{-1}, les absorptions sont attribuées essentiellement aux élongations C-H des groupements CH_n des chaînes aliphatiques principalement des lipides [33].

Dans la région comprise entre 1800 et 1500 cm^{-1} se retrouvent les vibrations des groupements esters (1736 cm^{-1}) présents dans les lipides et les acides gras. Deux absorptions très intenses caractéristiques de la liaison peptidique CONH (amide) peuvent également être observées, à savoir les bandes amides I et II situées respectivement à 1650 et 1548 cm^{-1}. D'autres

absorptions, plus faibles, pourraient aussi provenir du peptidoglycane et des acides nucléiques (vibration des liaisons C=O, C=N et C=C des bases).

La région située entre 1500 et 1300 cm^{-1} est caractéristique des déformations CH_2 et CH_3, ainsi que des élongations des groupements carboxylates.

En ce qui concerne la région située entre 1300 et 1200 cm^{-1}, elle est dominée par l'absorption des acides nucléiques (ARN et ADN) à 1240 cm^{-1} mais également des phosphodiesters et phospholipides.

Enfin, le massif situé entre 1200 et 900 cm^{-1} résulte de contributions diverses telles que celles des polysaccharides, du peptidoglycane et des lipopolysaccharides. On note également la présence de bandes reliées aux acides nucléiques (ARN, ADN), aux phosphodiesters, aux pyrophosphates, et aux phospholipides. Seules les protéines ne contribuent pas à l'absorption observée dans cette région.

Par la suite, seuls les pics de la région 2840-3000 cm^{-1} représentant les liaisons C-H dans leur configuration étirée principalement des lipides ont été observés. En effet, lorsque le spectre a été pris dans sa globalité, c'est dans cette région que les différences étaient les plus marquées entre les cellules non traitées au PHMB et celles en contact avec le PHMB. Par la suite la région spectrale des lipides a été comparée pour les cellules traitées et les cellules non traitées au PHMB. La conversion des spectres en dérivées secondes (figure 5-7) a permis de différencier les caractéristiques propres à un spectre de bactéries traitées ou non au PHMB ([34-36]).

4.2. Comparaison des spectres infrarouges des cellules de *L. innocua* LRGIA 01 avant et après contact avec le PHMB

Dans un premier temps, la comparaison des spectres a été faite pour les 4 temps testés (1, 4, 9 et 24 h). Par la suite, seuls les spectres après 4 h d'exposition au PHMB ont été utilisés. En effet, les différences les plus marquées étaient observées à ce temps mais il s'agit également du temps où les bactéries se trouvent en phase exponentielle. Afin de simplifier les traitements des différents spectres, un seul temps a été pris en compte pour la comparaison. La figure 5-7 représente les spectres IR en dérivées secondes après contact des cellules de *L.*, *innocua* LRGIA 01 avec le PHMB pendant 4 h.

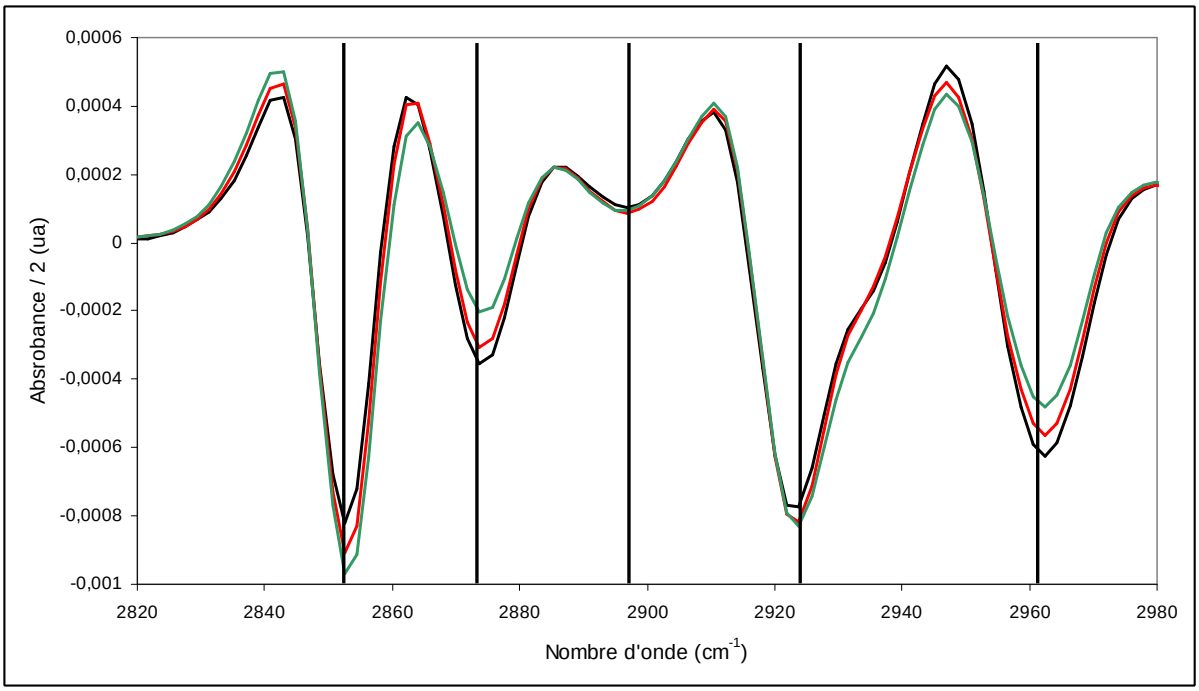


Figure 5-7 : Dérivées secondes des spectres IR de *L, innocua* LRGIA 01 (région 2820-2980 cm^{-1}) après contact avec le PHMB à la ½ CMI (rouge) à la CMI (vert) pendant 4h, Un témoin sans PHMB (noir) est également présenté. Chaque courbe est la résultante d'une moyenne de 8 spectres.

La comparaison des dérivées secondes (Figure 5-7) des spectres montre la présence de 5 bandes communes aux 3 spectres (avant et après traitement des cellules de *L. innocua* LRGIA 01 avec le PHMB à la ½ CMI et à la CMI). Il s'agit des bandes centrées à 2960, 2924, 2874, 2852 et 2897 cm^{-1} (Figure 5-7), Les bandes peuvent être attribuées aux vibrations d'élongation symétriques et antisymétriques de CH_2 (respectivement 2854 et 2925 cm^{-1}) et CH_3 (respectivement 2874 et 2961 cm^{-1}) auxquelles vient s'ajouter la contribution de υCH (à 2897 cm^{-1}).

Afin d'observer la contribution de chacune de ces bandes au sein de la région 2800-3000 cm^{-1}, une décomposition a été réalisée en fixant ces 5 bandes comme référence. Les résultats de ces décompositions sont présentés dans les figures 5-8, 5-9 et 5-10.

La figure 5-8 représente la décomposition des massifs du spectre de *L. innocua* avant traitement au PHMB. La position des 5 bandes gaussiennes a été déterminée grâce à la dérivée seconde comme indiqué précédemment. Pour chacune des figures 8, 9 et 10, les différentes courbes représentent un spectre expérimental (une des courbes rouges) et des spectres calculés par le logiciel (l'autre courbe rouge et les courbes violettes, et vertes).

Pour chaque graphe, les 4 pics représentant les vibrations asymétriques et symétriques des liaisons CH_2 et CH_3 paraissent intéressants avec respectivement 2960, 2924, 2874 et 2852 cm^{-1} pour les liaisons asymétriques CH_3 et CH_2 et les liaisons symétriques CH_3 et CH_2.

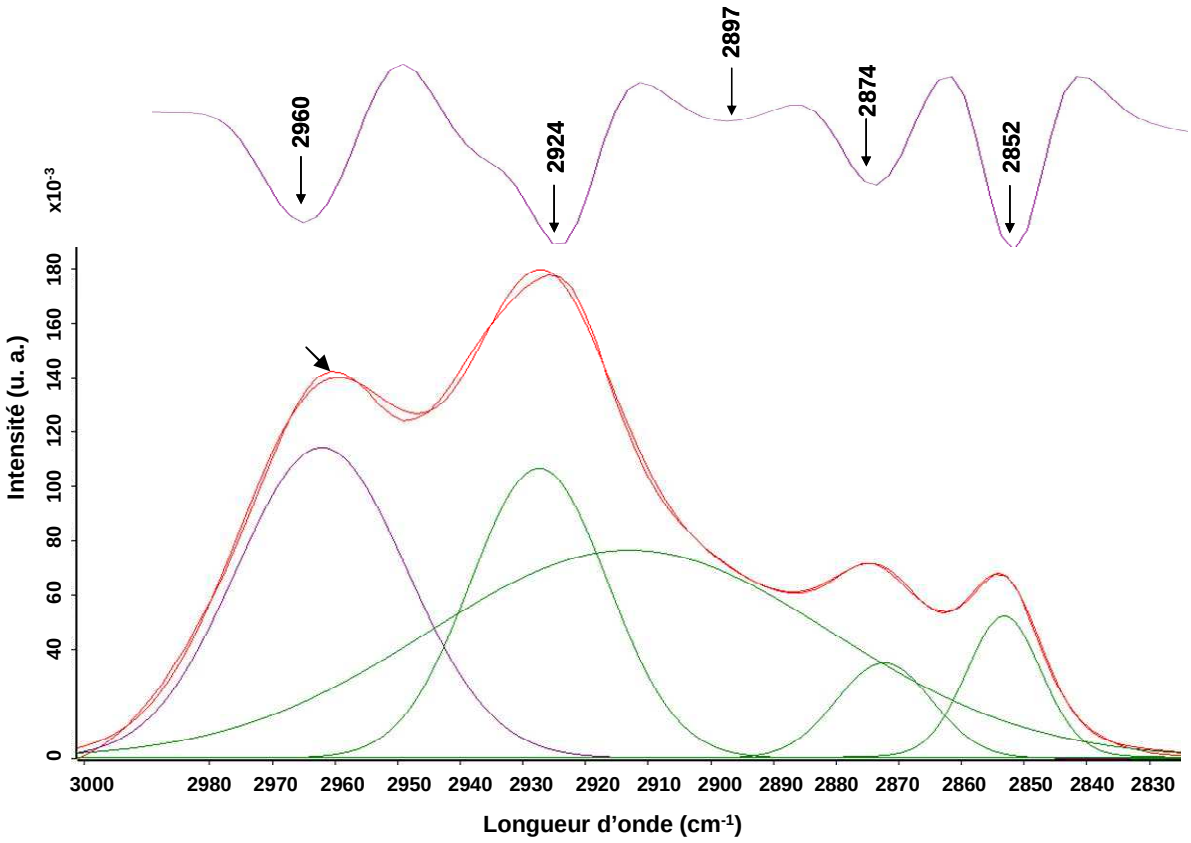


Figure 5-8 : Curve-fitting du spectre IRTF de *L. innocua* LRGIA01 dans la zone des lipides (2830-3000 cm^{-1}) avant traitement au PHMB pour le temps 4 h. Pour les courbes rouges, 1 courbe représente un spectre expérimental (flèche noire) et une courbe représente un spectre calculé par la décomposition des bandes. Les courbes vertes et violettes représentent les spectres calculés pour la décomposition des bandes. Le spectre de la dérivée seconde utilisé pour la position des bandes est situé en haut du spectre. ua : unités arbitraires

Sur le spectre des cellules non traitées au PHMB (4 h), il faut noter que la part des 2 pics correspondant aux vibrations asymétriques des liaisons CH_2 (2924 cm^{-1}) et CH_3 (2960 cm^{-1}) est quasiment égale avec un pic un peu plus bas et moins large pour les CH_2. Pour ce qui est des vibrations symétriques de ces 2 mêmes liaisons, le pic représentant les liaisons CH_3 (2874 cm^{-1}) apparaît plus bas que celui des liaisons CH_2 (2852 cm^{-1}). Dans ce cas là, on ne peut pas réellement prendre en compte le pic correspondant aux liaisons υCH (2897 cm^{-1}) car il représente une masse trop large.

La figure 5-9 représente la décomposition des massifs du spectre de *L. innocua* après traitement au PHMB à la ½ CMI pendant 4 h. Sur les 5 gaussiennes, 4 pics apparaissent

significatifs et représentent les vibrations asymétriques et symétriques des liaisons CH_2 et CH_3.

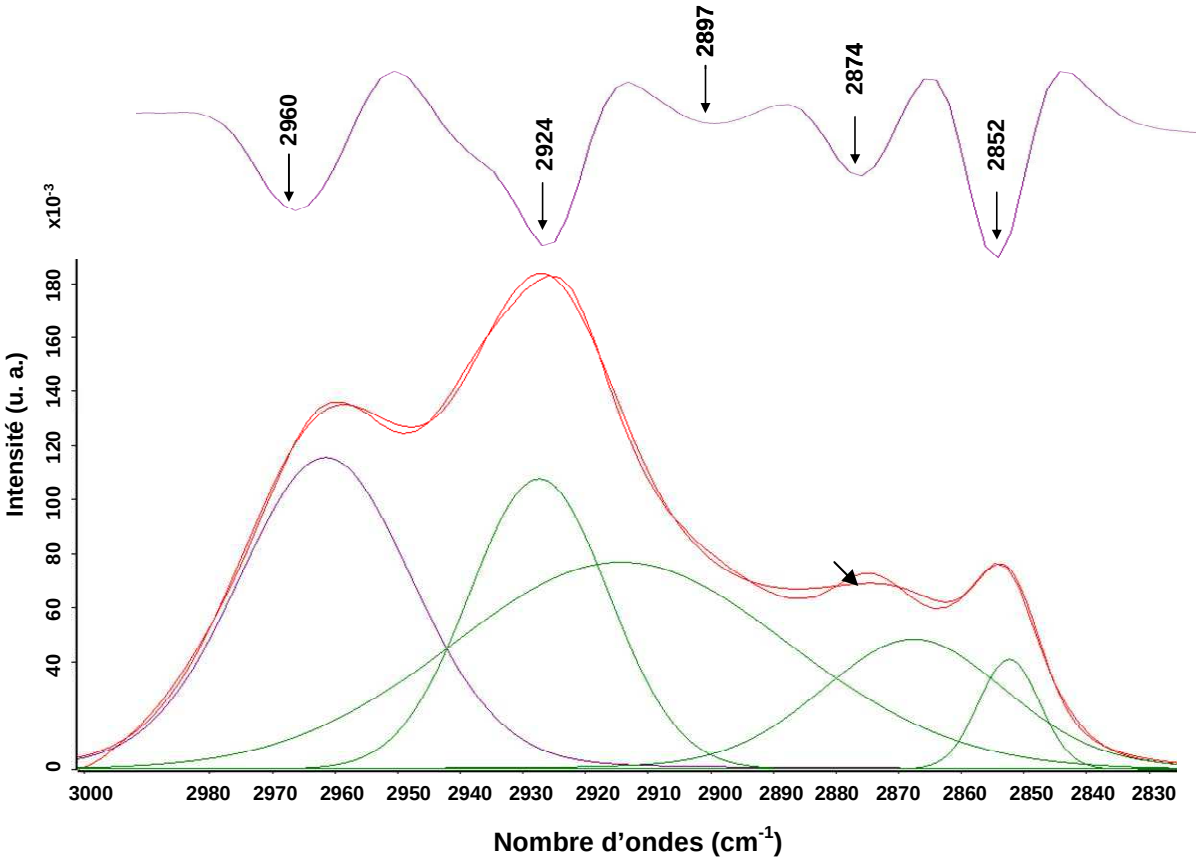


Figure 5-9 : Curve-fitting du spectre IRTF de *L. innocua* LRGIA01 dans la zone des lipides (2830-3000 cm^{-1}) après traitement au PHMB à la ½ CMI pour le temps 4 h. Pour les courbes rouges, 1 courbe représente un spectre expérimental (flèche noire) et une courbe représente un spectre calculé par la décomposition des bandes. Les courbes vertes et violettes représentent les spectres calculés pour la décomposition des bandes. Le spectre de la dérivée seconde utilisé pour la position des bandes est situé en haut du spectre. ua : unités arbitraires

Dans le cas des cellules traitées au PHMB à la ½ CMI pendant 4h, différentes observations peuvent être faites. Les mêmes remarques que pour le témoin peuvent être faites pour les vibrations asymétriques des CH_2 (2960 cm^{-1}) et CH_3 (2924 cm^{-1}) à savoir une contribution quasi-identique des 2 pics. Pour les vibrations symétriques, le pic représentant les liaisons CH_3 (2874 cm^{-1}) apparaît plus important que dans le cas des cellules non traitées au PHMB. En effet, ce pic est beaucoup plus large est légèrement décalé vers les nombres d'onde les plus bas. On observe donc ici une modification de la part des bandes représentant les vibrations symétriques des CH_2 (2874 cm^{-1}) et CH_3 (2852 cm^{-1}).

La figure 5-10 représente la décomposition des massifs du spectre de *L, innocua* après traitement au PHMB à la CMI pendant 4 h. Cinq pics apparaissent significatifs et représentent les vibrations asymétriques et symétriques des liaisons CH_2 et CH_3.

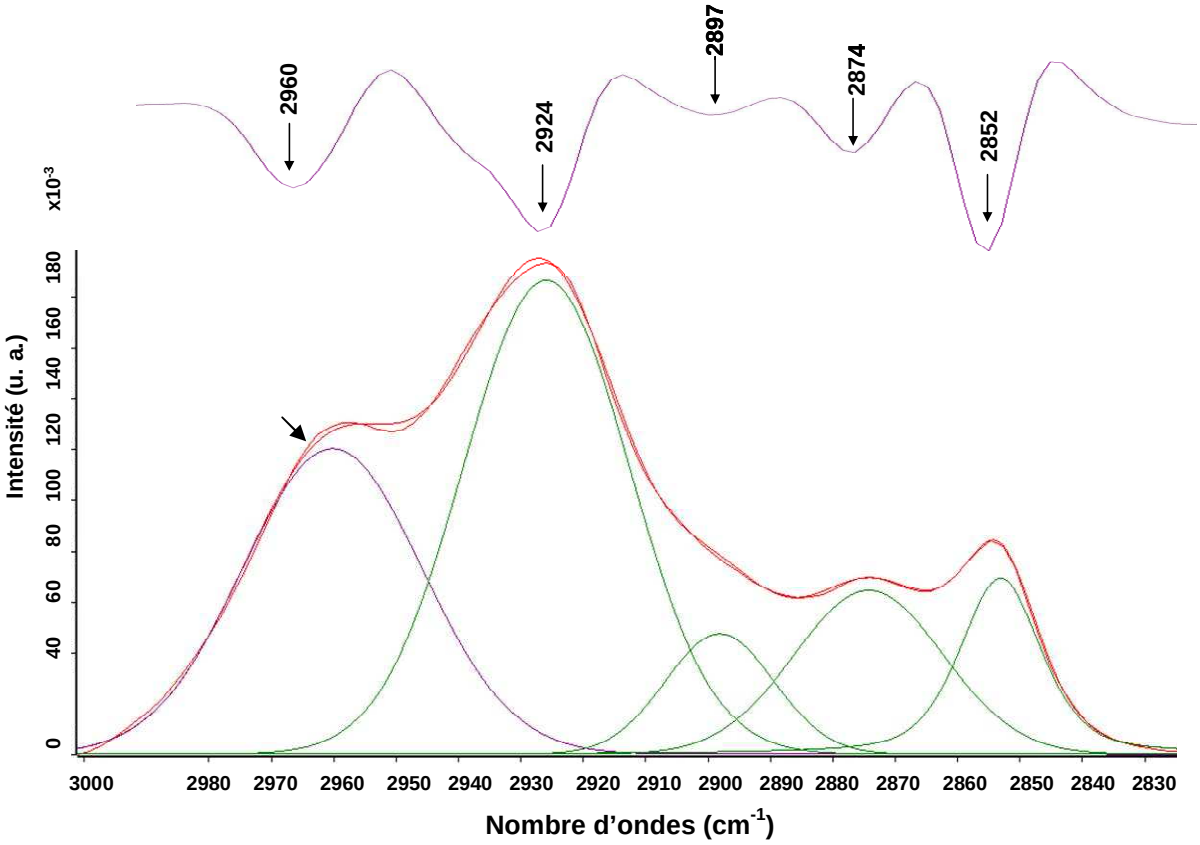


Figure 5-10 : Curve-fitting du spectre IRTF de *L. innocua* LRGIA01 dans la zone des lipides (2830-3000 cm^{-1}) après traitement au PHMB à la CMI pour le temps 4 h. 1 courbe représente un spectre expérimental (flèche noire) et une courbe représente un spectre calculé par la décomposition des bandes. Les courbes vertes et violettes représentent respectivement les spectres expérimentaux et calculés. Le spectre de la dérivée seconde utilisé pour la position des bandes est situé en haut du spectre. ua : unités arbitraires

Dans le cas des cellules traitées au PHMB à la CMI pendant 4 h, il apparaît une différence marquée au niveau du pic représentant les vibrations asymétriques des liaisons CH_2 (2924 cm^{-1}) et le pic correspondant à la contribution des liaisons υCH (2897 cm^{-1}) apparaît plus marqué que sur les 2 spectres précédents.

Les 2 nombres d'ondes où les différences apparaissent les plus marquées sont caractéristiques des vibrations asymétriques des groupes CH_2 (2925 cm^{-1}) et CH_3 (2960 cm^{-1}). Les différences observées sont probablement dues à une modification de l'environnement des cellules lors du contact avec le PHMB. En effet, la région des liaisons CH du spectre IR peut être utilisée pour estimer la longueur des chaînes carbonées constituant les lipides. De longues chaines

hydrocarbonées saturées entrainent l'apparition de 2 bandes spécifiques correspondant aux CH_2 symétriques et asymétriques. Ces bandes correspondent aux pics les plus intenses des CH_3 asymétriques [37]. Ces modifications pourraient être dues à des changements de conformation de la membrane car les changements observés sur le spectre se font seulement après 4 h de contact.

Par la suite, le ratio des pics correspondant à la paire la plus intense a été utilisé c'est-à-dire le ratio des aires sous les pics des liaisons CH_2/CH_3 asymétriques (tableau 5-6).

Tableau 5-6 : Ratio des aires sous le pic CH_2 (2924 cm^{-1}) / CH_3 (2960 cm^{-1}) après contact entre les cellules de *L. innocua* LRGIA 01 et le PHMB à la 1/2CMI et à la CMI ou sans traitement au PHMB. Test de Fisher, les lettres a, b et c correspondent à des valeurs statistiquement différentes pour $p < 0,05$ avec a<b<c.

Temps de contact des cellules avec le PHMB	**cellules non traitées**	**1/2 CMI**	**CMI**
1h de contact	1,60 ± 0,07 [a]	1,78 ± 0,14 [b]	2,01 ± 0,13 [c]
4h de contact	1,64 ± 0,11 [a]	1,79 ± 0,11 [b]	2,09 ± 0,15 [c]
9h de contact	1,67 ± 0,10 [b]	1,77 ± 0,04 [b]	2,14 ± 0,15 [c]
24h de contact	1,65 ± 0,08 [a]	1,79 ± 0,11 [b]	1,94 ± 0,08 [c]

Une comparaison des ratios des aires sous le pic des 2 massifs correspondant aux vibrations asymétriques des groupes CH_2 (2925 cm^{-1}) et CH_3 (2960 cm^{-1}) a été faite après 1, 4, 9 et 24 h. Le test statistique employé est le test de Fisher pour estimer au seuil $p < 0,05$ le caractère significatif des variations observées. Dans le tableau 5-6, les comparaisons ont été faites pour chaque temps entre les différentes conditions : cellules non traitées, cellules traitées au PHMB à la ½ CMI et cellules traitées à la CMI. La lecture de ce tableau se fait donc ligne par ligne.

Ces comparaisons mettent en évidence une différence significative entre les cellules non traitées et les cellules traitées au PHMB à la ½ CMI et à la CMI dès 1h de contact. En effet les valeurs obtenues sont respectivement de 1,60 ± 0,07, 1,78 ± 0,14 et 2,01 ± 0,13 pour les cellules non traitées et les cellules traitées à la ½ CMI et à la CMI du PHMB. On peut également noter que cette différence se maintient après 4, 9 et 24 h de contact avec le PHMB.

Une augmentation du ratio pour les cellules traitées au PHMB à la CMI montre une augmentation de l'aire sous le pic centré à 2924 cm^{-1} correspondant aux vibrations asymétriques des liaisons CH_2. Ceci a également été mis en évidence lors de la décomposition du massif (figure 5-8, 5-9 et 5-10). En effet, ces figures représentant les décompositions des massifs de la zone correspondant aux lipides ont permis de mettre en évidence pour le temps 4 h, une augmentation de la hauteur du pic centré à 2924 cm^{-1} essentiellement pour les cellules traitées au PHMB à la CMI.

Les informations apportées par la spectroscopie IRTF ont pu mettre en évidence un changement au niveau du micro-environnement de la cellule après contact avec le PHMB surtout visible à la CMI. Ce changement concerne essentiellement la zone des lipides où des modifications du ratio de l'absorbance des pics correspondant aux vibrations asymétriques des groupes CH_2-CH_3 a pu être mis en évidence. Ces changements correspondent probablement à des changements de conformation des lipides membranaires en réponse à un stress subi par la cellule. Ces résultats semblent être cohérents avec le mécanisme « Carpet » suggéré par les mesures de fluidité membranaire.

Dans l'article Giudici *et al.* [38], les auteurs ont également utilisé la spectroscopie IRTF et la spectrofluorimétrie pour étudier les effets de la viscotoxine A3 et B sur des membranes modèles contenant des phospholipides à charges négatives. Les 2 viscotoxines testées font partie de la famille des thionines qui sont de petites protéines présentes dans les graines, les feuilles et les tiges de nombreuses plantes. Ces molécules possèdent une activité antibactérienne qui peut refléter la défense des plantes vis-à-vis de ces micro-organismes. Il s'avère que cette molécule nécessite des interactions électrostatiques entre les charges positives de cette protéine et les charges négatives des phospholipides entraînant des changements majeurs au niveau de la membrane bactérienne [39]. Il en est de même pour le PHMB qui possède lui aussi des charges positives à sa surface et qui va se lier aux phospholipides par l'intermédiaire d'interactions électrostatiques. Il a été montré par Mantsch *et al.* [40] que les vibrations asymétriques -CH_2 étaient un bon indicateur de la phase dans laquelle se trouvaient les phospholipides ce qui a également été mis en évidence dans notre cas.

Dennison *et al*. [41] ont également étudié la fluidité membranaire d'extraits lipidiques *d'Escherichia coli* grâce à la spectroscopie IRTF. Ils ont pu mettre en évidence une diminution significative de la fluidité membranaire de ces extraits lorsqu'ils étaient en contact avec un peptide cationique antimicrobien (VP1). Ceci peut être comparé au PHMB qui est un agent antimicrobien chargé également positivement. Ces résultats suggèrent que le contact de VP1 avec la membrane d'*E. coli* entraîne sa pénétration au sein de la double couche de phospholipides et de ce fait, déstabilise la membrane entraînant la lyse cellulaire. Le mode d'action du PHMB semble comparable au mode d'action de VPA dans le sens où il adhèrerait aux phospholipides de la membrane par des liaisons électrostatiques ce qui entraînerait une désorganisation de cette dernière.

Dans le cadre de notre étude, la spectroscopie IRTF nous a donc permis de mettre en évidence un changement essentiellement au niveau des vibrations asymétriques -CH_2 ceci peut être relié à des changements de conformation des phospholipides de la membrane suite à l'interaction du PHMB avec les membranes bactériennes. Les mesures de fluidité membranaire semblent donc montrer une diminution de la fluidité de la membrane de *L. innocua* LRGIA 01 au niveau de la couche externe des phospholipides et suggèrent donc que l'interaction du PHMB avec les membranes entraîne une rigidification de ces dernières. Ces informations se confirment avec l'étude des spectres IR de *L. innocua* LRGIA 01 après contact avec le PHMB.

5. Conclusion

Le PHMB est une molécule nouvellement utilisée dans la désinfection des piscines, la cosmétologie ou encore l'agro-alimentaire. Il s'agit d'une molécule à spectre large pouvant agir aussi bien sur des bactéries à Gram négatif que sur des bactéries à Gram positif. Il a cependant été observé dans le cadre de cette étude que *P. aeruginosa* ATCC 15742 (Gram -) était beaucoup moins sensible que les 2 autres souches testées (Gram +) que sont *L. innocua* LRGIA 01 et *S. aureus* méthi-R nosoco 3011 que ce soit en milieu liquide ou après contact avec un textile traité au PHMB. Il a également été mis en évidence qu'une partie de la population de cellules de *L. innocua* LRGIA 01 mise en contact avec un textile traité au PHMB perdait sa capacité à se multiplier sur un milieu de culture classique mais apparaissait encore viable au microscope à épifluorescence après coloration au Live/Dead® Baclight™. Il a été proposé que ces cellules étaient des cellules viables mais non cultivables ou VNC.
Il est apparu important de comprendre le mécanisme d'action de cet agent antimicrobien, le PHMB, vis-à-vis de cette souche afin de tenter d'expliquer l'apparition de ce type de cellules.

Les résultats de 3 méthodes (microscopie à épifluorescence, spectrofluorimétrie et spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier) utilisées pour comprendre le mode d'action du PHMB, sont intéressants et ont permis de proposer un mécanisme d'action du PHMB vis-à-vis de *L. innocua* LRGIA 01. En effet, ces 3 méthodes utilisées en parallèle peuvent être complémentaires dans l'information qu'elles apportent, à savoir une information sur la cible d'action du PHMB à l'aide de la microscopie à épifluorescence, la membrane, sur les changements de fluidité membranaire par spectrofluorimétrie (anisotropie de fluorescence en présence de sondes fluorescentes) et les modifications au niveau des vibrations des liaisons

-CH_2 et -CH_3 des lipides de la membrane. De plus, elles ont été réalisées sur des cellules entières vivantes et non sur des modèles de membranes.

La plupart des études réalisées par spectroscopie IRTF ont été faites sur des extraits de membranes comme expliqué précédemment et très peu d'études ont concerné la membrane entière. En effet, la membrane bactérienne est un système très complexe beaucoup plus difficile à étudier qu'une membrane reconstituée (modèle type extrait de lipides ou liposomes). De nombreuses études ont été réalisées en utilisant un modèle de membrane mimant les phospholipides de cette dernière dans l'espoir de prédire les relations entre les propriétés de la membrane et l'activité biologique. Il est clair qu'il existe une grande différence entre des cellules vivantes et des modèles de membranes [42] et il est donc important de travailler sur des cellules vivantes pour apporter une information précise sur le mode d'action en conditions réelles d'utilisation d'un agent antimicrobien tel que le PHMB.

En conclusion, ces 3 méthodes apportent un intérêt à la compréhension du mode d'action du PHMB puisqu'elles sont complémentaires et il est donc possible de proposer un modèle :

- Mise en évidence d'une action au niveau de la membrane de façon générale avec la microscopie à épifluorescence : pénétration de la membrane par le PHMB entraînant l'entrée de l'iodure de propidium et une coloration rouge des cellules dès le contact avec une faible concentration en PHMB (5 mg/L),

- Mise en évidence grâce à la spectrofluorimétrie d'une action en surface du PHMB et non au cœur même de la membrane,

- Mise en évidence d'un changement au niveau du micro-environnement de la cellule après contact avec le PHMB à la CMI qui concerne essentiellement la zone des lipides avec des modifications de conformation.

Le ratio des pics caractéristiques des vibrations asymétriques des groupes CH_2/CH_3 permet donc de décrire un changement de conformation au niveau de la membrane de *L. innocua* LRGIA 01 induit par les interactions du PHMB avec la surface de la membrane. Ces modifications au niveau de ce ratio ont déjà été observées par d'autres auteurs [32, 43, 44, 45] et confirment les résultats obtenus dans notre étude.

Le mode d'action du PHMB serait donc un modèle de type « Carpet ». Ce modèle a été décrit pour la première fois par He *et al.* [46] pour expliquer le mode d'action de la dermaseptine.

Dans ce modèle de type détergent, les agents antimicrobiens se fixent à la surface de la membrane et la couvrent comme un tapis. Par la suite, des monomères d'agents antimicrobiens se forment induisant une perturbation de la membrane et la formation de pores. Le PHMB agirait selon ce modèle avec une fixation de la molécule à la surface de la cellule (observé lors de la mesure de la fluidité membranaire) puis une formation de monomère et de changements de conformation de la membrane (mis en évidence par spectroscopie IRTF) et enfin la formation de pores permettant l'entrée de l'IP lors de l'utilisation de la microscopie à épifluorescence.

6. Références bibliographiques

[1] S. Arunyadej, R. Mitchell, J. Walton, C. Carr. An investigation into the effect of laundering on the repellency behaviour of a fluorochemical-treated cotton fabric. *Journal of the Textile Institute. Part 1, Fibre science and textile technology* (1998) **89 (4)**: pp. 696-702.

[2] P. Gilbert, L. Moore. Cationic antiseptics: diversity of action under a common epithet. *Journal of Applied Microbiolgy* (2005) **99**: pp. 703-715.

[3] N. Kitahara, T. Sato, H. Isogawa, Y. Ohgoe, S. Masuko, F. Shizuku, K.K. Hirakuri. Antibacterial property of DLC film coated on textile material. *Diamond and Related Materials* (2010) **19 (7-9)**: pp. 690-694.

[4] P. Gilbert, D. Pemberton, D. E. Wilkinson. Barrier properties of the Gram-negative cell envelope towards high molecular weight polyhexamethylene biguanides. *Journal of Applied Microbiology* (1990) **69 (4)**: pp. 585-592.

[5] L. Méchin, F. Dubois-Brissonnet, B. Heyd, J. Y. Leveau. Adaptation of *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 15442 to didecyldimethylammonium bromide induces changes in membrane fatty acid composition and in resistance of cells. *Journal of Applied Microbiology* (1999) **86 (5)**: pp. 859-866.

[6] M. F. Loughlin, M. V. Jones, P. A. Lambert. *Pseudomonas aeruginosa* cells adapted to benzalkonium chloride show resistance to other membrane-active agents but not to clinically relevant antibiotics. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* (2002) **49 (4)**: pp. 631-639.

[7] H. Yamamoto. Viable but non culturable state as a general phenomenon of non-spore-forming bacteria, and its modeling. *Journal of Infectiology Chemotherapy* (2000) **6**: pp. 112-114.

[8] D. McDouglas, S. A. Rice, D. Weichart, S. Kjelleberg. Nonculturability: adaptation or debilitation? *FEMS Microbiology Ecology* (1998) **25**: pp. 1-9.

[9] N. J. Rowan. Viable but non-culturable forms of food and waterborne bacteria: Quo Vadis? *Trends in Food Science & Technology* (2004) **15 (9)**: pp. 462-467.

[10] Y. T. H. P. Van Duynhoven, R. De Jong. Transmission of *Helicobacter pylori*: a role for food? *Bulletin of the World Health Organization* (2001) **79 (5)**: pp. 455-460.

[11] L. Boulos, M. Prévost, B. Barbeau, J. Coallier, R. Desjardins. Live/Dead® BacLight™: application of a new rapid staining method for direct enumeration of viable and total bacteria in drinking water. *Journal of Microbiological Methods* (1999) **37**: pp. 77-86.

[12] D. B. Kell, A. S. Kaprelyants, D. H. Weichart, C. R. Harwood, M. R. Barer. Viability and activity in readily culturable bacteria: a review and discussion of the practical issues. *Antonie Van Leeuwenhoek* (1998) **73 (2)**: pp. 169-187.

[13] W. G. Pitt, M. O. McBride, J. K. Lunceford, R. J. Roper, R. D. Sagers. Ultrasonic enhancement of antibiotic action on Gram-negative bacteria. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* (1994) **38 (11)**: pp. 2577-2582.

[14] Oliver J.D. The viable but nonculturable state in bacteria. *The Journal of Microbiology* (2005) **43**: pp. 93-100.

[15] B. Baleux, A. Caro, J. Lesne, P. Got, S. Binard, B. Delpeuch. Survival and virulence changes in the VNC state of *Salmonella Typhimurium* in relation to simultaneous UV radiation, salinity and nutrient deprivation exposure. *Oceanologica Acta* (1998) **21**: pp. 939-950.

[16] D. Ercolini, A. La Storia, F. Villani, G. Mauriello. Effect of a bacteriocin-activated polythene film on *Listeria monocytogenes* as evaluated by viable staining and epifluorescence microscopy. *Journal of Applied Microbiology* (2006) **100**: pp. 765-772.

[17] Y. Tsuchiya, J. Ohta, Y. Ishida, H. Morisaki. Cloth colorization caused by microbial biofilm. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* (2008) **64 (2)**: pp. 216-222.

[18] J. T. Trevors. Fluorescent probes for bacterial cytoplasmic membrane research. *Journal of Biochemical and Biophysical Methods* (2003) **57**: pp. 87-103.

[19] T. Ikeda, S. Tazuke, M. Watanabe. Interaction biologically active molecules with phospholipid membranes. *Biochemica et Biophysica Acta* (1983) **735**: pp. 380-386.

[20] T. J. Denich, L. A. Beaudette, H. Lee, J. T. Trevors. Effect of selected environmental and physico-chemical factors on bacterial cytoplasmic membranes. *Journal of Microbiological Methods* (2003) **52**: pp. 149-182.

[21] G. Finne, J. R. Matches. Spin-labelling studies on the lipids psychrophilic, psychotorphic and mesophilic clostridia. *Journal of Bacteriology* (1975) **125**: pp. 211-219.

[22] M. Sinensky. Homeoviscous adaptation - a momeostatic process that regulates the viscosity of membrane lipids in *Escherichia coli*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* (1974) **71 (2)**: pp. 522-525.

[23] R. M. Epand. Lipid polymorphism and protein–lipid interactions. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Reviews on Biomembranes* (1998) **1376 (3)**: pp. 353-368.

[24] M. Badaoui Najjar, M. Chikindas, T. J. Montville. Changes in *Listeria monocytogenes* membrane fluidity in response to temperature stress. *Applied and Environmental Microbiology* (2007) **73**: pp. 6429-6435.

[25] E. S. Giotis, D. A. McDowell, I. S. Blair, B. J. Wilkinson. Role of branched-chain fatty acids in pH stress tolerance in *Listeria monocytogenes*. *Food Microbiology* (2005) **22**: pp. 213-219.

[26] S. K. Mastronicolis, N. Arvanitis, A. Karaliota, C. Litos, G. Stavroulakis, H. Moustaka, A. Tsakirakis, G. Heropoulos. Cold dependence of fatty acid profile of different lipid structures of *Listeria monocytogenes*. *Food Microbiology* (2005) **22**: pp. 213-219.

[27] J. Jasniewski, C. Cailliez-Grimal, M. Younsi, J. B. Millière, A. M. Revol-Junelles. Fluorescence anisotropy analysis of the mechanism of action of mesenterocin 52A: speculations on antimicrobial mechanism. *Applied and Environmental Biotechnology* (2008) **81**: pp. 339-347.

[28] N. C. S. Mykytczuk, J. T. Trevors, L. G. Leduc, G. D. Ferroni. Fluorescence polarization in studies of bacterial cytoplasmic membrane fluidity under environmental stress. *Progress in Biophysics and Molecular Biology* (2007) **95**: pp. 60-82.

[29] W. Dowhan. Molecular basis for membrane phospholipid diversity: why are there so many lipids? *Annuel Review of Biochemistry* (1997) **66**: pp. 199-232.

[30] M. L. Fernandez Murga, D. Bernik, G. Font de Valdez, A. E. Disalvo. Permeability and stability properties of membranes formed by lipids extracted from *Lactobacillus acidophilus* grown at different temperatures. *Archives of Biochemistry and Biophysics* (1999) **364 (1)**: pp. 115-121.

[31] E. Goormaghtigh, V. Raussens, J. M. Ruysschaert. Attenuated total reflection infrared spectroscopy of proteins and lipids in biological membranes. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Reviews on Biomembranes* (1999) **1422 (2)**: pp. 105-185.

[32] I. Adt, D. Toubas, J. M. Pinon, M. Manfait, G. D. Sockalingum. FTIR spectroscopy as a potential tool to analyse structural modificationss during morphogenesis of *Candida albicans*. *Archives of Microbiology* (2006) **185**: pp. 277-285.

[33] M. Grube, J. R. Gapes, K. C. Schuster. Application of quantitative IR spectral analysis of bacterial cells to acetone-butanol-ethanol fermentation monitoring. *Analytica Chemica Acta* (2002) **471**: pp. 127-133.

[34] E. Pedone, S. Bartolucci, M. Rossi, F. M. Pierfederici, A. Scirè, T. Cacciamani, F. Tanfani. Structural and thermal stability analysis of *Escherichia coli* and *Alicyclobacillus acidocaldarius* thioredoxin revealed a molten globule-like state in thermal denaturation pathway of the proteins: an infrared spectroscopic study. *Biochemical Journal* (2003) **373 (3)**: pp. 875-883.

[35] C. Sandt, G. D. Sockalingum, D. Aubert, H. Lepan, C. Lepouse, M. Jaussaud, A. Leon, J. M. Pinon, M. Manfait, D. Toubas. Use of fourier-transform infrared spectroscopy for typing of *Candida albicans* strains isolated in intensive care units. *Journal of Clinical Microbiology* (2003) **41 (3)**: pp. 954-959.

[36] M. Lin, M. Al-Holy, S. S. Chang, Y. Huang, A. G. Cavinato, D. H. Kang, B. A. Rasc. Rapid discrimination of *Alicyclobacillus* strains in apple juice by Fourier transform infrared spectroscopy. *International Journal of Food Microbiology* (2005) **105 (3)**: pp. 369-376.

[37] K. M. Gough, D. Zelinski, R. Wiens, M. Rak, I. M. C. Dixon. Fourier transform infrared evaluation of microscopic scarring in the cardiomyopathic heart: Effect of chronic AT1suppression. *Analytical Biochemistry* (2003) **316**: pp. 232-242.

[38] M. Giudici, R. Pascual, L. de la Canal, K. Pfuller,U. Pfuller, J. Villalain. Interaction of Viscotoxins A3 and B with Membrane Model Systems: Implications to Their Mechanism of Action. *Biophysical Journal* (2003) **85**: pp. 971-981.

[39] P. Hughes, E. Dennis, M. Whitecross, D. Llewellyni, P. Gage. The cytotoxic plant protein, b-purothionin, forms ion channels in lipid membranes. *The Journal of Biological Chemistry* (2000) **275 (2)**: pp. 823-827.

[40] H. H. Mantsch, R. N. McElhaney. Phospholipid phase transitions in model and biological membranes as studied by infrared spectroscopy. *Chemistry and Physics of Lipids* (1991) **57 (2-3)**: pp. 213-226.

[41] S. R. Dennison, L. H.G. Morton, F. Harris, D. A. Phoenix. The impact of membrane lipid composition on antimicrobial function of an α-helical peptide. *Chemistry and Physics of Lipids* (2008) **151 (2)**: pp. 92-102.

[42] N. Papo, Y. Shai. Can we predict biological activity of antimicrobial peptides from their interactions with model phospholipid membranes? *Peptides* (2003) **24 (11)**: pp. 1693-1703.

[43] K. C. Schuster, F. Mertens, J. R. Gapes. FTIR spectroscopy applied to bacterial cells as a novel method for monitoring complex biotechnological processes. *Vibrational Spectroscopy* (1999) **19**: pp. 467-477.

[44] C. Rubio, C. Ott, C. Amiel, I. Dupont-Moral, J. Travert, L. Mariey. Sulfato/thiosulfato reducing bacteria characterization by FT-IR spectroscopy: a new approach to biocorrosion control. *Journal of Microbiological Methods* (2006) **64**: pp. 287-296.

[45] M. Igisu, Y. Uenod, M. Shimojima, S. Nakashima, S. M. Awramik, H. Ohta, S. Maruyama. Micro-FTIR spectroscopic signatures of Bacterial lipids in *Proterozoic microfossils*. *Precambrian Research* (2009) **173**: pp. 19-26.

[46] K. He, S. J. Ludtke, D. L. Worcester, H. W. Huang. Neutron scattering in the plane of membranes: structure of alamethicin pores. *Journal of Biophysic* (1996) **70 (6)**: pp. 2659-2666.

Conclusion générale et perspectives de recherche

Conclusion générale et perspectives de recherche

L'objectif de ce travail de thèse en collaboration avec les différents partenaires du projet Actiprotex, était de mettre au point des textiles antimicrobiens afin de réduire le risque de contaminations notamment en industries agro-alimentaires mais aussi de comprendre les mécanismes d'action des molécules antimicrobiennes vis-à-vis des souches testées.

Dans un premier temps, les « offreurs de technologies » du projet Actiprotex ont proposé différentes solutions pour la fonctionnalisation des textiles en vue de les rendre antimicrobiens. En effet, des méthodologies telles que le sol-gel proposé par le LMGP, le traitement plasma proposé par la société HEF et le foulardage avec l'utilisation d'un brevet par l'IFTH ont retenu l'attention des différents partenaires du projet pour déposer des agents antimicrobiens sur des textiles. L'objectif à terme était d'obtenir un textile antimicrobien dont le traitement peut résister à des lavages industriels. Pour deux de ces techniques (sol-gel et plasma), une application sur un matériau textile était encore peu développée par le LMGP et la société HEF et nécessitait donc une certaine mise au point. Une fois ces textiles fonctionnalisés avec deux types de molécules (argent et PHMB), l'efficacité antimicrobienne de ces derniers a été testée vis-à-vis d'une ou plusieurs souches choisies dans le cadre du projet. Parmi ces souches on retrouve *L. innocua* LRGIA 01 qui a constitué un modèle d'étude notamment pour l'étude du mode d'action du PHMB, *L. monocytogenes* AER 102, *S. aureus* méthi-R nosoco 3011, *P. aeruginosa* ATCC 15742 et *E. coli* XL1 blue. L'activité antimicrobienne a été mesurée sur la base de la norme ISO 20743-2005 qui a été adapté par le LRGIA dans l'objectif d'obtenir des informations sur l'activité antimicrobienne au cours du temps.

Les mesures d'activités antimicrobiennes ont permis de mettre en évidence une activité marquée de textiles traités par méthodologie plasma à l'argent que ce soit lorsque l'argent est déposé en simple couche ou déposé avec des couches d'encapsulation au dessus de la couche « antimicrobienne ». Les analyses de surface ont permis de détecter l'argent en grande quantité à la surface des textiles traités par simple couche d'argent et en plus faible quantité à la surface des textiles traités avec une couche d'encapsulation. L'argent a également été utilisé pour fonctionnaliser des textiles par voie sol-gel. Ces textiles ont présenté une très bonne efficacité antimicrobienne vis-à-vis de *L. innocua* LRGIA 01 et *E. coli* XL1 blue.

Des essais ont montré que le traitement antimicrobien à l'argent réalisé par plasma ne résistait pas aux lavages même ménagers et qu'il était nécessaire de pouvoir étudier la fonctionnalisation des textiles par plasma pour une meilleure tenue au lavage. En effet, une meilleure accroche du traitement devrait être obtenue pour pouvoir utiliser ces textiles en industries agro-alimentaires. Pour favoriser cette accroche du traitement antimicrobien par méthodologies différentes approches peuvent être proposées. La matrice SiOCH dans laquelle l'argent est déposé à la surface des textiles par plasma pourrait être notamment modifiée en adaptant les conditions du procédé PECVD afin de la rendre plus résistante au lavage. Une autre solution serait d'employer une matrice différente avec des propriétés hydrophobes pour éviter son atteinte lors des lavages. D'autre part, le fait que le traitement ne résiste pas au lavage indique que ce dernier doit probablement diffuser lors d'un contact avec le milieu extérieur. En effet, si le traitement est peu résistant aux conditions telles qu'un lavage, on peut supposer que l'argent, qui constitue la base du traitement, est capable de diffuser à l'extérieur du textile notamment lorsqu'il est en contact avec l'eau.

L'argent sous forme métallique est inactif, cependant, lorsqu'il est oxydé notamment au contact d'un environnement humide, la dissolution de l'oxyde d'argent (AgO) formé entraine la libération d'ions Ag^+. Il faut également noter que l'activité antibactérienne de l'argent dépend de la quantité d'ions Ag^+ présents dans le milieu et disponibles pour interférer avec les micro-organismes. En effet, de par sa forte réactivité, l'argent peut interagir avec les protéines et les sels du milieu suspendant (ex : formation de AgCl, précipité très peu soluble), ce qui minimise la quantité active vis-à-vis des cellules [1]. Dans notre cas, la diffusion des ions Ag^+ peut être expliquée lors du dépôt des micro-organismes sur le textile qui sont en solution dans un milieu de culture liquide. Lors de ce dépôt, l'argent présent sous forme métallique est probablement oxydé et entraîne la libération d'ions Ag^+. Il existe probablement un équilibre entre les formes Ag^0 et Ag^+ au sein du milieu. Cette diffusion pourrait expliquer en partie l'activité antimicrobienne mais peut poser des problèmes de cytotoxicité lors de son utilisation. En effet, à de fortes concentrations (entre 5 et 10 µg/mL de nanoparticules d'argent de 15 nm de diamètre), Braydich-Stolle *et al.* [2] ont mis en évidence la toxicité de nanoparticules d'argent sur une lignée de cellules (cellules souches de la spermatogénèse). Il est donc indispensable de vérifier l'innocuité des traitements antimicrobiens avant leur utilisation en conditions réelles. Des tests de cytotoxicité sur cellules devraient donc être mis en place. On peut par exemple citer des tests basés sur la culture de cellules *in vitro*, des tests

d'évaluation du pouvoir mutagène par le test de Ames, des test d'irritation primaire cutanée ou encore la recherche du pouvoir sensibilisant chez le cobaye-test de Buëhler [3].

Les textiles fonctionnalisés à base d'argent se sont avérés être plus efficaces vis-à-vis d'*E. coli* que vis-à-vis de *L. innocua*. Cette différence de spectre d'action peut être expliquée en partie par la nature de la membrane des bactéries à Gram négatif par rapport à la membrane des bactéries à Gram positif. En effet, les bactéries à Gram positif possèdent une paroi plus épaisse avec une couche de peptidoglycane plus épaisse. Ainsi, l'argent sous forme d'ions Ag^+ pourrait avoir plus de difficulté à traverser la paroi des bactéries à Gram positif entraînant une moins bonne efficacité vis-à-vis de ces bactéries. Le mécanisme d'action des ions Ag^+ est encore mal connu mais il agirait au niveau de la membrane en perturbant les échanges au niveau de cette dernière et dans certains cas serait capable de traverser la membrane pour interagir avec les groupements thiols des protéines entraînant une inhibition de l'action de certaines enzymes.

Il faut de plus noter que les textiles étudiés dans le cadre du projet Actiprotex par traitement plasma et par sol-gel contiennent des nanoparticules d'argent dont l'effet sur la santé humaine est encore très mal connu. Parce qu'il possède une forte activité antimicrobienne, l'argent sous forme de nanoparticules est connu pour être fixé notamment sur des textiles pour traiter les brûlures mais aussi sur des implants. L'emploi de ces nanoparticules génère une certaine méfiance car cela pose le problème d'une toxicité potentiellement accrue envers le corps humain. En effet, le corps humain possède différentes interfaces telles que les muqueuses ou la peau qui sont le lieu d'échange avec l'extérieur mais qui peuvent également constituer des voies de circulation des nanoparticules d'argent. La revue de l'Institut Syndical Européen [4] fait l'état des lieux des différentes utilisations des nanoparticules avec notamment un effet néfaste sur les personnes en contact avec ces dernières. Comme pour le traitement plasma, les textiles traités par méthodologie sol-gel doivent donc être soumis à des contrôles rigoureux dans l'objectif de préserver la santé de l'utilisateur mais aussi l'environnement. En effet, le règlement concernant l'enregistrement, l'évaluation et l'autorisation des substances chimiques (REACH) s'appliquerait à toutes les substances chimiques y compris les nanoparticules, qui sont constituées d'éléments et de composés chimiques et par conséquent soumises à la même réglementation que les produits chimiques en général. De plus l'utilisation de l'argent de façon répétée peut engendrer des résistances des bactéries visées. Certaines études récentes montrent l'existence de souches bactériennes résistantes à l'argent [5, 6]. Ce phénomène de

résistance peut être intrinsèque, c'est-à- dire lié aux gènes présents dans le génome du micro-organisme ou peut être acquis par l'intermédiaire de plasmides ou de transposons. Certains micro-organismes sont également capables de mettre en place une réponse adaptative après avoir été cultivés en présence d'une concentration sous-létale d'argent et deviennent alors tolérants à l'argent [7]. En effet, il a été montré que certaines souches possédaient des résistances aux métaux comme l'argent notamment portées par des plasmides et pouvaient être à l'origine de contaminations même une fois le traitement effectué [8]. Le phénomène de résistance doit donc être pris en compte pour l'utilisation finale du produit. Il faut cependant noter que la résistance aux antibiotiques est un phénomène plus fréquent que la résistance aux métaux car le nombre de cibles touchées lors de l'action de l'argent par exemple est beaucoup plus important que dans le cas d'un antibiotique.

Pour les textiles fonctionnalisés au PHMB, il a été montré que 2 souches testées sur 3 (*L. innocua* LRGIA 01 et *S. aureus* méthi-R nosoco 3011) étaient sensibles aux textiles traités par cet agent antimicrobien même après 10 lavages industriels dans les conditions retenues dans cette étude. En revanche, *P. aeruginosa* ATCC 15742 s'est avérée être plus résistante que les 2 autres souches et aucune activité antimicrobienne n'a pu être mise en évidence. Ces résultats sont concordants avec les mesures des CMI obtenues qui montraient une plus forte résistance de *P. aeruginosa* ATCC 15742 avec une CMI de 125 mg/L contre 20 mg/L pour *L. innocua* LRGIA 01 et 12,5 mg/L pour *S. aureus* méthi-R nosoco 3011. Plusieurs auteurs ont mis en évidence cette plus forte résistance de *Pseudomonas aeruginosa* [9]. En effet, dans les mêmes conditions d'applications, il faudrait 32 mg/L pour tuer 90 % de la population de *P. aeruginosa* contre 2 mg/L pour *E. coli* soit une concentration 10 fois plus faible [10]. Cette plus forte résistance de cette souche bactérienne pourrait être due à une répulsion des molécules de PHMB lors du contact entre la molécule antimicrobienne et la membrane de *P. aeruginosa*. En effet, le contact entre la membrane des cellules bactériennes et un agent antimicrobien peut s'accompagner d'une évolution de la composition lipidique membranaire des bactéries à Gram négatif [11]. Ces variations de composition peuvent ainsi entraîner un changement au niveau des propriétés de surface des micro-organismes (hydrophobie ou charge de surface) [12] entraînant une modification des interactions entre cellules bactériennes et agents antimicrobiens. Les résultats de l'hydrophobie de surface mis en évidence par la technique de MATS peuvent donc être utilisés pour expliquer la plus forte résistance de *P. aeruginosa* au PHMB, cette souche étant plutôt hydrophile. Le PHMB étant une molécule cationique, elle va interagir avec les groupements anioniques de la membrane

externe des bactéries à Gram négatif, principalement avec les phospholipides acides [13] et par conséquent, une modification de la composition lipidique de la membrane externe pourra entraîner une évolution de l'adsorption des molécules de PHMB à la surface de bactéries. Il apparaît ici que les cellules plutôt hydrophiles comme *P. aeruginosa* sont plus résistantes, résistance qui pourrait être due à de possibles interactions répulsives de type électrostatiques à proximité des sites d'adsorption du PHMB.

Les suivis de croissance de micro-organismes sur des textiles permettent la mesure d'activités antimicrobiennes mais ne prennent pas en compte les éventuelles cellules viables mais non cultivables. En effet, les techniques utilisées pour la mesure d'activités antimicrobiennes se basent sur des méthodes de microbiologie « pasteurienne » qui ne prennent en compte que des cellules capables de se développer sur des milieux de culture gélosés et possédant donc les activités métaboliques nécessaires à cela. C'est dans le but de détecter la présence d'éventuelles cellules viables mais non cultivables (VNC) que la microscopie à épifluorescence a été utilisée avec des marqueurs fluorescents de viabilité (kit Live/Dead® Baclight™). Les cellules VNC sont des cellules vivantes mais ayant perdu les capacités de se développer sur un milieu de culture. Ces cellules se trouvent soit dans un état de type latence, soit en transition vers la mort cellulaire. Dans certaines conditions de culture (pH, présence de nutriments, température favorable…) ces cellules sont capables de se multiplier de nouveau et peuvent alors représenter un danger potentiel de contamination. La méthode de microscopie à épifluorescence a été employée pour l'évaluation de l'état physiologique des cellules de *L. innocua* LRGIA 01 en milieu liquide après contact avec le PHMB à 3 concentrations (5, 20 et 40 mg/L) et pour l'évaluation de l'état physiologique des cellules de *L. innocua* LRGIA 01, *S. aureus* méthi-R nosoco 3011 et *P. aeruginosa* ATCC 15742 après contact avec un textile traité au PHMB et lavé une fois de façon industrielle avant son utilisation. Les tests en milieu liquide ont montré l'apparition de cellules non viables lors du contact de *L. innocua* LRGIA 01 même avec une concentration en PHMB inférieure à sa CMI (5mg/L) après 24 h de contact. Pour la concentration égale à sa CMI (20 mg/L), des cellules non viables sont observées dès la mise en contact des cellules avec l'agent antimicrobien et après 24 h de contact, seules des cellules non viables sont observées. Et enfin pour une concentration de 40 mg/L aucune cellule viable n'a pu être observée. Les tests après contact des cellules de *L. innocua* LRGIA 01, *S. aureus* méthi-R nosoco 3011 et *P. aeruginosa* ATCC 15742 avec les textiles traités au PHMB ont mis en évidence la formation de cellules viables mais non cultivables pour 2 souches testées sur 3 (*L. innocua* LRGIA 01 et *S. aureus* méthi-R nosoco

3011). Ces cellules apparaissent viables au microscope mais ne sont pas capables de se multiplier sur milieu gélosé. Aucune revivification de ces cellules n'a pu être mise en évidence, ce qui peut être expliqué par différents facteurs comme par exemple que les conditions dans lesquelles elles ont été placées n'ont pas permis à ces cellules de se multiplier de nouveau ou qu'il s'agit de cellules en transition vers un état de mort cellulaire. Il nous semble important de poursuivre ces travaux et d'évaluer l'impact des étapes de revivification sur les résultats de dénombrements de flore viable cultivable « ayant résisté à l'adhésion et à l'agent antimicrobien sur textile ». Par ailleurs, même si la microscopie à épifluorescence est simple et rapide à mettre en œuvre, il serait intéressant de compléter ces observations par de la microscopie confocale laser qui permettrait ainsi d'améliorer la compréhension des mécanismes d'action des traitements antimicrobiens sur les micro-organismes fixés.

En parallèle et pour comprendre le mode d'action du PHMB vis-à-vis d'une des souches étudiées (*L. innocua* LRGIA 01), une étude de la fluidité de la membrane de cette souche à l'aide de la spectrofluorimétrie en utilisant des marqueurs fluorescents (DPH et TMA-DPH) et une étude des composants de la membrane par spectroscopie IRTF ont été faites. La membrane étant la cible d'action principale de nombreux agents antimicrobiens et notamment du PHMB, ces études ont été réalisées dans le but de préciser le mode d'action du PHMB sur *L. innocua* LRGIA 01. Ces deux méthodes ont permis de proposer un mode d'action du PHMB de type « carpet » avec dans un premier temps, une fixation des molécules de PHMB à la surface de la membrane de *L. innocua* LRGIA 01 mise en évidence par la mesure de la fluidité de la membrane. En effet, l'utilisation d'un marqueur de fluorescence enchâssé dans la membrane des cellules au niveau des têtes lipidiques (TMA-DPH) a permis d'observer une perturbation de l'anisotropie de fluorescence de ce dernier permettant de proposer que le PHMB a probablement agi en surface des cellules dans les premières heures de contact (environ 2 h). Dans un second temps, le PHMB provoquerait des changements de conformation de la membrane entraînant des différences au niveau du ratio CH_2/CH_3 mis en évidence par la spectroscopie IRTF (après 4 h de contact). Enfin, la déstabilisation de la membrane entraînerait une fuite des composants cellulaires conduisant à la mort. Cette étape a pu être confirmée par la microscopie à épifluorescence avec l'entrée de l'iodure de propidium et la coloration rouge des cellules dès 4 h de contact et jusqu'à la mort des cellules.

A court terme, les perspectives du projet Actiprotex seraient de sélectionner un textile qui s'est avéré être efficace vis-à-vis de plusieurs souches bactériennes (Gram + et Gram -)

possédant une bonne tenue au lavage (au minimum 10 lavages industriels) : il faudrait alors réaliser les tests de cytotoxicité proposés précédemment dans le but de valider son utilisation. Pour les textiles fonctionnalisés par plasma et sol-gel à l'argent ainsi que pour le textile fonctionnalisé par foulardage au PHMB, il faudrait également doser les ions Ag^+ ou les autres formes de l'argent ou le PHMB après trempage des textiles dans une solution aqueuse pour évaluer l'hypothèse de diffusion des agents antimicrobiens dans l'eau et relier ceci à la résistance au lavage. Le dosage des ions Ag^+ et/ou atomes d'argent pourrait notamment se faire par analyse chimique multi-élémentaire par ICP-MS (spectrométrie de masse à plasma à couplage inductif) [1].

A plus long terme, il serait également intéressant de pouvoir préciser le mode d'action de l'argent et du PHMB vis-à-vis des souches bactériennes Gram positives et Gram négatives sensibles à ces composés. Les 3 méthodes utilisées dans le cadre de cette étude se sont avérées être complémentaires et il serait donc intéressant de poursuivre l'étude du mode d'action du PHMB avec d'autres souches et d'autres marqueurs notamment des marqueurs de diffusion des ions à travers la membrane. Comme cela a été décrit dans l'étude bibliographique, il existe différents marqueurs que ce soit en microscopie à épifluorescence ou en spectrofluorimétrie. Pour la microscopie à épifluorescence différents marqueurs peuvent être utilisés pour suivre différentes activités métaboliques [14]. On citera :

- le CTC pour mesurer l'activité respiratoire et ainsi évaluer si le PHMB possède une action sur les enzymes de la chaîne respiratoire ;
- la rhodamine pour évaluer l'activité des pompes membranaires dans l'objectif d'évaluer si une inactivation des pompes à efflux est provoquée par la molécule de PHMB.

Pour la spectrofluorimétrie [14], on citera le DiSC3 (Iodure de 3,3'-dipropyl thiacarbocyanine) et le DiBaC4 (Bis-(acide 1,3-dibutybarbiturique) triméthine oxonol) pour évaluer respectivement l'action du PHMB sur la perméabilité membranaire ou le changement de potentiel membranaire. Tous ces marqueurs pourraient être utilisés afin de préciser les mécanismes d'action d'agents antimicrobiens notamment l'argent et le PHMB. L'utilisation de ces méthodes en parallèle permettrait de compléter les informations de chacune afin de combler les éventuels manques.

Pour une application finale en tant que vêtements de protection en industries agro-alimentaires, les paramètres suivants devront être pris en compte :

- la vérification de la non-cytotoxicité de l'agent antimicrobien vis-à-vis de l'utilisateur final par les tests cités précédemment ;

- la vérification que le rejet de cet agent antimicrobien notamment lors des lavages (effluents) pour l'entretien des textiles n'entraîne pas d'effets néfastes sur l'environnement de type pollution ou diffusion d'une trop grande quantité d'agent antimicrobien. La réglementation préconise pour le rejet des composés à base d'argent pour le secteur hospitalier un rejet inférieur à 50 mg/m^2 de surface traitée. Le PHMB pose moins de problème au niveau des rejets car il est également utilisé pour le traitement des piscines et est donc déjà utilisé de façon courante ;
- la réglementation au niveau des aliments (REACH pour l'utilisation de substances chimiques) notamment avec une utilisation possible de cet agent antimicrobien au sein d'industries agro-alimentaires ou le cas échéant la preuve qu'il n'y a pas de diffusion de l'agent antimicrobien dans les matières premières manipulées ou dans le produit fini lors de la manipulation de ces derniers par les opérateurs.

Références bibliographiques

[1] C. Saulou. Evaluation des propriétés anti-adhésives et biocides de films nanocomposites avec inclusions d'argent,déposés sur acier inoxydable par procédé plasma . *Thèse de doctorat de l'Université de Toulouse* (2009).

[2] L. Braydich-Stolle, S. Hussain, J. J. Schlager, M. C. Hofmann. *In vitro* cytotoxicity of nanoparticles in mammalian germline stem cells. *Toxicological Sciences* (2005) **88**: pp. 412-419.

[3] http://www.materiatech-carma.net/html/pdf/clubmat29_BIOMATECH.pdf. *consulté le 5 décembre 2010.*.

[4] Nanotechnologies : espoirs et incertitudes autour d'une nouvelle révolution. *Le Magazine del'Institut Syndical Européen*. **2éme semestre 2009**.

[5] A. B. G. Lansdown. Silver I: its antibacterial properties and mechanism of action. *Journal of Wounds Care* (2002) **11 (4)**: pp. 125-130.

[6] S. Silver, L. T. Phung, G. Silver. Silver as biocides in burn and wound dressings and bacterial resistance to silver compounds. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology* (2006) **33**: pp. 627-634.

[7] S. L. Percival, P.G. Bowler, D. Russell. Bacterial resistance to silver in wound care. *Journal of Hospital Infection* (2005) **60**: pp. 1-7.

[8] G. L. McHugh, R. C. Moellering, C. C. Hopkins, M. N. Swartz. *Salmonella typhimurium* resistant to silver nitrate, chloramphenicol, and ampicillin. *Lancet* (1975) **1 (7901)**: pp. 235-240.

[9] B. Thomas, D. J. Stickler. Chlorhexidine resistance and the lipids of *Providencia stuartii*. *Microbios* (1979) **24**: pp. 141-150.

[10] T. J. Marrie, J. W. Costerton. Prolonged survival of *Serratia marcescens* in chlorhexidine. *Applied and Environmental Microbiology* (1981) **42 (6)**: pp. 1093-1102.

[11] L. Méchin, F. Dubois-Brissonnet, B. Heyd, J. Y. Leveau. Adaptation of *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 15442 to didecyldimethylammonium bromide induces changes in membrane fatty acid composition and in resistance of cells. *Journal of Applied Microbiology* (1999) **86 (5)**: pp. 859-866.

[12] M. F. Loughlin, M. V. Jones, P. A. Lambert. *Pseudomonas aeruginosa* cells adapted to benzalkonium chloride show resistance to other membrane-active agents but not to clinically relevant antibiotics . *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* (2002) **49 (4)**: pp. 631-639.

[13] P. Gilbert, L. Moore. Cationic antiseptics: diversity of action under a common epithet. *Journal of Applied Microbiolgy* (2005) **99**: pp. 703-715.

[14] J. T. Trevors. Fluorescent probes for bacterial cytoplasmic membrane research. *Journal of Biochemical and Biophysical Methods* (2003) **57**: pp. 87-103.

ANNEXE 1

Milieu TSA, Tryptone Soy Agar

Domaine d'utilisation :

C'est un milieu de culture d'usage universel pour la culture et l'isolement des micro-organismes non exigeants. Il convient à la culture des bactéries aérobies et anaérobies.

Composition :

Peptone pancréatique de caséine…….. 15 g/L
Peptone de soja ……..5 g/L
Chlorure de sodium ……5 g/L
Agar……15 g/L
pH. ……...7,3 ± 0,2 (à 25°C)
Eau ……..1L

Préparation :

Mettre en solution 30g de milieu déshydraté dans 1L d'eau distillée ou déminéralisée.
Mélanger soigneusement .Chauffer jusqu'à dissolution complète. Répartir en tubes ou en flacons. Stériliser à l'autoclave à 121°C pendant 15mn.

Conservation :

Tenir le flacon soigneusement fermé entre +2°C et +25°C.

Milieu TSB, Tryptone Soy Broth

Domaine d'utilisation :

C'est un milieu de culture d'usage universel pour la culture de nombreux microorganismes non exigeants. Il convient à la culture des bactéries aérobies.

Composition :

Peptone pancréatique de caséine ……....17 g/L
Peptone de soya…….. 3 g/L
Chlorure de sodium…….5 g/L
Phosphate de potassium, dibasique, anhydre...……...2,5 g/L
Glucose……2,5 g/L
pH……7.3 ± 0.2 (à 25% °C)
Eau ……..1L

Préparation :

Mettre en solution 30g de milieu déshydraté dans 1L d'eau distillée ou déminéralisée.
Agiter lentement jusqu'à dissolution complète.
Répartir en tube ou en flacons.
Stériliser à l'autoclave à 121°C pendant 15mn.
Ce milieu a également été préparé dilué au 1/20^{éme}.

Conservation :

Tenir le flacon soigneusement fermé entre +2°C et +25°C.

Milieu BCC, Bouillon Cœur - Cervelle :

Domaine d'utilisation :

Le milieu BCC est utilisé pour la culture d'un grand nombre de microorganismes aérobies et anaérobies .Il est adapté pour la mise en évidence de la coagulase chez les staphylocoques et pour la culture de germes exigeants (streptocoque*s* par exemple).

Composition :

Extrait de cœur –cervelle …….17,5 g/L
Peptone pancréatique de gélatine……..10,5g/L
Chlorure de sodium ……...5 g/L
Phosphate disodique ……..2,5g/L
Glucose……...2 g/L
Ph …… 7,3 ± 0.2 (à 25°C)
Eau……...1L

Préparation :

Mettre en solution 37g de milieu déshydraté dans 1L d'eau distillée ou déminéralisée.
Agiter lentement, jusqu'à dissolution complète.
Répartir en tubes ou en flacons.
Stériliser à l'autoclave à 121°C pendant 15 minutes.

Conservation :

Tenir le flacon soigneusement fermé entre +2°C et + 30°C
Usage *in vitro*

Milieu ringer au 1/4 :

Domaine d'utilisation :

Ce milieu est très souvent utilisé pour réaliser la dilution décimale lors des dénombrements.

Composition :

Chlorure de sodium……..…….17,5 g/L
Chlorure de potassium ……..10 g/L
Chlorure de calcium ……..5 g/L
Hydrogène de sodium…….2,5 g/L
Eau ……1L

Préparation :

Mettre un comprimé dans 500 mL d'eau distillée ou déminéralisée.
Agiter lentement, jusqu'à dissolution complète.
Répartir en tubes ou en flacons.
Stériliser à l'autoclave à 121°C pendant 15 minutes.

Conservation :

Tenir le flacon soigneusement fermé entre +2°C et +20°C.
Usage *in vitro*

ANNEXE 2

Food Control 21 (2010) 505–512

Contents lists available at ScienceDirect

Food Control

journal homepage: www.elsevier.com/locate/foodcont

Anti-*Listeria innocua* activity of silver functionalised textile prepared with plasma technology

Elise Chadeau [a], Nadia Oulahal [a,*], Laurent Dubost [b], Frédéric Favergeon [b], Pascal Degraeve [a]

[a] University of Lyon, Université Lyon 1, Laboratoire de Recherche en Génie Industriel Alimentaire (LRGIA) E.A. n° 3733, Rue Henri de Boissieu, F 01060 Bourg en Bresse, France
[b] HEF R&D Rue Benoît Fourneyron, F 42166 Andrézieux Bouthéon, France

ARTICLE INFO

Article history:
Received 4 March 2009
Received in revised form 20 July 2009
Accepted 24 July 2009

Keywords:
Silver antimicrobial textile
Plasma technology
Listeria innocua

ABSTRACT

Thin layers of silver particles (10–100 Å) were deposited by plasma technology on textiles mainly composed with cotton or polyester in order to obtain antimicrobial properties. The antimicrobial activity against a *Listeria innocua* strain (LRGIA 01) of these textiles was assessed following a protocol based on the ISO 20743-2005 standard. The number of cultivable bacteria on textiles was then monitored for 24 h. The microbial population after 24 h at 30 °C attained 10^7 CFU g^{-1} on control textiles while it did not exceed 10^3 CFU g^{-1} on plasma-treated textile. All plasma-treated with silver textiles were anti-*Listeria* (up to 7 log CFU g^{-1} decimal reductions of *L. innocua* populations) and this observation was confirmed by scanning electron microscopy. These textiles could thus have potential applications in food-processing industry to control cross-contaminations by *L. monocytogenes*.

© 2009 Elsevier Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

Textile materials provide an excellent environment for microorganisms to grow, because of their large surface area and ability to retain moisture. Textiles are thus potential carriers of microorganisms, which can cause several defects such as deterioration of strength and quality or staining of textiles, odour generation and health concerns caused by microorganisms.

Textiles can thus enhance cross-contamination by pathogenic microorganisms in environments such as home, food-processing industry and hospitals. Like a house, a hospital or a food industry contains an immense amount of textiles with the added threat of high volumes of traffic. Because of the incidence of nosocomial infections in hospital and the constant flow of people with infectious diseases, many researchers have focused on creating finishes specifically intended for hospital use. Textiles present in food-processing industry such as protective clothing of workers or air filters are also responsible for cross-contaminations. Food represents the major source of *Listeria monocytogenes* infections, the causative agent of listeriosis in humans and animals. This bacterium has the ability to form biofilms and many types of food have been implicated in outbreaks of listeriosis. It has been isolated from a range of sources like vegetables, sea, meat and dairy products, processed foods and others. Beresford, Andrew, and Shama (2001) have observed that *L. monocytogenes* can adhere to many materials and that this adhesion was time-dependent.

Therefore, there is a great demand in food industry for antimicrobial finishes of textiles that could prevent adhesion of pathogenic microorganisms such as *Listeria monocytogenes*. Antimicrobial properties can be conferred to textile materials by chemically or physically incorporating antimicrobial agents onto fibres or fabrics. Silver is a well-known antimicrobial agent and silver-loaded fibres present unique properties (high thermal stability and broad and long-term activity) which differentiate them from other antimicrobial additives (Kostic, Radic, Obradovic, & Skundric, 2008). Moreover, this is one of few antimicrobials which possess both antibacterial and antifungal properties and bacteria do not develop their resistance to silver, as with antibiotics.

The development of new materials with particular functions that can provide healthy benefits to people received a lot of attention in recent years (Lei Qian, 2003; Lin, Winkelman, Worley, Broughton, & Williams, 2001; Sun, 2002). Utilisation of antimicrobial textiles in healthcare facilities is considered to be a potential solution: antimicrobials agents, such as silver, polyhexamethylene biguanide or chitosan are sometimes incorporated into dressings to control contamination (Canal, Gaboriau, Villeger, Cvelbar, & Ricard, 2008). In food industry, textiles can be used for air filtration filters or staff cloth. Furthermore these textiles are subjected to frequent washing, rubbing and sweating during their use and the requirement of durability is a very important parameter.

Various methods, depending on the active agent and the fibre types, have been developed or are under development to confer antimicrobial activity to textiles. Many methods have been reported, such as chemical binding of heterocyclic N halamine functional group to the Nylon 66 (Lin, Winkelman, Worley, Broughton,

* Corresponding author. Tel.: +33 0 4 74 47 21 41; fax: +33 0 4 74 45 52 53.
E-mail address: nadia.oulahal@iut.univ-lyon1.fr (N. Oulahal).

0956-7135/$ - see front matter © 2009 Elsevier Ltd. All rights reserved.
doi:10.1016/j.foodcont.2009.07.013

& Williams, 2001), grafting of a precursor of halamine on cellulose-containing fabrics (Lei Qian, 2003), continuous finishing process (polymerization grafting) to graft an hydantoin-containing monomer (Sun, 2002), or immobilisation of nanoparticles on textiles fibres (Dubas, Kumlangdudsana, & Potiyaraj, 2006). Authors have demonstrated that it is possible to coat silk or nylon fibres with silver nanoparticles by layer-by-layer method. The quantity of nanoparticles was controlled by the number of deposition cycles and the antibacterial activity was demonstrated (Dubas et al., 2006).

Conventional manufacture process to deposit silver produces large quantities of environmentally unfriendly waste water. A good alternative could be the plasma technology because magnetron sputter coating technology has such advantages (Wang et al., 2007) like having stronger binding between the film and its substrate and no potentially polluting waste products. The objective of plasma is the sputtering in a vacuum chamber used to deposit very thin films (few nanometers to several micrometers width) on substrates. It is performed by applying a high voltage across a low-pressure gas (usually argon) to create "plasma", which consists of electrons and gas ions in a high-energy state. The deposition of silver by plasma methodology has not been employed frequently in the field of textiles up to now.

The antimicrobial properties of silver compounds and silver ions have been historically recognized and applied in a wide range of applications from disinfecting medical devices and home appliance to water treatment (Li et al., 2008; Silver, Phung, & Silver, 2006). Silver can be used under different forms (ionic, metallic, nanoparticles, silver nitrate, silver sulfadiazine) but its mechanism of toxicity is still only partially understood (Rai, Yadav, & Gade, 2009). Silver ions interact with sulfhydryl groups in proteins, resulting in activation of respiratory enzymes and leading to the production of reactive oxygen species (Kumar, Howdle, & Münstedt, 2005; Matsumura, Yoshikata, Kunisaki, & Tsuchido, 2003). It was also observed that silver ions prevent DNA from unwinding, an essential step for cellular replication and affect the structure and permeability of the cell membrane (Batarseh, 2004). In the study of Feng et al. (2000), a condensed form of DNA appeared (preferential binding of the silver's atoms on DNA) during contact between silver and *Escherichia coli* ATCC 2382 cells (what made them lose their capacity to replicate). In the study of Berger, Spadaro, Chapin, and Becker (1976), the bacteriostatic and the bactericidal concentrations of electrically generated silver against 16 clinical isolates and standard test microorganisms were determined. The data indicated that all microorganisms were inhibited by 1.25 $\mu g\ mL^{-1}$ of silver or less and killed at a level of 10.05 $\mu g\ mL^{-1}$ or less. *E. coli* grown in trypticase soy broth was killed at a silver ion concentration of 39 $\mu g\ mL^{-1}$. The minimal bactericidal concentration (MBC) of a silver-zeolite powder was determined to be about 3.13 $mg\ mL^{-1}$ for *E. coli* (grown in Luria–Bertani Broth), *Staphylococcus aureus*, and *Pseudomonas aeruginosa*. Minimum inhibitory concentrations (MIC) were not determined since the zeolite powder made broth suspensions highly turbid (Cowan, Abshire, Houk, & Evans, 2003). In the study of Batarseh (2004), silver's activity of silver chelates or silver ions was determined using *P. aeruginosa* ATCC 15442 by the determination of MIC via a broth macrodilution procedure. In this case, it was found that the chelated silver efficacy is almost one order of magnitude higher than the efficacy of free silver.

The main objective of this study was to develop antimicrobial functionalised textiles by an innovative method using plasma technology and to investigate their antimicrobial activity against *L. innocua* (chosen because of its similarity to *L. monocytogenes*) deposited on treated textiles. Silver was used to create thin films on different textiles. After *L. innocua* cells deposition, textiles were incubated at 30 °C under saturating conditions of humidity in air in order to mimic conditions favouring bacterial growth prevailing in food industry.

2. Materials and methods

2.1. Textile samples and functionalisation with plasma technology

White control textiles samples that were not modified were composed either of 65% cotton/35% polyester or of 65% polyester/35% cotton.

Plasma-treated textile samples obtained with magnetron sputtering technology were provided by HEF R&D. During sputtering, energized plasma ions struck a "target" (in this case silver), composed of the desired coating material, and caused atoms from that target to be ejected with enough energy to travel to, and bind with, the substrate (Canal et al., 2008).

The stainless steel vacuum chamber used to deposit the thin film materials had a volume of 350 L. A base pressure of 1×10^{-6} mbar was obtained with a turbo-molecular pump of 1800 $L\ s^{-1}$. A silver target 15 cm × 40 cm was installed on a cathode in front of a magnetic field in order to enhance the sputtering rate. The magnetic field built up by the magnetron (dot lines in Fig. 1) maintains a higher concentration of electrons in front of the target so that a higher plasma density was generated. The textile substrates were attached on an aluminium barrel (50 cm in diameter), rotating at a speed of 4 rpm located 100 mm away from the target.

The vacuum chamber was fed with a dynamic flow rate of argon at a pressure of 2×10^{-3} mbar at room temperature. An electrical discharge was generated by applying a direct current power on the cathode. The ions accelerated in the plasma sheath gained enough energy to sputter silver atoms from the target. A thin film of silver was deposited on the surface of the textile fibres. Film thicknesses from 10 to 400 Å have been deposited based on an average deposition rate of 10 Å per revolution.

Colour measurements were made using a colorimeter (Minolta CR-321 ChromaMeter; Minolta, Osaka, Japan) according to the CIE $L^*a^*b^*$ colour system. Three measurements were made for each sample of textile. The colorimeter was calibrated according to the manufacturer's instructions, before each measurement period, using the calibration cap (CR-A43; Minolta, Osaka, Japan) supplied by the manufacturer. The colour differences between treated and untreated samples were obtained using the following relationship:

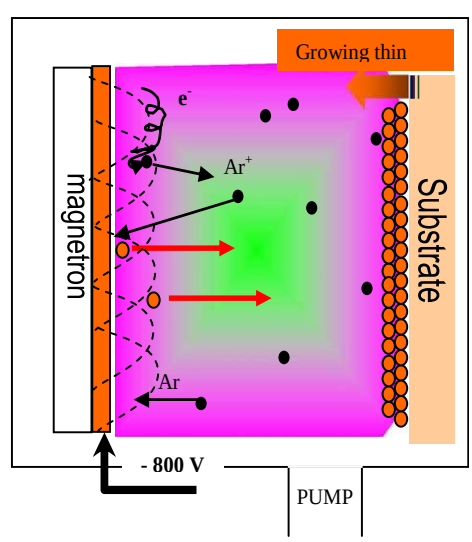


Fig. 1. Vacuum deposition set up.

$$\Delta E = ((\Delta L)^2 + (\Delta a)^2 + (\Delta b)^2)^{1/2}$$

where $\Delta L = L_{treated} - L_{untreated}$; $\Delta a = a_{treated} - a_{untreated}$; $\Delta b = b_{treated} - b_{untreated}$; '*L*' corresponds to lightness; '*a*' and '*b*' measure redness or greenness and yellowness or blueness, respectively.

2.2. Bacterial challenge: strain and determination of antibacterial activity

A protocol based on the ISO 20743-2005 (Anonymous, 2005) standard for the determination of the antibacterial activity of textile has been defined.

L. innocua LRGIA 01 strain was employed for testing different antimicrobial textiles. This strain was isolated from environment and chosen for its similarity to *Listeria monocytogenes*. *L. innocua* LRGIA 01 stock culture was kept at −20 °C in a 15% (v/v) glycerol solution.

One mL of the stock culture was transferred to 20 mL of Brain Heart Infusion media (BHI) and incubated at 30 °C for 24 h. Before each assay, bacteria were plated on trypticase soy agar (TSA) and incubated at 30 °C for 24 h before being used to inoculate trypticase soy broth (TSB). This inoculated broth culture was then incubated at 30 °C for 24 h. The turbidity was measured at 630 nm with a Camspec M 230/330 spectrophotometer (Grosseron, Saint-Herblain, France). To get the standardized density of bacteria, the chilled culture was diluted with TSB 1:20 to a pre-determined turbidity to provide approximately 10^5 CFU mL^{-1}. Thus, this standardized density of bacteria (10^5 CFU mL^{-1}) was used for the challenge inoculation.

Four pieces of textiles (of 0.1 g each) were placed on a system of two Petri dishes containing sterile distilled water in order to have saturating conditions of humidity. 200 μL of the 10^5 CFU mL^{-1} suspension were deposited on the four textiles. Immediately after inoculation, two pieces were removed for the first enumeration of bacteria. The other samples were incubated at 30 °C for 1, 4, 8 and 24 h (two pieces per sample).

For the enumeration of bacteria deposited on the textile, at each time of incubation, samples of textiles were removed in a stomacher bag. Then 20 mL of neutralizing solution (VWR BDH Prolabo, France) were added and the stomacher bag was shaken for 2 min on each side of the bag to detach *Listeria innocua*. After 4 h, 8 h and 24 h, a fast wash step was added in order to remove the non adhesive bacteria before removing the biofilm with stomacher. Finally, serial 10-fold dilutions were performed with 1 mL of the suspension containing bacteria and viable counts were estimated. After incubation for 24 h at 30 °C, the number of colony forming units on trypticase soy agar (TSA) was counted and expressed relatively to the weight of the textile (CFU g^{-1}). This protocol was performed for each time of incubation.

The antibacterial activity could be calculated according to the formula: $A = (C^{24} - C^0) - (T^{24} - T^0)$. "*C*" and "*T*" represent the numbers of bacteria enumerated after removal from control (i.e. untreated) and treated textiles, respectively; "24" and "0" meaning time of incubation in hours for each condition.

Death curves were constructed by plotting log (Ct–Tt), where Ct is the viable cells number at *t* time on the control textile and Tt is the viable cell number at t time on the treated textile.

2.3. Scanning electron microscopy (SEM) of textiles samples (without and with treatment)

Textile samples were fixed for 45 min in a glutaraldehyde solution (2% v/v in cacodylate solution), rinsed three times for 10 min in a sodium cacodylate solution (0.2 mol L^{-1}, pH 7.4). Glutaraldehyde-fixed cells on textile were post-fixed with OsO_4 and dehydrated. They were then critical point-dried with CO_2 mounted on aluminium stubs, and coated with gold–palladium in a vacuum evaporator. Then the samples were observed using a scanning electron microscope (Hitachi S800 FEG, Japan). SEM preparations and observations were performed at the center of microscopy platform of Lyon University (Centre technologique des microstructures).

2.4. Statistical analysis

Enumeration results were expressed in $\log_{10}$ (CFU g^{-1}). To assess the influence of the silver's layer thickness and the textile composition, a Fisher test was performed with a significant level of $P > 0.05$. Statgraphics centurion XV© software (version 15.0.10, Sigmaplus, Levallois-Perret, France) was used for all the statistical tests.

3. Results and discussion

3.1. Characterisation of treated textiles after plasma technology

Our aim was to deposit a very low quantity of silver in order to avoid strong colouring of the textiles while keeping an activity against bacteria. In order to get such a low thickness (<10 nm); the input power was reduced to 100 W direct current. In this thickness range, it is well known that the film structure changes a lot with the thickness and with the substrate temperature. For thicknesses lower than 10 nm the film is not anymore continuous and the deposition appears as aggregates of silver (Maaroof & Smith, 2005). Also Wang et al. (2007) have shown AFM images of silver coating appearing with various roughnesses for thicknesses less than 100 nm. In order to characterize the thin film material, optical transmission spectra in the visible range have been measured with material deposited on glass samples (Fig. 2). For wavelengths above 700 nm, the transmission rate decreased with the film thickness. However, for lower wavelengths, the transmission rate showed a minimum between 500 and 600 nm when the films had a thickness lower than 10 nm. This extinction is usually explained by plasmon resonances (Catchpole, Pillai, & Lin, 2003). They are the signature of nanoscale metallic structures.

Thin films have been deposited on two types of textiles containing polyester and cotton. The first set of textiles contained 65% of polyester while the second one contained 65% of cotton.

Although the silver layers were very thin, the textiles were strongly coloured because of the silver oxidation with the atmosphere (Fig. 3). The intensity of the colourization increased with the thickness. It will be necessary for the future treatments to limit this colourization by controlling silver thickness.

Colour measurements of plasma-treated textiles and untreated textiles were made according to the CIE $L^*a^*b^*$ system to evaluate the colour parameter and the colour difference. In the CIE $L^*a^*b^*$ system, L^* refers to lightness–darkness values from 100 to 0 representing white to black, a^* values run from negative (green) to positive (red) and b^* values run from negative (blue) to positive (yellow) and the total colour difference is given by ΔE. Lower L^* values indicate that the samples become darker than untreated samples. It can be seen from Tables 1 and 2 that the L^* values decreased with the increase of silver thickness from 10 to 100 Å for majority cotton and majority polyester textiles indicating that treated samples were darker than untreated ones. The treated samples with 200 and 400 Å silver layer's thickness were bright and presented thus higher L^* values than 100 Å silver layer's thickness samples.

The colour differences (ΔE) given in Tables 1 and 2 also indicate a significant colour difference between the samples treated with silver and the untreated sample. Both for majority cotton and majority polyester textiles, the highest ΔE value was observed with 100 Å silver thickness textiles.

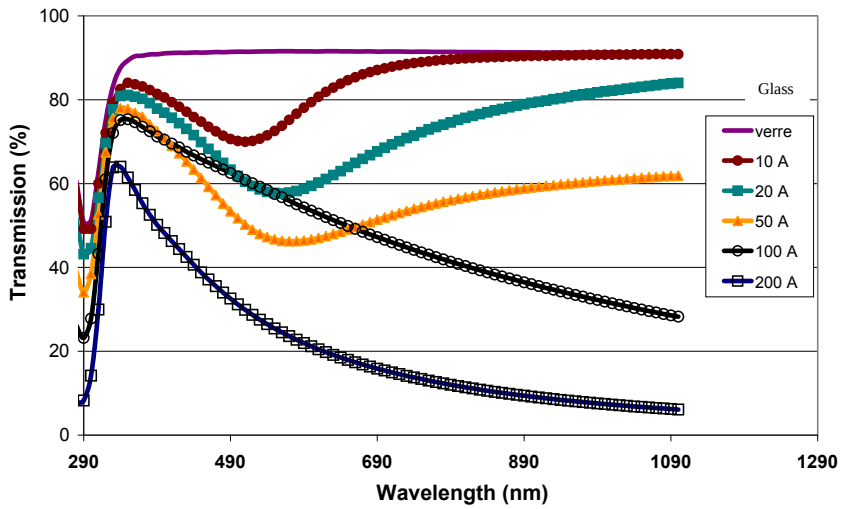


Fig. 2. Optical transmission of silver deposited on glass substrate. Å: Angström.

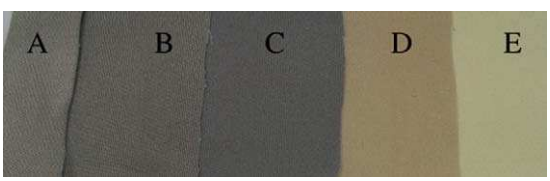


Fig. 3. Samples of plasma-treated textiles with different thicknesses of silver.

Table 1
Colour measurements of majority polyester textiles treated or not with plasma, according to the CIE $L^*a^*b^*$ colour system.

Silver thickness (Å)	L	a	b	ΔE
Untreated	93.90	0.06	0.02	–
400	64.62	−0.53	7.39	30.50
200	63.01	0.06	6.93	31.92
100	59.14	0.50	5.53	35.39
50	61.44	0.97	4.13	32.90
10	88.87	−0.95	17.66	19.47

Table 2
Colour measurements of majority cotton textiles treated or not with plasma, according to the CIE $L^*a^*b^*$ colour system.

Silver thickness (Å)	L	a	b	ΔE
Untreated	93.93	0.10	−0.08	–
400	70.93	0.36	−0.69	24.28
200	60.47	0.20	0.03	34.04
100	56.41	0.04	0.40	37.80
20	79.43	0.67	2.81	26.26
10	89.86	0.26	−2.07	18.13

3.2. Adhesion and biofilm structure of L. innocua LRGIA 01 to textiles without antimicrobial treatment

The adhesion and biofilm structure of *L. innocua* LRGIA 01 on majority polyester (65% polyester and 35% cotton) and majority cotton (65% cotton and 35% polyester) textiles have been investigated (Fig. 4).

The number of *L. innocua* cells initially deposited on the textile was the same than the number of bacteria enumerated in the inoculation suspension (5 log CFU mL^{-1}) for the two textiles. The evolution of the growth on the two types of textiles was similar: from inoculation to 8 h the bacterial population increased in a significant way (2 log CFU g^{-1}). After 10 h, the bacterial population on textile stabilized at 7 log CFU g^{-1}.

These results suggest that *L. innocua* LRGIA01 can adhere and grow on white control textiles composed by either 65% polyester and 35% cotton or by 65% cotton and 35% polyester under saturating conditions of humidity. This experiment was performed in high moisture conditions in order to mimic conditions favoring microbial growth prevailing in food industry. Beresford et al. (2001) have established that *L. monocytogenes* cells can adhere rapidly (less than 2 h) to different inert food contact surfaces such as polypropylene, rubbers, stainless steel and glass. After 2 h of contact between the surface and *L. monocytogenes*, the bacteria can strongly adhere to stainless steel, polypropylene, polycarbonate or other surfaces with no significant differences. This adhesion depends on the bacterial strains (Harvey, Keenan, & Gilmour, 2007), and on the type of substrate (Sinde & Carballo, 2000). In our study, it seems that *L. innocua*, a strain with a lot of similarities with *L. monocytogenes* can adhere to textile material and grow in less than 4 h. After 4 h, 6 log CFU g^{-1} of *L. innocua* were enumerated (while 5 log CFU g^{-1} were initially present). The stabilization of the growth after 8 h could be explained by a lack of nutritive medium for a further development of *L. innocua*. Textile goods, especially those made from natural fabrics can provide an excellent environment for microorganisms to grow and thereby reducing their exhaustion property, because of their large surface area and ability to retain moisture (Son, Kim, Ravikumar, & Lee, 2006).

3.3. Evaluation of the anti-Listeria innocua activity of treated textiles

Treated textiles samples were obtained with magnetron sputtering technology and different thicknesses of silver layers were tested for their antimicrobial activity (10, 20, 100, 200, 400 Å for the majority cotton textile and 10, 50, 100, 200, 400 Å for the majority polyester textile).

Death curves were constructed by plotting (log Ct – log Tt), where Ct is the viable cell number at *t* time on the control textile and Tt is the viable cell number at t time on the treated textile.

Figs. 5 and 6 show the inhibition of *L. innocua* LRGIA01 growth on the majority polyester and majority cotton textiles treated with silver (10–400 Å thicknesses).

The inhibition of *L. innocua* on the treated textiles was observed from 1 h to 24 h for the different thicknesses of silver (5–7 log

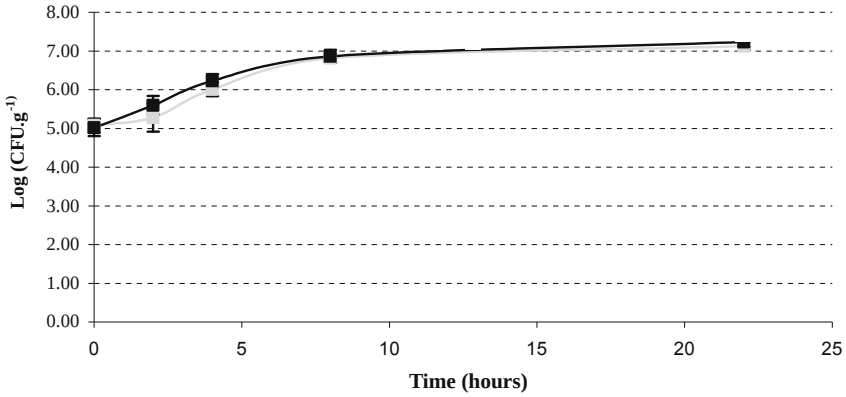


Fig. 4. Adhesion and biofilm structure of *Listeria innocua* LRGIA 01 (log CFU g^{-1}) on control white 65% cotton – 35% polyester textile.

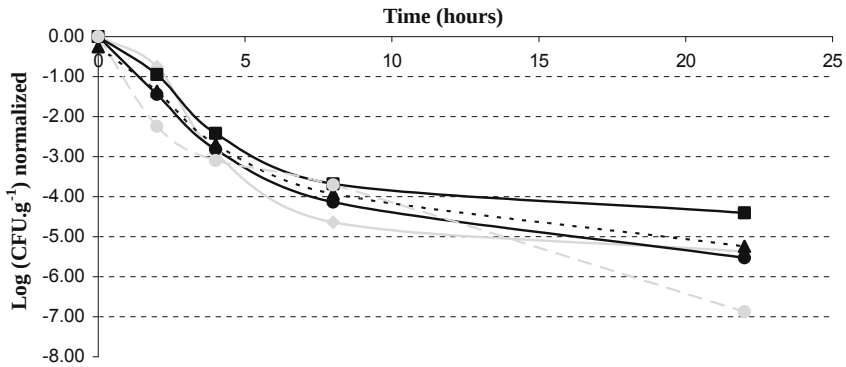


Fig. 5. Normalized (log Ct − log Tt) evolution of *Listeria innocua* LRGIA 01 growth (log CFU g^{-1}) on white 65% cotton treated textiles 400 Å (♦), 200 Å (■), 100 Å (.▲.), 20 Å (●), 10 Å (-●-) at 30 °C for 24 h, $n = 4$.

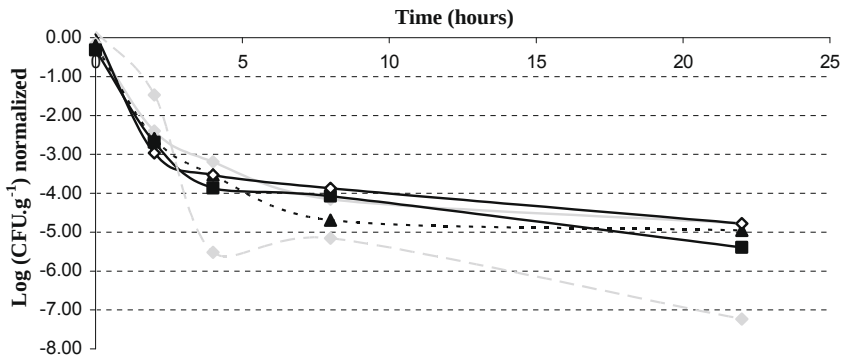


Fig. 6. Normalized (log Ct − log Tt) evolution of *Listeria innocua* LRGIA 01 growth (log CFU g^{-1}) on white 65% polyester treated textiles 400 Å (♦), 200 Å (■), 100 Å (.▲.), 50 Å (○), 10 Å (-●-) at 30 °C for 24 h $n = 4$.

CFU g^{-1} of decrease) and for the two types of textiles. This decrease could be explained by a biocide activity of silver.

In several studies, the antimicrobial activity of silver is attributed to its gradual and persistent release from the textile (Tomsic et al., 2009) and depends directly on its concentration.

For the 10 Å thicknesses (majority cotton or majority polyester), an important decrease could be observed (7 log CFU mL^{-1}) and as a consequence it would not be necessary to deposit a larger layer of silver to have an antimicrobial activity. These results show that a sufficient amount of silver was applied on the fibre by plasma methodology (10 Å) to achieve anti-*L. innocua* activity. This information could be of practical importance to reduce the colourization of textile during the treatment.

The antibacterial activity has been calculated to determine the efficacy of textile according to the ISO 20743/2005 as presented in the Section 2.

The anti-*L. innocua* activity values of the 10 samples of textiles treated with silver are presented in Fig. 7.

According to the ISO 20743/2005, when antibacterial activity values exceed 2, the textile has an antimicrobial activity. For all textiles treated with plasma technology, the antibacterial activity was higher than 2, in consequence; all of them presented an anti-*L. innocua* LRGIA 01 activity. To assess the presence of statistically significant differences between the 10 anti-*Listeria* activities, Fisher's tests were performed ($P < 0.05$). Different statistical groups could thus be distinguished. The majority polyester textile with

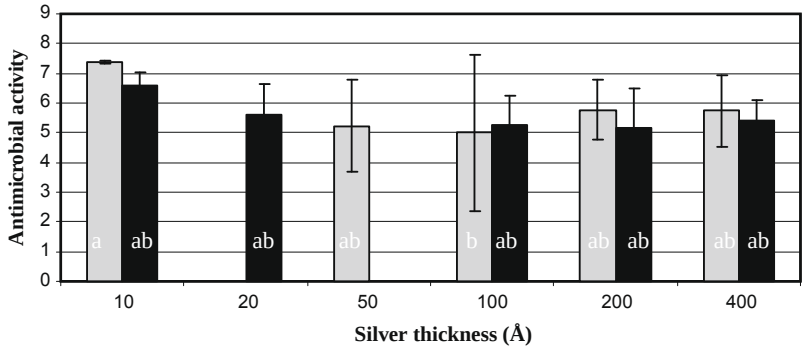


Fig. 7. Anti-*Listeria innocua* LRGIA 01 activity of majority polyester (□) and majority cotton (■) textiles treated by plasma technology. Each letters (a, b or c) indicated homogeneous statistical group. The numbers represented by letters a, b or c are different. The results with different letters were thus significantly different by the statistical test of Fisher ($P < 0{,}05$).

10 Å thicknesses appeared different from the other ones and as the most active. This confirms that a thickness of 10 Å of silver layer deposited on textile is sufficient to have an anti-*L. innocua* activity. Wang et al. (2007) reported a deposition of silver film with different thicknesses on polypropylene nonwovens surfaces by magnetron sputter coating. These authors indicated that when the thickness of silver film exceeded 10 Å there was a reduction of 86% of *E. coli* population. This information is in accordance with the efficacy of silver in low quantities observed in the present study.

Many studies demonstrate that a low concentration of silver is sufficient to induce an important decrease of the microbial population (Berger et al., 1976; Batarseh, 2004; Cowan et al., 2003; Yamanaka, Hara, & Kudo, 2005). The addition of a 900 ppm silver solution resulted in an exponential decrease with time of *E. coli*, from the initial 10^7 CFU mL^{-1} to 10^6 CFU mL^{-1} in 3 h and further down to 10 CFU mL^{-1} in 24 h (Yamanaka et al., 2005). All the textiles functionalised by plasma technology developed in this study had an anti-*L. innocua* activity. The use of low silver concentrations could be important to create functional textile with antibacterial activity but no toxicity. In most of studies, silver is suggested to be non toxic. Lee, Park, Lee, Kim, and Park (2007) showed that silver nanocoated cotton fabric did not cause direct skin irritation on guinea pigs. However, Braydich-Stolle, Hussain, Schlager, and Hofmann (2005) reported the toxicity of silver nanoparticles on a cell line with spermatogonial stem cell and its toxicity increased with the increase of the concentration of silver nanoparticles.

The mode of action of silver is not really known but seems to be due to an action of reactive oxygen or interaction with DNA. To assess the homogeneity of the inoculum deposit and the form or the

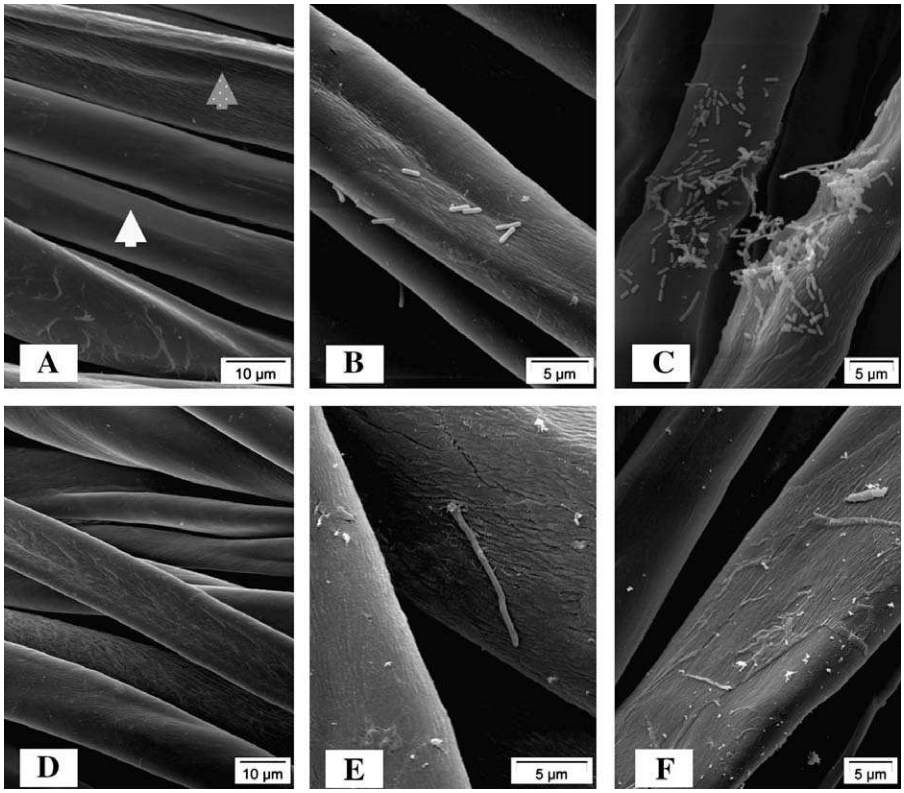


Fig. 8. Scanning electron microscopy of the surface of textiles samples 65% of cotton and 35% polyester. (A) Surface of untreated textile without bacteria, white arrow: polyester's fibre, dotted arrow: cotton's fibre (B) surface of untreated textile in contact with bacteria during 8 h, (C) surface of untreated textile in contact with bacteria during 24 h, (D) surface of plasma-treated textile with 10 Å thickness of silver without bacteria, (E) textile with 10 Å thickness of silver in contact with bacteria during 8 h, (F) textile with 10 Å thickness of silver in contact with bacteria during 24 h.

alteration of bacteria after the treatment, observations by scanning electron microscopy were performed.

3.4. Scanning electron microscopy (SEM)

Analysis of the surface topography of different samples was carried out by SEM (Fig. 8). SEM micrographs of untreated textile (Fig. 8A) without inoculation reveal the typical structure of the cotton's fibres (dotted arrow) and polyester's fibres (white arrow). Cotton fibres appeared more irregular than the polyester fibres.

SEM micrographs of treated textile (Fig. 8D) did not reveal any apparent changes with respect to the untreated textile. On the totality of analyzed surface, the same type of fibres before and after treatment can be observed.

After 8 h (Fig. 8B) and 24 h (Fig. 8C) of contact between untreated textile's sample and *L. innocua*, bacteria appeared on the observations. After 24 h, more bacteria than after 8 h were present. *Listeria innocua* cells seem to form community like biofilm structure. These results are in accordance with enumeration on plates, and reveal a growth of *L. innocua* on the untreated majority cotton textile.

For treated textiles, only isolated bacteria could be observed after 8 h (Fig. 8E) and no more bacteria were observed after 24 h (Fig. 8F). Bacteria on the fibres after 8 h of contact had a different morphology than bacteria on control textiles: they were much stretched out. The increase in cell length might be an indication of the cell damage. Lindsay, Brozel, Mostert, and Von Holy (2002) indicated that oxidizing agents such as chlorine dioxide-containing sanitizers increase the length of *Pseudomonas fluorescens* M2 cells in biofilm. DeQueiroz and Day (2007) showed that *Pseudomonas aeruginosa* cells exhibited shape distortions, indentations and slight elongation after 1 or 5 min exposure to a combination of sodium hypochlorite (25, 000 mg L^{-1}) and hydrogen peroxide (2500 mg L^{-1}). Silver deposit on textile can make some damages on *L. innocua* cells as indicated by the morphology of the cells on the treated textiles.

Some deposits present on the fibres after 24 h were likely due to the cacodylate buffer employed during the preparation of samples.

These observations confirm that *L. innocua* did not grow on the treated textiles. Chaw, Manimaran, and Tay (2005) demonstrated that silver ions can destabilize a biofilm matrix by binding to electron donor groups of the biological molecules. After 60 min contact between silver ions and a 2 days biofilm of *Staphylococcus epidermidis*, the overall structure of the biofilm became partially destroyed. We can suggest that in our study, *L. innocua* cells in contact with silver functionalised textile are altered and detach of the surface of the textile, this hypothesis would explain why no more bacteria were observed after 24 h of contact.

4. Conclusion

Two types of textiles were functionalised by silver with particles plasma technology. Those textiles presented a strong antimicrobial activity against *L. innocua*. This activity could be measured with a methodology based on the standard ISO 20743/2005 and could be explained by a good efficacy of silver on the *L. innocua* viability. SEM observations revealed that no more bacteria could be observed on the treated textile after 24 h contact and some stretched bacteria were observed after 8 h of contact. This could result from a modification of the cell morphology due to the action of silver, this will be further investigated. It could be interesting to reduce the quantity of silver deposited on textile because both of the possible toxicity of silver and the resulting colourization of textile. In the present study, it was shown that the thinner thicknesses of silver layers were as effective as larger silver layers.

This methodology has potential to develop antibacterial textiles for an application in food-processing industry for dressing or air filtration.

In this first study, we have shown that these textiles can kill food pathogenic bacteria like *Listeria* and so could be applied in food-processing industry. Since these silver coated fabrics require durability because, in food industry, textiles are subjected to frequent washing, rubbing and sweating during their use, this work should be completed by assessing the durability of silver coating. Antibacterial activity should namely be tested after laundering.

Acknowledgements

This study was a part of the research project, Actiprotex, supported by Techtera, the competitiveness cluster for technical and functional textiles, based in the Lyon region and public authorities. Actiprotex will implement innovative technologies to prevent the attachment of microorganisms to textile surfaces.

References

Anonymous (2005). Standard ISO 20743. Determination of antibacterial activity of antibacterial finished products.

Batarseh, K. I. (2004). Anomaly and correlation of killing in the therapeutic properties of silver chelation with glutamic and tartaric acids. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy, 54*, 546–548.

Beresford, M. R., Andrew, P. W., & Shama, G. (2001). *Listeria monocytogenes* adher to many materials found in food-processing environments. *Journal of Applied Microbiology, 90*, 1000–1005.

Berger, T. J., Spadaro, J. A., Chapin, S. E., & Becker, R. O. (1976). Electrically generated silver ions: quantitative effects on bacterial and mammalian cells. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 9*, 357–358.

Braydich-Stolle, L., Hussain, S., Schlager, J. J., & Hofmann, M. C. (2005). *In vitro* cytotoxicity of nanoparticles in mammalian germline stem cells. *Toxicological Sciences, 88*, 412–419.

Canal, C., Gaboriau, F., Villeger, S., Cvelbar, U., & Ricard, A. (2008). Studies on antibacterial dressings obtained by fluorinated post-discharge plasma. *International Journal of Pharmaceutics, 367*, 155–161.

Catchpole, K., Pillai, S., & Lin, K. (2003). Novel applications for surface plasmons in photovoltaics. *Proceedings of 3rd World Conference on Photovoltaic Energy Conversion*, Osaka, Japan, May 12–16, pp. 2714–2717.

Chaw, K. C., Manimaran, M., & Tay, F. E. H. (2005). Role of silver ions in destabilization of intermolecular adhesion forces measured by atomic force microscopy in *Staphylococcus epidermidis* biofilms. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 49*, 4853–4859.

Cowan, M. M., Abshire, K. Z., Houk, S. L., & Evans, S. M. (2003). Antimicrobial efficacy of a silver-zeolite matrix coating on stainless steel. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology, 30*, 102–106.

DeQueiroz, G. A., & Day, D. F. (2007). Antimicrobial activity and effectiveness of a combination of sodium hypochlorite and hydrogen peroxide in killing and removing *Pseudomonas aeruginosa* biofilms from surfaces. *Journal of Applied Microbiology, 103*, 794–802.

Dubas, S. T., Kumlangdudsana, P., & Potiyaraj, P. (2006). Layer-by-layer deposition of antimicrobial silver nanoparticles on textile fibres. *Colloid Surface A––Physicochemical and Engineering Aspects, 289*, 105–109.

Feng, Q. L., Wu, J., Chen, G. Q., Cui, F. Z., Kim, T. N., & Kim, J. O. (2000). A mechanistic study of the antibacterial effect of silver ions on *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus*. *Journal of Biomedical Materials Research Part A, 52*, 662–668.

Harvey, J., Keenan, K. P., & Gilmour, A. (2007). Assessing biofilm formation by *Listeria monocytogenes* strains. *Food Microbiology, 24*, 380–392.

Kostic, M., Radic, N., Obradovic, B. M., & Skundric, P. (2008). Antimicrobial textile prepared by silver deposition on dielectric barrier discharge treated cotton/polyester fabric. *Chemical Industry and Chemical Engineering Quarterly, 14*, 219–221.

Kumar, R., Howdle, S., & Münstedt, H. (2005). Polyamide/silver antimicrobials: effect of filler types on the silver ion release. *Journal of Biomedical Materials Research Part B, 75*, 311–319.

Lee, H. Y., Park, H. K., Lee, Y. M., Kim, K., & Park, S. B. (2007). A practical procedure for producing silver nanocoated fabric and its antibacterial evaluation for biomedical applications. *Chemical Communication, 28*, 2959–2961.

Lei Qian, G. S. (2003). Durable and regenerable antimicrobial textiles: synthesis and applications of 3-methylol-2,2,5,5-tetramethyl-imidazolidin-4-one (mtmio). *Journal of Applied Polymer Science, 89*, 2418–2425.

Li, Q., Mahendra, S., Lyon, D. Y., Brunet, L., Liga, M. V., Li, D., & Alvarez, P. J. J. (2008). Antimicrobial nanomaterials for water disinfection and microbial control: potential applications and implications. *Water Research, 42*, 4592–4602.

Lin, J., Winkelman, K., Worley, S. D., Broughton, R. M., & Williams, J. F. (2001). Antimicrobial treatment of nylon. *Journal of Applied Polymer Science, 81*, 943–947.

Lindsay, D., Brozel, V. S., Mostert, J. F., & Von Holy, A. (2002). Differential efficacy of a chlorine dioxide-containing sanitizer against single species and binary biofilms of a dairy-associated *Bacillus cereus* and a *Pseudomonas fluorescens* isolate. *Journal of Applied Microbiology, 92*, 352–361.

Maaroof, A. I., & Smith, G. B. (2005). Effective optical constants of nanostructured thin silver films and impact of an insulator coating. *Thin Solid Films, 485*, 198–206.

Matsumura, Y., Yoshikata, K., Kunisaki, S. I., & Tsuchido, T. (2003). Mode of bactericidal action of silver zeolite and its comparison with that of silver nitrate. *Applied and Environmental Microbiology, 69*, 4278–4281.

Rai, M., Yadav, A., & Gade, A. (2009). Silver nanoparticles as a new generation of antimicrobial. *Biotechnology Advances, 27*, 76–83.

Silver, S., Phung, L. T., & Silver, G. (2006). Silver as biocides in burn and wound dressings and bacterial resistance to silver compounds. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology, 33*, 627–634.

Sinde, E., & Carballo, J. (2000). Attachment of *Salmonella* spp. and *Listeria monocytogenes* to stainless steel, rubber and polytetrafluorethylene: the influence of free energy and the effect of commercial sanitizers. *Food Microbiology, 17*, 439–447.

Son, Y. A., Kim, B. S., Ravikumar, K., & Lee, S. G. (2006). Imparting durable antimicrobial properties to cotton fabrics using quaternary ammonium salts through 4-aminobenzenesulfonic acid–chloro–triazine adduct. *European Polymer Journal, 42*, 3059–3067.

Sun, G. S. (2002). Durable and regenerable antimicrobial textile materials prepared by a continuous grafting process. *Journal of Applied Polymer Science, 84*, 1592–1599.

Tomsic, B., Simoncic, B., Orel, B., Zerjav, M., Schroers, H., Simoncic, A., & Samardzij, Z. (2009). Antimicrobial activity of AgCl embedded in a silica matrix on cotton fabric. *Carbohydrate Polymers, 75*, 618–626.

Wang, H., Wang, J., Hong, J., Wie, Q., Gao, W., & Zhu, Z. (2007). Preparation and characterization of silver nanocomposite textile. *Journal of Coatings Technology and Research, 4*, 101–106.

Yamanaka, M., Hara, K., & Kudo, J. (2005). Bactericidal actions of a silver ion solution on *Escherichia coli*, studied by energy-filtering transmission electron microscopy and proteomic analysis. *Applied and Environmental Microbiology, 71*, 7589–7593.

ANNEXE 3

Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry 215 (2010) 147–156

Contents lists available at ScienceDirect

Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry

journal homepage: www.elsevier.com/locate/jphotochem

Photocatalytic generation of silver nanoparticles and application to the antibacterial functionalization of textile fabrics

M. Messaoud [a], E. Chadeau [b], C. Brunon [c], T. Ballet [a], L. Rappenne [a], F. Roussel [d], D. Leonard [c], N. Oulahal [b], M. Langlet [a,*]

[a] Laboratoire des Matériaux et de Génie Physique, Grenoble Institute of Technology-Minatec, 3 Parvis Louis Néel, F-38016 Grenoble Cedex 1, France
[b] Université de Lyon, Université Lyon 1, Laboratoire de Recherche en Génie Industriel Alimentaire, LRGIA, E.A. no. 3733, Rue Henri de Boissieu, F-01000 Bourg en Bresse, France
[c] Université de Lyon, Université Lyon 1, Laboratoire des Sciences Analytiques (LSA), CNRS, UMR 5180, Bât. J. Raulin 5ème étage, F-69622 Villeurbanne Cedex, France
[d] Consortium des Moyens Technologiques Communs, Grenoble Institute of Technology, 1260 rue de la piscine, F-38402 Saint Martin d'Hères, France

ARTICLE INFO

Article history:
Received 2 April 2010
Received in revised form 2 July 2010
Accepted 2 August 2010
Available online 7 August 2010

Keywords:
Metallic silver
TiO_2
Nanoparticles
Textile
Photocatalysis
Antibacterial activity

ABSTRACT

An all-inorganic protocol, entirely based on wet chemistry methods, has been studied to form nano-sized Ag metallic particles in solution. Liquid suspensions of anatase TiO_2 nanocrystallites have first been prepared through a sol–gel route. Silver nanoparticles (NPs) have then been generated through the photocatalytic reduction of a silver salt, diluted in TiO_2 liquid suspensions, and exposed to UV light, which results in the formation of a mixed Ag–TiO_2 suspension. Mechanisms occurring in solutions during the metallization step and a post-metallization ageing period have been studied by UV/vis spectroscopy. Chemico-structural and morphological properties of resulting silver NPs have been studied by transmission electron microscopy, scanning electron microscopy, and X-ray photoelectron spectroscopy. Ag–TiO_2 suspensions have then been impregnated on cotton-based textile samples and the antibacterial activity of so-functionalized textiles has been studied with respect to *E. coli* and *L. innocua* bacteria. It is shown that, while TiO_2 NPs attached to textile fibres have no antibacterial activity, functionalized textiles exhibit a strong antibacterial activity due to Ag NPs, and this activity can be reached for a large range of impregnated silver amounts.

© 2010 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

In recent years, the antibacterial or antimicrobial finishing of fibres and fabrics used in various environments has attracted much attention [1–4]. In this approach, most finished textile materials currently introduced in hospitals and food industries are used to protect wearers against the spread of nosocomial infections, inhibit the formation of pathogen biofilms, and remove the infection sources. In general, antibacterial properties can be imparted to the textile materials by chemically or physically incorporating functional agents onto fibres of fabrics. Researchers are now focusing on durable and environmentally friendly agents with much interest in finding ways to formulate in cost-effective manner new types of safe antibacterial agents. Previous studies have shown that active agents in the form of nanoparticles (NPs) can be envisaged as new antibacterial materials. Recently, Klabunde and co-workers demonstrated that highly reactive metallic oxide NPs exhibited good biocidal action against both Gram-positive and Gram-negative bacteria [5]. Thus, the formulation of nano-sized inorganic particles displaying unique physical and chemical properties opens the possibility of a new generation of antibacterial materials [6]. New studies of efficient active agents are all the more a topical subject, as several pathogenic bacteria have shown enhanced resistance against various antibiotics.

Silver-based compounds, being biocompatible at effective concentrations, are particularly investigated as antibacterial agents against micro-organisms when in the form of non-agglomerated and well dispersed NPs [7–11]. On the one hand, the antibacterial activity of silver cations is well known and has been studied in details [12]. On the other hand, beside inherent chemical, physical, and optical properties arising from their very small size, Ag metallic NPs have recently shown a promising potential as antibacterial or antimicrobial agents [13]. Many techniques well covered in literature have been developed to prepare metallic silver NPs. For example, such NPs can be synthesized through γ-radiation [14], laser ablation [15], electrochemical [16], chemical [17], photochemical [18] methods, and else. Because of their cost-effectiveness, wet chemistry (chemical or photochemical) methods are particularly studied. In these approaches, silver NPs are formed in solution and then dispersed on functional supports. Such chemical and photochemical procedures often involve multiple organic chemicals, used as reductive, capping, and/or surfactant agents, and

* Corresponding author. Tel.: +33 456529342.
E-mail address: Michel.Langlet@grenoble-inp.fr (M. Langlet).

1010-6030/$ – see front matter © 2010 Elsevier B.V. All rights reserved.
doi:10.1016/j.jphotochem.2010.08.003

intended to control the mean size, size distribution, and stability of silver NPs in solution. For instance, the use of $NaBH_4$ or citrate additives is very well documented in the literature [19–21]. However, organic chemicals can alter or shield the function of metallic NPs. In clothing applications, they can also provoke biological hazards when contacted with human skin [7]. Finally, aforementioned chemical and photochemical procedures involve quite tedious multi-step processes, which are not necessarily compatible with industrial aspects [22].

In this work, an all-inorganic two-step protocol, entirely based on wet chemistry methods, has been studied to form nano-sized Ag metallic particles in solution. Liquid suspensions of anatase TiO_2 nanocrystallites have first been prepared through a sol–gel route. Silver NPs have then been generated through the photocatalytic reduction of silver nitrate diluted in TiO_2 liquid suspensions exposed to UV light, which results in mixed Ag–TiO_2 suspensions. In this paper, we firstly focus on the formation of silver NPs and their optimization with respect to the metallization yield as well as their mean size, size distribution, and stability in solution. Size effects are a particular matter of interest because it has been shown that interactions of silver NPs with bacteria are dependent on the size and shape of the nanoparticles [23]. Then, the antibacterial action of metallic Ag NPs impregnated on textile materials through a pad-coating procedure is presented. Antibacterial activity assessments have been performed using Gram-negative *E. coli* and Gram-positive *L. innocua* as model bacteria.

2. Experimental

2.1. Preparation of TiO_2 liquid suspensions

Titanium oxide liquid suspensions were prepared using a sol–gel route, as schematically illustrated in Fig. 1a. In a first preparation step, a polymeric sol (PS) was formed by mixing tetraisopropyl orthotitanate (TIPT) with deionised water, hydrochloric acid (HCl), and absolute ethanol as a solvent [24]. The TIPT concentration in the sol was 0.4 M, and the TIPT/H_2O/HCl molar composition was 1/0.82/0.13. The sol was aged at room temperature for 2 days before use in a second preparation step. In this second step, the PS sol was first diluted in an excess of deionised water (H_2O/TIPT molar ratio of 90) and then autoclaved at 130 °C for 6 h. Autoclaving yielded the crystallization of anatase TiO_2 NPs in the liquid phase. An exchange procedure was then performed in order to remove water from the sol and form a crystalline suspension (CS) in absolute ethanol. The final TiO_2 concentration in ethanol was 0.24 M. For more data, the whole procedure has been described in a previous paper [25]. The final sol was composed of TiO_2 nanocrystallites of about 6 nm in diameter, which were aggregated in the form of polycrystalline grains of 50–100 nm in size. Previous works showed that both PS and CS preparation conditions gave rise to very stable sols, which indicated that no gelation took place in PS sols, while no significant particle aggregation occurred in CS sols. Consequently, these sols could be used for several weeks in reproducible conditions.

2.2. Photo-generation of silver nanoparticles in solution

The process yielding the formation of Ag NPs in solution is schematically represented in Fig. 1b. Silver nitrate ($AgNO_3$), used as Ag precursor, was first diluted at various concentrations in absolute ethanol and the mixture was then added to a CS previously diluted in absolute ethanol at various concentrations. $AgNO_3$ and TiO_2 concentrations in resulting solutions were varied in the [0.037×10^{-3}–5×10^{-3} M] and [0.024×10^{-3}–2.4×10^{-3} M] ranges, respectively. These solutions were magnetically stirred for 15 min at 500 rpm, then poured into a glass vessel and exposed to radiation arising from three UVA lamps (PLS 11W from Philips) essentially emitting at 365 nm wavelength (negligible UVB/UVC emission). UV exposure experiments were performed for various durations, ranging up to 1 h, in a climatic cabinet regulated at a 20 °C temperature and 40% relative humidity. Constant agitation of the solution was insured over UV exposure using a magnetic stirrer rotated at 500 rpm. As will be discussed hereafter, this procedure resulted in mixed Ag–TiO_2 liquid suspensions.

2.3. Substrates and antibacterial textile finishing

Silicon wafers were used as supports to routinely study some characteristics of NPs formed through the aforementioned procedure. For that purpose, 5–10 droplets of derived liquid suspensions were spread on the substrate surface in order to deposit a sufficient quantity of matter to be analyzed. Besides, antibacterial tests were performed on 65% cotton–35% polyester textiles, furnished by an industrial society. More precise data on these textiles cannot be furnished for confidentiality reasons. The impregnation procedure

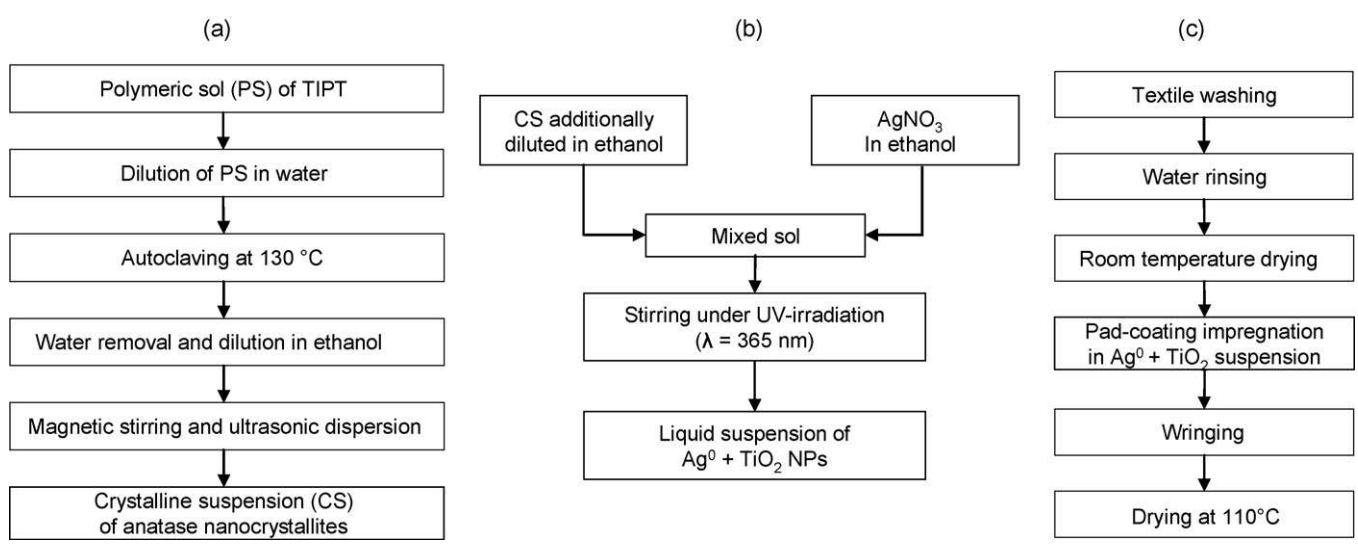


Fig. 1. Schematic illustration of the process yielding antibacterial functionalization of textile fabrics: preparation of a TiO_2 crystalline suspension through sol–gel route (a), preparation of an Ag–TiO_2 mixed suspension through a photocatalytic reduction mechanism (b), and impregnation of the textile within an Ag–TiO_2 mixed suspension (c).

of textile samples with Ag–TiO_2 liquid suspensions is schematically represented in Fig. 1c. Household washing was preliminary performed at 40 °C using the ECE laundering powder (1 g/L) in order to eliminate dusts and impurities. Textiles were then rinsed 3 times with water, and finally dried at ambient temperature. Textile samples of 30 cm × 7 cm dimensions were impregnated in Ag–TiO_2 liquid suspensions of various compositions through a pad-coating procedure with an immersion speed of 5 m/min. The finished textile was then wrung twice between a plane support and an upper squeezing roll to remove the excess of liquid suspension and fix the remaining finish on the textile. The textile was finally dried at 110 °C for 10 min to totally eliminate the solvent (ethanol).

2.4. Characterization methods

Modifications occurring in the solutions exposed to UV light were analyzed by UV/vis spectroscopy, in a 200–500 nm spectral range, using a Jasco V-530 spectrophotometer. Over UV exposure, small solution aliquots were periodically withdrawn for spectral measurement. Morphological and chemical characterizations were generally realized on NPs deposited on silicon substrates. Nanoparticle imaging was performed using a ZEISS Ultra 55 field emission gun scanning electron microscope (FEG-SEM) operated at 20 kV. NPs counting was realized from FEG-SEM images using an Image-Pro Plus V4 software. NPs dispersed on textile fibres were also imaged using a controlled pressure FEG-SEM (Zeiss Ultra 55 VP) with a chamber pressure of 100 Pa. Surface chemical analysis of NPs was performed by X-ray photoelectron spectroscopy (XPS) using a PHI Quantera SXM instrument (physical electronics) equipped with a 180° hemispherical electron energy analyzer and a monochromatized Al Kα (1486.6 eV) source operated at 15 kV and 4 mA. The analysis spot had a diameter of 200 μm and the detection angle relative to the substrate surface was 45°. In such conditions, the probed depth was estimated to be around 3 nm. Samples were analyzed with dual-beam charge neutralisation and the C–C/C–H component of C_{1s} peak was adjusted to 285 eV. The so-called modified Auger parameter was calculated from the sum of the $Ag_{3d5/2}$ photoelectron binding energy and of the $Ag_{M4N45N45}$ Auger electron kinetic energy. Structural characterizations were performed thanks to transmission electron microscopy (TEM) observations. For that purpose, NPs were dispersed on a carbon grid and then studied using a JEOL-2010 LaB6 TEM operated at 200 keV. Fast Fourier transform (FFT) was performed on several high resolution TEM (HRTEM) images to identify the simultaneous presence of Ag and TiO_2 nanoparticles.

2.5. Bacterial strains and determination of the antibacterial activity

Determination of the antibacterial activity was focused on the Gram-negative bacteria *E. coli* (XL1-blue) and the Gram-positive bacteria *L. innocua*. The latter kind of strains were isolated from a dairy environment. All strains were stored at −20 °C in brain heart infusion (BHI) media added with 15 vol% glycerol. The whole protocol, which is adapted from the ISO 20743-2005 (Anon., 2005) standard for the determination of the antibacterial activity on textiles, has been detailed elsewhere [26]. Briefly, after different incubation times at 30 °C, i.e. different contact durations of bacteria at the surface of textile fibres, bacterial cells were removed from the textile and the number of cells forming colony on trypticase soy agar (TSA) was counted and expressed relatively to the weight of the textile sample in log (CFU/g) units. Bacterial evolution kinetics were studied by plotting log (CFU/g) as a function of the incubation time and the antibacterial activity (A) of the finishing treatment was calculated after 24 h of incubation according to $A = (C^{24} - C^0) - (T^{24} - T^0)$, where C and T represent the numbers of bacteria counted after removal from control (untreated) and treated textiles, respectively, and "24" and "0" account for times of incubation (in hours) for each condition. According to the ISO 20743-2005 standard, the finishing treatment is considered to be active when the antibacterial activity exceeds a value of 2.

3. Results and discussion

3.1. UV/vis spectral features

The UV–vis spectrum illustrated in Fig. 2a shows that silver nitrate only absorbs light at around 215 nm and does not show any absorption in the UVA range, i.e. the emission range of lamps used in the present work. In these conditions, any direct photochemical (photolytic) reduction of Ag^+ cations, which would eventually produce Ag NPs, cannot be expected under UVA light. In contrast, spectra of Fig. 2b–f shows that increasing the relative amount of TiO_2 NPs in the solution promotes the appearance and growth of a second UV absorption band at greater wavelengths and a progressive absorption overlap in the emission range of our lamps. It is well known that, when exposed to UV radiation ($\lambda < 380$ nm), titanium oxide (preferentially in its anatase polymorphic form) absorbs light and exhibits photocatalytic properties induced by electron (e^-)/hole (h^+) pairs photo-generated in the TiO_2 particles [27]. Photo-generated electrons can in particular induce a reduction of cations adsorbed at the TiO_2 surface [28]. This mechanism has been used in the present work to promote the photo-reduction of $AgNO_3$ into Ag NPs. The anodic process associated to this reduction mechanism is the oxidation of a sacrificial oxidable reactant by valence band photo-holes. In this work, ethanol employed as a dilution medium of $AgNO_3$ salt and TiO_2 particles, was also used as an oxidable reactant. This hole-scavenger, which favours a better photo-generated charge carrier separation, is expected to promote a more efficient photo-reduction and to enhance the rate of metallization leading to Ag NPs.

It is known that metallic silver NPs exhibit an intense absorption band due to surface plasmon resonance (SPR) effects. According to Mie theory, the SPR arises from interactions of small metallic particles with an external electromagnetic field, induced by light, resulting in a coherent oscillation of the conduction (free) electrons at the surface [29,30]. During UV exposure, we observed that $AgNO_3/TiO_2$ ethanolic solutions gradually turned from colorless to yellow or dark yellow. This coloration is attributed to a growing absorption at short wavelengths of the visible spectrum, arising from the progressive appearance of plasmon effects, and it provides a first evidence of the photo-metallization reaction occurring

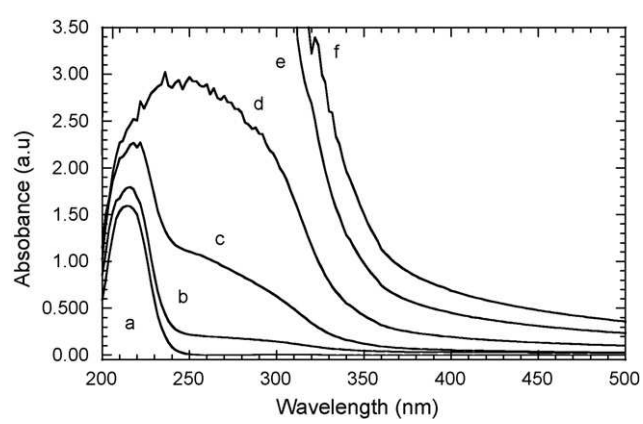


Fig. 2. UV–vis spectra of $AgNO_3$ ($C = 0.5 \times 10^{-3}$ M) diluted in pure ethanol (a) and in a CS suspension with a TiO_2 concentration of 0.25×10^{-4} (b), 1.2×10^{-4} (c), 2.4×10^{-4} (d), 1.2×10^{-3} (e), and 2.4×10^{-3} M (f).

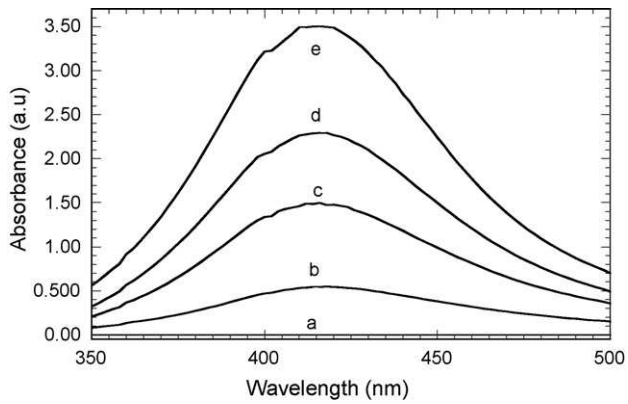


Fig. 3. SPR band at 420 nm for a mixed solution, composed of $AgNO_3$ ($C = 0.5 \times 10^{-3}$ M) and TiO_2 ($C = 1.2 \times 10^{-3}$ M), and exposed to UV light for 0 (a), 5 (b), 15 (c), 30 (d), and 60 min (e). Spectra have been normalized to the spectrum of the solution before UV exposure.

in the solution. Typical absorption spectra of a solution exposed to UV light for various durations are presented in Fig. 3. For more clarity, spectra presented in this figure have been normalized to the spectrum of the solution before UV exposure, i.e. $AgNO_3$ and TiO_2 absorption bands illustrated in Fig. 2 have been subtracted from the UV/vis spectra of irradiated solutions. These normalized spectra illustrate the appearance and growth of a well defined absorption band located at around 420 nm. The more or less rapid development of such a band under UV exposure was observed for all the solutions studied here. The location of this band is coherent with SPR effects induced by metallic silver NPs [31,32]. In the present work, intensity of the 420 nm band deduced from normalized spectra has been used to study the photo-metallization reaction occurring in solution under UV exposure.

3.2. Photo-metallization kinetics

Fig. 4 shows intensity variations of the normalized SPR band at 420 nm over UV exposure for mixed solutions of 0.5×10^{-3} M $AgNO_3$ concentration and various TiO_2 concentrations. For a same amount of silver precursor in the solution, it is observed that the formation of metallic silver NPs, i.e. intensity growth of the SPR band, strongly depends on the TiO_2 amount. On the one hand, increasing the TiO_2 concentration from 2.4×10^{-5} to 1.2×10^{-3} M (Fig. 4a–c) yields an increasing metallization rate. This rate is generally rapid over the first UV exposure stages, after what it slows down or even shows a plateau. Beneficial influence of the TiO_2

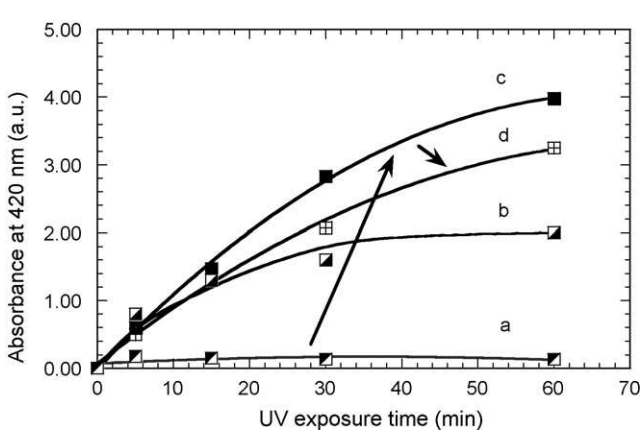


Fig. 4. Intensity variations of the normalized 420 nm SPR band over UV exposure for mixed solutions with 0.5×10^{-3} M $AgNO_3$ concentration and TiO_2 concentrations of 0.24×10^{-4} (a), 1.2×10^{-4} (b), 1.2×10^{-3} (c) and 2.4×10^{-3} M (d).

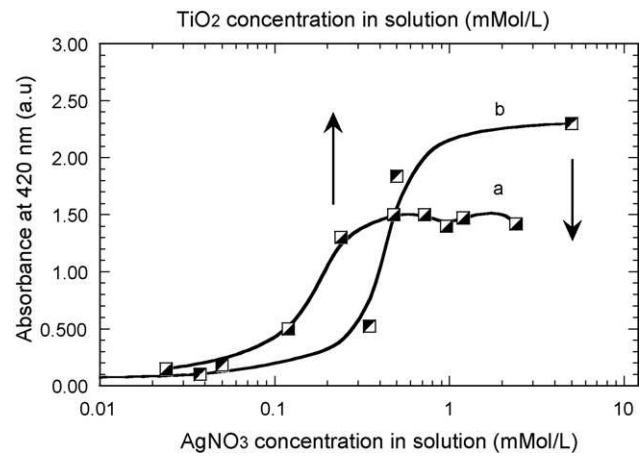


Fig. 5. Intensity of the normalized 420 nm SPR band measured after 15 min UV exposure for solutions of various TiO_2 concentrations ($AgNO_3$ concentration of 0.5×10^{-3} M) (a) and various $AgNO_3$ concentrations (TiO_2 concentration of 1.2×10^{-3} M) (b).

amount firstly suggests an activation of the photo-reduction reaction induced by the photocatalytic activity of TiO_2 nanocrystallites. On the other hand, Fig. 4c and d shows that further increase in the TiO_2 amount does not improve and even reduces the metallization rate. Overall trends illustrated in Fig. 4 suggest, therefore, a competition between photocatalytic activation and UVA light absorption arising from TiO_2 NPs. Above a certain TiO_2 concentration threshold, it is likely that UVA absorption by TiO_2 NPs predominates, which reduces penetration of light within the irradiated solution and thus decreases the metallization yield. Beside, it should be noted that kinetic behaviours illustrated in Fig. 4 do not only depict metallization features but also the aggregation and subsequent decantation of photo-generated metallic particles. Accordingly, for a weak TiO_2 concentration of 2.4×10^{-5} M, particles were visually observed to rapidly decant during UV irradiation, which could also explain why the SPR band illustrated in Fig. 4a for this solution did not significantly increase in intensity over UV exposure. These decantation features will be discussed below. Finally, data illustrated in Fig. 4 can also depict a competition between metallization advancement and UVA light absorption by Ag NPs formed in solution. Indeed, Fig. 3 shows that the SPR band of Ag NPs partly overlaps the emission range of our UVA lamps. Thus, while Ag particles are progressively formed in solution, this latter is expected to absorb more and more UVA light, yielding a decrease in light penetration and a metallization yield reduction over UV exposure.

Previously drawn conclusions are globally confirmed by data illustrated in Fig. 5, which depicts intensity variations of the normalized SPR band measured after 15 min UV exposure as a function of the $AgNO_3$ concentration (TiO_2 concentration) for a fixed TiO_2 concentration ($AgNO_3$ concentration) in the solution. This figure shows that below $AgNO_3$ and TiO_2 concentration thresholds of around 0.1×10^{-3} M, the metallization proceeds extremely slowly. The metallization rate is observed to strongly increase when further increasing the concentration of $AgNO_3$ and TiO_2 up to around 0.5×10^{-3} M. An autocatalytic reduction mechanism can eventually participate in the sudden acceleration of the metallization reaction when increasing the $AgNO_3$ concentration, i.e. initially formed Ag NPs can in turn participate in the photo-reduction mechanism owing to their photochemical activity [33]. Finally, Fig. 5 shows that increasing the reactant concentrations above around 0.5×10^{-3} M does not yield significant improvement in the metallization rate, which is attributed to a predominant UV light absorption by Ag and TiO_2 NPs in the solution, i.e. a reduction of light penetration in the solution exposed to UV.

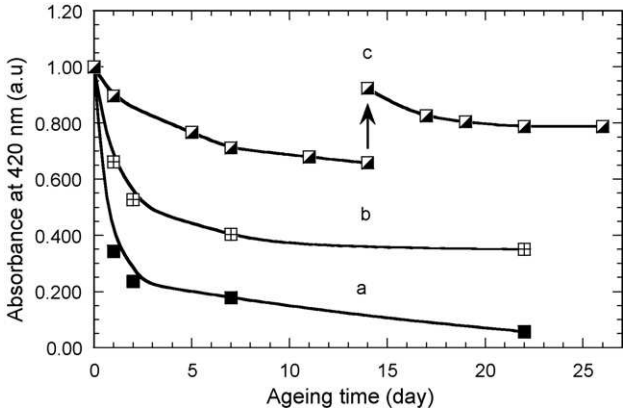


Fig. 6. Stability of Ag NPs in solution over ageing, as deduced from the 420 nm SPR band intensity variations, for solutions previously exposed to UV light for 60 min with an $AgNO_3$ concentration of 0.5×10^{-3} M and TiO_2 concentrations of 2.4×10^{-4} (a), 1.2×10^{-3} (b), and 2.4×10^{-3} M (c). Spectra have been normalized to those measured before ageing. The arrow shows the instant where magnetic stirring has been performed.

3.3. Stability of Ag NPs in solution

From an applicative point of view, a reasonable stability over ageing of NPs formed in solution, i.e. prevention of their decantation, is an important feature to be studied since it determines the reproducible use of our suspensions in the long-term. On the one hand, solutions with high Ag concentrations did not exhibit good stability over ageing. On the other hand, the presence of TiO_2 NPs was observed to impact the solution stability over ageing. As already mentioned, and illustrated in Fig. 4a, for a fixed $AgNO_3$ concentration of 0.5×10^{-3} M, a solution with a very weak TiO_2 concentration (0.24×10^{-4} M) rapidly decants even during UV exposure. Fig. 6 illustrates variations of the SPR band intensity over ageing for three solutions previously exposed to UV light for 60 min with a fixed $AgNO_3$ concentration of 0.5×10^{-3} M and TiO_2 concentrations ranging from 2.4×10^{-4} to 2.4×10^{-3} M. For comparison purpose, SPR band intensities have been normalized to the value measured before ageing. The solution with the weakest TiO_2 amount was visually observed to rapidly decant over ageing, and this decantation yielded a rapid drop and quasi-extinction of the SPR band (Fig. 6a), i.e. a nearly total decantation of Ag NPs. Fig. 6b and c shows that increasing the TiO_2 amount strongly reduces the intensity drop of the SPR band. Ageing for 2 weeks solutions with TiO_2 concentrations of 1.2×10^{-3} and 2.4×10^{-3} M yielded a reduction of the SPR band intensity by 60% and 30%, respectively, which depicted a reduced decantation of silver NPs. No additional decantation was observed with further ageing of these solutions, which were observed to remain naturally stable for several additional weeks. Fig. 6c also shows that, for a solution with the greatest TiO_2 concentration studied here, a simple magnetic stirring for 10 min is sufficient to recover the initial SPR band intensity, i.e. to regenerate the solution. These data indicate that, above a certain threshold value of the $TiO_2/AgNO_3$ ratio, resulting Ag–TiO_2 suspensions can be efficiently stabilized on the long-term. In other words, TiO_2 NPs not only act as photo-reductive reactants, but also play a role of stabilizing agents, similarly to what is commonly reported in the literature for organic stabilizers used in chemical or photochemical reduction procedures. As previously mentioned, pure TiO_2 CS sols exhibit good stability on the long-term, which is attributed to electrostatic repulsion effects between positively charged TiO_2 NPs formed in acidic solution [25]. It is supposed that such electrostatic repulsion effects can also contribute in the stabilisation of Ag NPs, provided that the initial $TiO_2/AgNO_3$ molar ratio in the solution is close to an optimal threshold value. For conditions illustrated in Fig. 6, we can infer a threshold value corresponding to a $TiO_2/AgNO_3$ molar ratio of around 5. According to metallization and stability features illustrated in Figs. 3–6, following parts of this work will be focused on optimized Ag–TiO_2 suspensions arising from solutions exposed to UV light for 60 min with 0.5×10^{-3} M $AgNO_3$ and 2.4×10^{-3} M TiO_2 concentrations.

3.4. Structural and morphological features

Fig. 7 illustrates TEM images of particles deposited on a carbon grid from the optimized Ag–TiO_2 suspension. Owing to weight contrast effects, silver particles are expected to produce darker features than TiO_2 ones. Darker spots observed in Fig. 7 are thus attributed to metallic silver particles while grey spots correspond to TiO_2 rich areas. From the analysis of several low magnification TEM and high magnification HRTEM images, it was deduced that most silver particles had a diameter ranging between 2 and 15 nm. Besides, lines observed in HRTEM images of Fig. 7b and c correspond to reticular planes, which indicate the crystalline state of silver particles. It is illustrated in Fig. 7d, which shows the diffraction pattern derived from a FFT of the HRTEM image displayed in Fig. 7c. An indexation of this pattern depicts a particle orientated along the [0 1 1] zone axis of the centred face cubic (CFC) structure of metallic silver, and white spots observed in the pattern are assigned to three reticular plane families of this structure, i.e. (−1 1 −1), (1 1 −1), and (2 0 0) planes. The analysis of various patterns allowed a systematic assignment of reticular planes to the CFC structure of metallic silver. These observations, in agreement with plasmon features illustrated in Fig. 3, prove the metallic state of silver NPs formed through our photocatalytic reduction process. TiO_2 particles in the anatase structure were also clearly put in evidence from FFTs of various HRTEM images (not illustrated here).

Fig. 8a shows a typical FEG-SEM image of a silicon substrate covered with particles derived from the optimized Ag–TiO_2 suspension. Owing to weight contrast between silver particles and TiO_2 ones (together with the silicon substrate), white spots observed in this image are assigned to silver nanoparticles. It is observed that so-formed particles do not continuously coat the substrate but are rather homogeneously dispersed on its surface. A small number of large particles can be evidenced in this figure which were not observed by TEM. However, as illustrated in the insert of Fig. 8a, image counting performed from FEG-SEM inspections confirmed the rather narrow size distribution of Ag NPs deduced from TEM investigations, since 90% of silver NPs presented diameters ranging from 2 to 15 nm. It is worthy to mention that similarly small Ag particles have been reported to be very effective against *E. coli* bacteria [12,34]. Actually, small size effects have been reported to be at the origin of an enhanced reactivity of such nanoparticles [12,35].

3.5. Metallization degree of silver particles

Fig. 9 shows the typical Ag_{3d} doublet spectrum measured on a silicon substrate coated with an Ag–TiO_2 suspension. $Ag_{3d5/2}$ and $Ag_{3d3/2}$ components of the doublet are depicted by binding energies of around 368 and 374 eV, respectively. This doublet illustrates the presence of silver particles at the substrate surface. Energy positions of XPS peaks can, in principle, provide information on the oxidation degree of noble metals. However, in the case of silver, data of the literature show that $Ag_{3d5/2}$ peak energies of metallic silver (Ag) and silver in its most probable oxidation state (Ag_2O) lie in the very narrow range of 367.6–368.3 eV [36], which does not allow drawing reliable conclusions on the silver oxidation degree. For this reason, the modified Auger parameter was studied. As previously mentioned, this parameter relies on the sum of the $Ag_{3d5/2}$ photoelectron binding energy and of the $Ag_{M4N45N45}$ Auger electron kinetic energy. Auger parameter values of around 725.8–726 eV

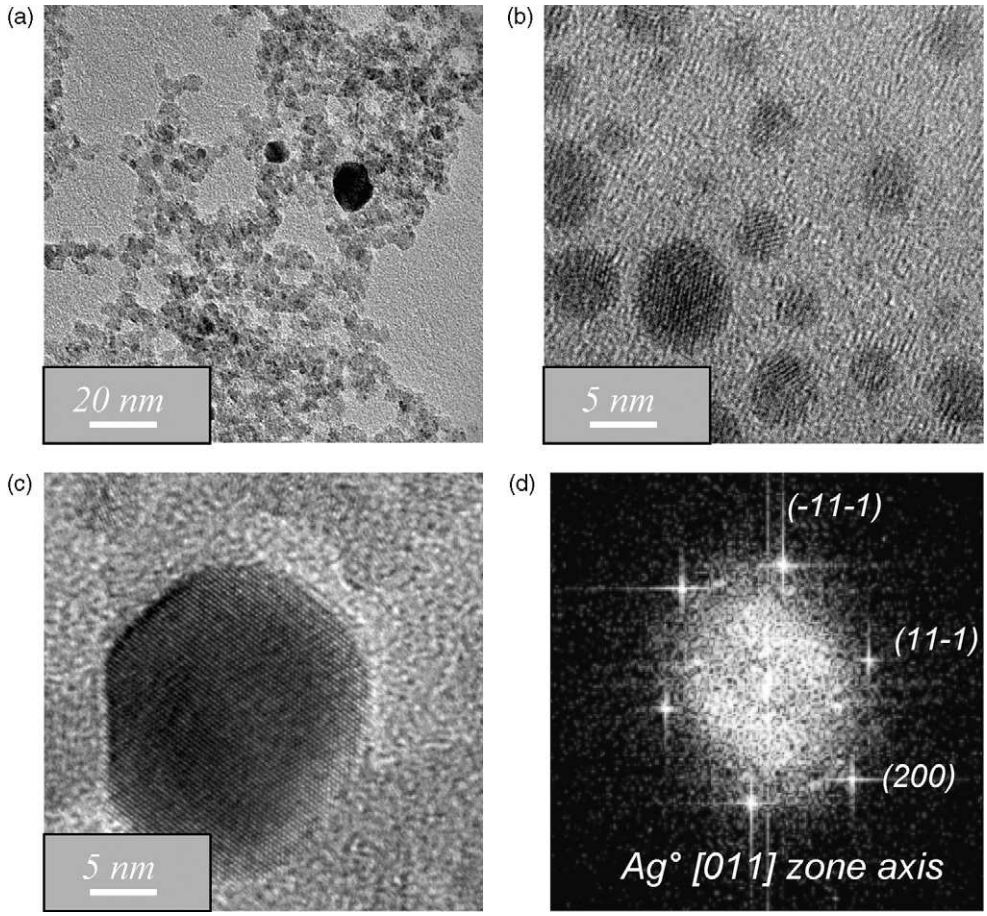


Fig. 7. Low magnification TEM image of silver (dark contrast) and TiO_2 (grey contrast) particles (a), and HRTEM images of silver NPs (b and c). Fig. 6d illustrates an electron diffraction pattern derived from FFT of the HRTEM image displayed in Fig. 6c.

were reproducibly measured on several samples, which demonstrated the accurate determination of this parameter. Literature data show that silver in its Ag_2O or (less probable) AgO oxidized forms yields an Auger parameter in the 724–724.8 eV range, while metallic silver yields an Auger parameter in the 726–726.3 eV range [37–39]. Thus, values measured on our samples appear to be rather close to those mentioned for metallic silver. However, since our Auger parameter values are slightly weaker than those mentioned for metallic silver, it suggests a slight oxidation degree, which probably depicts the formation of an oxide layer at the surface of metallic NPs. Thus, XPS data support conclusions previously drawn from UV/vis spectroscopy and TEM characterizations showing that metallic particles have been formed in solution. From these different observations, we conclude that photo-reduction of $AgNO_3$, i.e.

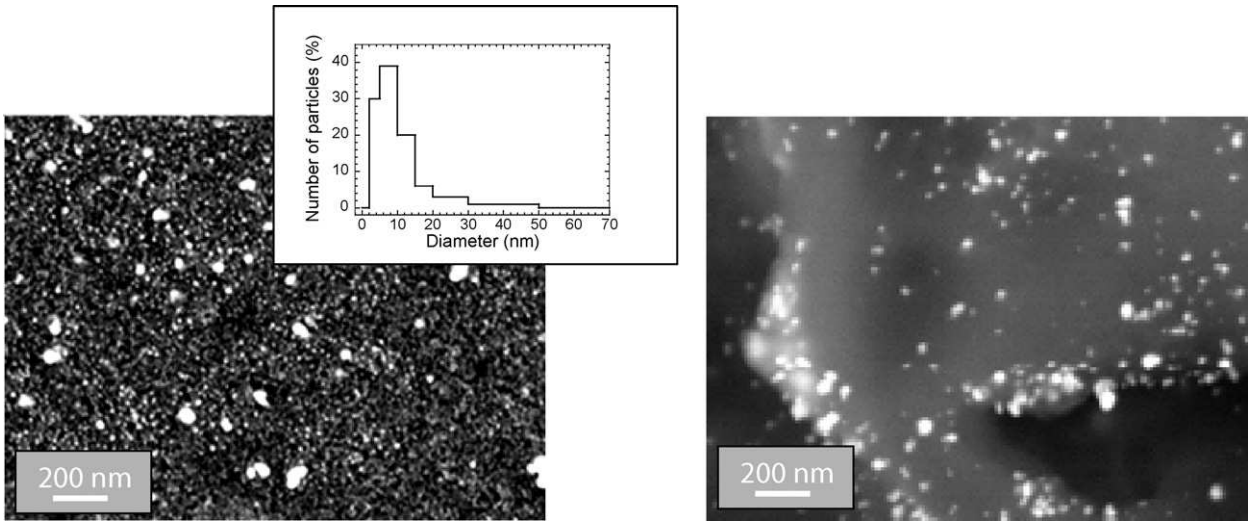


Fig. 8. FEG-SEM images of silver NPs (white spots) dispersed on a silicon wafer (a) and impregnated on a cotton-based textile (b). The insert shows the size distribution of silver NPs illustrated in Fig. 7a.

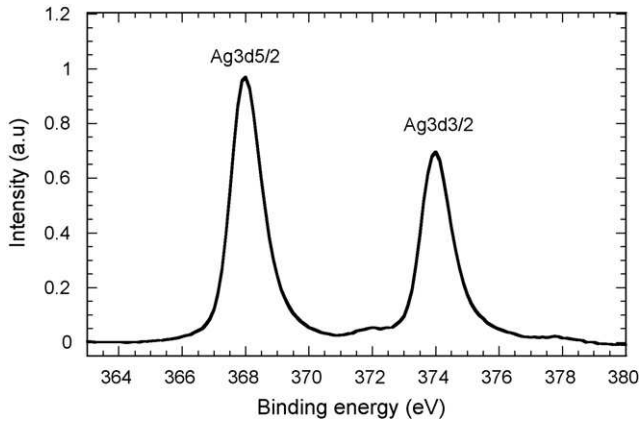


Fig. 9. XPS spectrum of the Ag_{3d} doublet measured for silver NPs dispersed on a silicon wafer. The spectrum has been normalized to intensity of the $Ag_{3d5/2}$ peak.

the photo-metallization reaction, has probably gone to completion in present conditions.

3.6. Textile impregnation

The FEG-SEM image of a textile sample impregnated with an Ag–TiO_2 suspension is illustrated in Fig. 8b. This image shows that, similarly to what occurs on silicon, silver particles (white spots) do not continuously coat the textile fibres but are rather uniformly dispersed at the fibre surfaces. The size of Ag particles illustrated in Fig. 8b is rather similar to that illustrated in Fig. 8a for a silicon substrate. However, smallest particles appearing in Fig. 8a cannot be appreciated in Fig. 8b, which is probably due to some sensitivity limitations of the controlled pressure FEG-SEM used to characterize textile samples. Energy dispersive X-ray (EDX) analyses performed on such samples depicted a Ti/Ag atomic ratio of around 5 (not illustrated here) which suggested that, in our textile impregnation procedure, TiO_2 and Ag NPs were deposited au prorate of the TiO_2 and Ag concentrations in the mixed solution. To provide a first insight in the yield of our whole process, weight measurements were performed on five textile samples, before and after the impregnation/wringing procedure (without drying at 110 °C). In that way, pick-up of the finishing solution normalized to the bare textile weight could be estimated to be 67 ± 4 wt%. From this average value and taking into account the weight percentage of Ag in the solution (assuming a total photo-metalization process according to previously discussed data), we could finally estimate the amount of impregnated silver NPs per surface unit of textile to be around 1.16×10^{-2} g/m^2.

3.7. Antibacterial tests

To assess the antibacterial efficiency of our finished textile fabrics, Ag–TiO_2 suspensions were first diluted in absolute ethanol by a factor 1–10. Textile samples were then impregnated through a pad-coating procedure within resulting suspensions and antibacterial tests were finally performed against Gram-negative *E. coli* and Gram-positive *L. innocua* bacteria. Preliminary tests indicated that control textiles, as well as textiles impregnated with only TiO_2, did not exhibit any antibacterial effect against *E. coli*. These features are globally illustrated in Fig. 10, which typically shows Petri dishes after a 24 h incubation time of *E. coli* at the surface of textile supports. A dense population of bacterial colonies appears after incubation on a control textile (Fig. 10a) and textile only impregnated with TiO_2 particles (Fig. 10b). On the one hand, these observations suggest that textile fabrics, especially those made from natural fibres (cotton-based), can provide excellent conditions

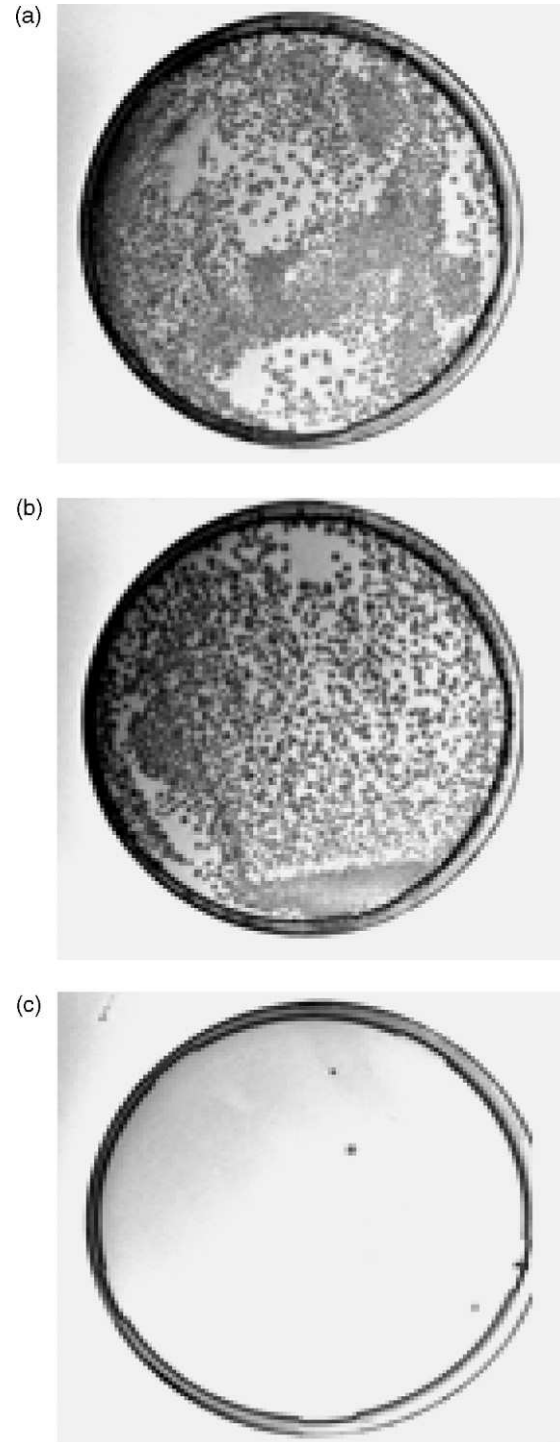


Fig. 10. Typical observations of Petri dishes after incubation of *E. coli* bacteria for 24 h at the surface of a control textile (a), a textile only impregnated with TiO_2 NPs (b), and a textile impregnated from an Ag–TiO_2 suspension (c).

for the growth and proliferation of different bacterial strains. On the other hand, they indicate that TiO_2 particles also allow the development of biological cells, which is in agreement with previous works performed in our laboratory showing the biocompatibility of sol–gel derived TiO_2 thin films [40]. Actually, it has been shown by other authors that TiO_2 NPs are not antibacterial in the absence of UV light [41]. In contrast, as illustrated in Fig. 10c, any cultivable bacteria could not be counted after 24 h of incubation on a textile impregnated from an Ag–TiO_2 suspension. Since TiO_2 NPs are not

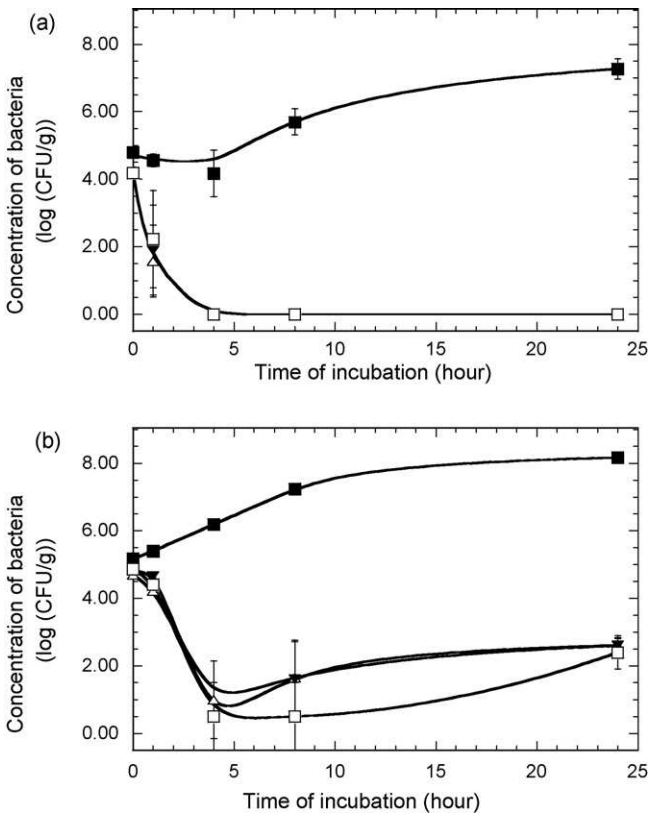


Fig. 11. Evolution kinetics of *E. coli* (a) and *L. innocua* bacteria (b) at the surface of a control textile (■), and textiles impregnated from Ag–TiO_2 suspensions, prepared as described in the text, and subsequently diluted in ethanol by a factor 1 (Δ), 5 (▼), and 10 (□).

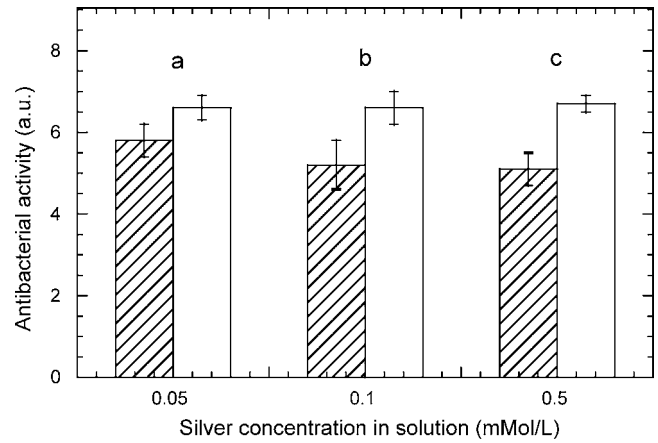


Fig. 12. Antibacterial activity against *L. innocua* (left) and *E. coli* (right), according to the ISO 20743/2005 standard, for textiles impregnated from Ag–TiO_2 suspensions, prepared as described in the text, and subsequently diluted in ethanol by a factor 10 (a), 5 (b), and 1 (c).

antibacterial in present experimental conditions, i.e. in the absence of UV light, Fig. 10c provides a first illustration of the antibacterial efficiency of textiles functionalized with Ag NPs.

This antibacterial efficiency was more precisely assessed by plotting log (CFU/g) as a function of the incubation time on various textile samples. Corresponding evolutions are illustrated in Fig. 11a and b for *E. coli* and *L. innocua* cells, respectively. Data illustrated in these figures first confirm that control textiles provide a good environment for bacterial growth. Both strains of bacteria are able to develop at the surface of textiles without Ag, which is depicted by an increasing number of colonies by approximately 2 log (CFU/g) after 24 h of incubation. In contrast, Fig. 11a and b clearly shows that Ag-treated textiles are effective against both bacteria. After a short incubation of 4 h, the number of both kinds of cells decreases by approximately 4 log (CFU/g). It means that the antibacterial effect of silver NPs is not restrained to a simple bacterial growth inhibition but effectively yields a nearly total mortality of bacterial cells. However, Fig. 11a and b also shows that further increase of the incubation duration induces some kinetic differences in relation to the bacteria nature. On the one hand, in the case of *E. coli*, quite no more viable bacteria are detected when increasing the incubation time from 4 to 24 h. On the other hand, for *L. innocua*, the number of cells gradually increases from a log (CFU/g) value of 0–1, reached after 4 h of incubation, to a log (CFU/g) value of about 2.5 after 24 h of incubation. It indicates a bi-regime evolution where (i) *L. innocua* bacteria are first efficiently, but not in their totality, killed at the contact of silver NPs, and (ii) a few surviving cells can develop again after a longer incubation time. Since silver particles do not continuously coat the textile fibres (Fig. 8b), it is inferred that some cells can eventually survive and undergo further development on textile areas poorly impregnated with silver, similarly to what is observed on a control textile. Besides, we have previously indicated that a majority of Ag NPs studied in this work exhibit diameters ranging from 2 to 15 nm. It has been shown that very small NPs can pass through the external wall of bacterial cells, i.e. break the peptidoglycan layer, and thereby destroy many Gram-positive and Gram-negative bacterial cells [42]. However, since the peptidoglycan layer in the former is substantially thicker than in the latter, Gram-positive bacteria are inferred to oppose an enhanced resistance to the antibacterial effects of active species. These remarks may explain some differences illustrated in Fig. 11a and b.

The most striking feature depicted in these figures, in presently studied conditions, is the absence of very significant influence of the impregnated silver amount on the antibacterial activity of functionalized textile fabrics. Indeed, Fig. 11a and b shows that, for both strains of studied bacteria, the impregnation of textile fabrics in suspensions, whose Ag concentration varies from 0.5×10^{-4} to 0.5×10^{-3} M, yields quite similar antibacterial kinetics. Influence of the impregnated silver amount has also been assessed through a quantification of the antibacterial activity according to the ISO 20743/2005 standard (see Section 2). Antibacterial activities are reported in Fig. 12 for functionalized textiles illustrated in Fig. 11a and b. Based on the standard definition, strong activities of 6.6 ± 0.4 and 5.5 ± 0.8 are deduced for *E. coli* and *L. innocua*, respectively, whatever the amounts of impregnated particles studied in this work. These data provide new illustration that (i) for fixed bacteria natures, a similarly strong antibacterial activity can be conferred to textile fabrics for a large range of impregnated silver amounts, and (ii) *L. innocua* can eventually oppose a stronger resistance than *E. coli* to the antibacterial activity induced by silver NPs.

3.8. Potential of our finished textiles: discussion

These studies firstly indicate the effectiveness of metallic silver NPs formed through our photocatalytic protocol. This result is in agreement with previous works devoted to the antibacterial functionalization of textile fabrics by plasma-deposited Ag NPs [26]. Generally speaking, the antibacterial activity of silver cations (silver salts or other silver compounds) and, more recently, that of silver nanoparticles, has been well established. Several studies propose that Ag NPs may attach to the surface of the cell membrane and disturb permeability and respiration functions of the cells. Smaller NPs having the larger surface area available for interaction would give more bactericidal effect than larger ones [43]. As already mentioned, it is possible that smallest Ag NPs not only interact with the surface of membrane, but can also penetrate inside the bac-

teria [12,42]. As established by the theory of hard/soft acids and bases, metallic silver particles are prone to react with phosphorus and sulphur compounds of the cell membrane [44,45]. In this hypothesis, interaction of Ag NPs with bacteria membranes is logically expected to depend on the active particle surface area, and smaller Ag particles are thus supposed to induce higher antibacterial activity than larger ones [46]. Another possibility to explain the antibacterial effect of metallic silver NPs would rely on the release of silver cations from nanoparticles, i.e. owing to their surface oxidation, such NPs would act as a tank of active silver cations [47]. According to the literature, the overall charge of bacteria at biological pH values is negative because of an excess number of carboxylic or other groups which, upon dissociation, make the cell surface electrically negative [48]. Hamouda and Baker have shown that the charge of antibacterial species can in turn be crucial for their activity [49].

Of course, the present work does not add to the knowledge in exact mechanisms involved in the antibacterial activity of metallic silver NPs, but it clearly reinforces the importance to study such NPs for antibacterial applications on textile fabrics. Our studies showed that a reduced quantity of impregnated Ag NPs was sufficient to confer a strong antibacterial activity to cotton-based textiles, and an excessive amount of antibacterial NPs did not add to this activity. This observation has an important consequence for practical applications. Due to plasmon effects, as illustrated in Fig. 3, an excessive amount of impregnated silver NPs can induce a brownish coloration of functionalized textiles. This feature is illustrated in Fig. 13c for a textile sample impregnated from a 0.5×10^{-3} M Ag suspension. The homogenous coloration shown in this figure provides an indication of the uniform distribution of silver NPs through textile fibres. However, such coloration generally appears to be an undesired event in practical applications. As shown in Fig. 13b, impregnation from a same suspension further diluted in ethanol by a factor 5 totally cancels coloration effects and allows preserving the visual aspect of a control textile (Fig. 13a). In the same time, data illustrated in Figs. 11 and 12 show that the absence of coloration induced by such a dilution does not reduce the antibacterial activity of impregnated textiles.

For practical uses of textile fabrics, it is generally required that finishing treatments exhibit sufficient fastness and strength in order to withstand friction damages and washing cycles. Fastness and strength of the finishing treatment in turn depend on the nature of bonds formed at the textile fibre surface, e.g. covalent bonding or physical attachment. In the present state, we are not in position to assess which kinds of bonds are formed at the fibre surface. However, a simple test already described in our previous paper [50] provided first insights in the fastness and strength of our finishing treatment. Textile samples were impregnated from an Ag–TiO_2 suspension, immersed in water, and then exposed to several ultrasonic agitation experimentations in a conventional ultrasound bath. The samples were then dried for 10 min at 110 °C, to remove water eventually impregnated within textile fibres during ultrasonication, and subsequently characterized through weight measurements and EDX analyses (not illustrated here). Weight measurements showed that, after 10 min of ultrasonification, the weight of impregnated matter was reduced by around 40% and did not evolve with further exposure to ultrasonic agitation. In the same time, EDX analyses indicated that the Ag/Ti atomic ratio was reduced by around 35% after a first ultrasound exposure of 10 min and did not evolve either with further exposure to ultrasounds. While we can still not conclude on the nature of bounds formed at the fibre surface, these results suggest that at least a part of Ag antibacterial species remain rather firmly bonded on textile fabrics. Of course, these tests do not account for true practical conditions and we cannot claim that, in the present state, our finishing treatment can withstand intensive friction damages or washing cycles, while preventing an unacceptable loss of antibacterial activity. These aspects should be the object of further specific investigations and eventual additional optimizations of our protocol.

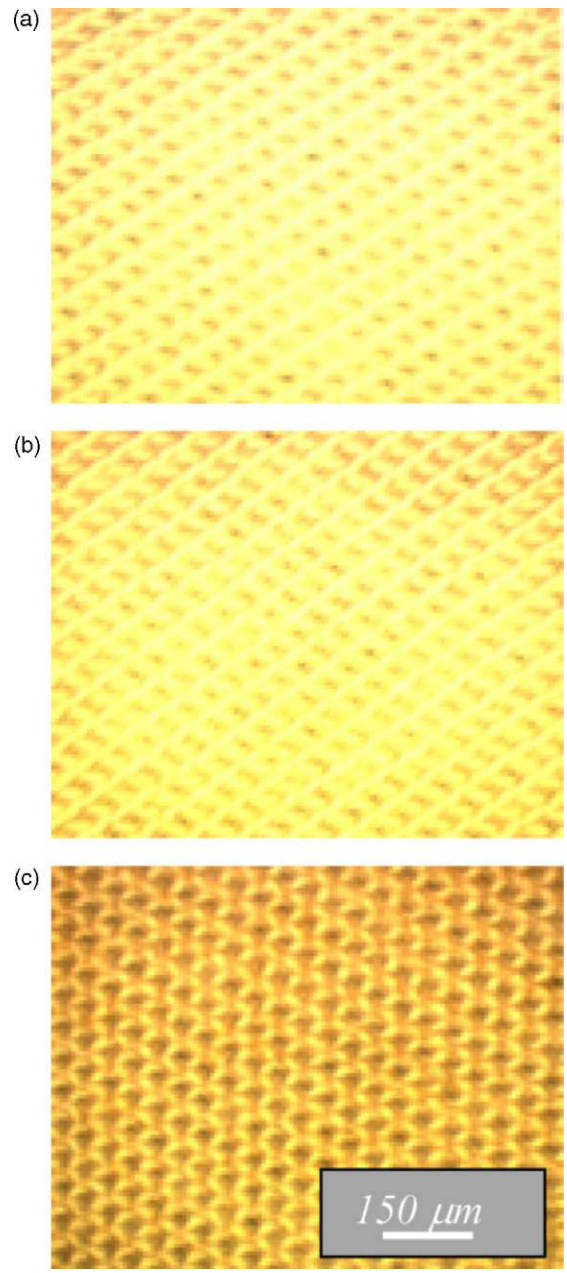


Fig. 13. Visual aspect of a control textile (a) and textiles impregnated from Ag–TiO_2 suspensions, prepared as described in the text, and subsequently diluted in ethanol by a factor 5 (b), and 1 (c). Scale bar is the same for all images.

4. Conclusion

An all-inorganic protocol, entirely based on wet chemistry methods, has been studied to form Ag NPs in solution. Liquid suspensions of anatase TiO_2 nanocrystallites have first been prepared through a sol–gel route. Silver NPs have then been generated through the photocatalytic reduction of silver nitrate diluted in TiO_2 liquid suspensions exposed to UV light, which results in the formation of a mixed Ag–TiO_2 suspension. UV/vis spectroscopy studies show that photo-metallization mechanisms leading to silver NPs are strongly influenced by the UV exposure duration in

relation to $AgNO_3$ and TiO_2 concentrations in solution. It is also shown that an excess of TiO_2 in the solution allows preventing fast decantation of so-formed Ag–TiO_2 liquid suspensions over post-metallization ageing, i.e. TiO_2 NPs in liquid suspensions not only act as photo-reductive reactants but also play a role of stabilizing agents. Chemico-structural and morphological characterizations of derived Ag particles demonstrate their metallic state, as well as their small size and rather narrow size distribution. Ag–TiO_2 suspensions have then been impregnated on cotton-based textile samples and the antibacterial activity of so-functionalized textiles has been studied with respect to *E. coli* and *L. innocua* bacteria. For both kinds of bacteria, functionalized textiles exhibit a strong antibacterial activity in a large range of impregnation conditions. It has been shown that TiO_2 particles, used to form Ag ones in solution, do not act in this antibacterial activity, which is entirely induced by photo-generated Ag NPs. Though, compared to *E. coli*, *L. innocua* exhibits in some extent a greater resistance to the antibacterial activity, these studies clearly demonstrate the effectiveness of silver NPs for antibacterial applications on textile samples. Besides, since this antibacterial activity is obtained even for reduced impregnated silver amounts, it has been possible to prevent any undesired textile coloration arising from silver NPs while keeping a strong activity of functionalized textiles. Further investigations are still needed to check how our impregnation protocol can allow withstanding friction damages and washing cycles for practical use applications.

Acknowledgements

This work was performed in the frame of the ACTIPROTEX research project supported by Techtera, the competitiveness cluster for technical and functional textiles based in the Rhône-Alpes Region in France, and by the French government (dgcis). The authors gratefully thank the Rhône-Alpes Region for financial support. They also thank partners from “Science et Surface” (Ecully, France) for their technical and scientific support in XPS measurements.

References

[1] B. Mahltig, D. Fiedler, H. Böttcher, J. Sol–Gel Sci. Technnol. 32 (2004) 219.
[2] I. Holme, Coloration Technol. 123 (2007) 59.
[3] B. Mahltig, H. Haufe, H. Böttcher, J. Mater. Chem. 15 (2005) 4385.
[4] R. Purwar, M. Joshi, AATCC Rev. 4 (2004) 22.
[5] P.K. Stoimenov, R.L. Klinger, G.L. Marchin, K.J. Klabunde, Langmuir 18 (2002) 6679.
[6] A.W. Bosman, H.M. Janssen, E.W. Meijer, Chem. Rev. 99 (1999) 1665.
[7] S.T. Dubas, P. Kumlangdudsana, P. Potiyaraj, Colloids Surf. A 289 (2006) 105.
[8] C. Yang, G. Liang, K. Xu, P. Gao, B. Xu, J. Mater. Sci. 44 (2009) 1894.
[9] J. Snouqiang, E. Newton, Y. Chun-Wah Marcus, K. Chi-Wai, Text. Res. J. 77 (2007) 85.
[10] P. Kulpinski, e-Polym. art.no.68 (2007).
[11] H.Y. Lee, H.K. Park, Y.M. Lee, K. Kim, S.B. Park, Chem. Commun. 15 (2007) 2959.
[12] J.R. Morones, J.L. Elechiguerra, A. Camacho, K. Holt, J.B. Kouri, J.T. Ramírez, M.J. Yacaman, Nanotechnology 16 (2005) 2346.
[13] M. Singh, S. Singh, S. Prasada, I.S. Gambhir, Dig. J. Nanomater. Bios. 3 (2008) 115.
[14] S.-H. Choi, Y.-P. Zhang, A. Gopalan, K.-P. Lee, H.-D. Kang, Colloids Surf. A 256 (2005) 165.
[15] T. Takeshi, W. Norihisa, T. Masaharu, Appl. Surf. Sci. 211 (2003) 189.
[16] C. Johans, J. Clohessy, S. Fantini, K. Kontturi, V.J. Cunnane, Electrochem. Commun. 4 (2002) 227.
[17] A. Taleb, C. Petit, M.P. Pileni, Chem. Mater. 9 (1997) 950.
[18] Z. Li, Y. Li, X.-F. Qian, J. Yin, Z.-K. Zhu, Appl. Surf. Sci. 250 (2005) 109.
[19] S. Eustis, M.A. El-Sayed, Chem. Soc. Rev. 35 (2006) 209.
[20] M. Brust, J. Fink, D. Bethell, D.J. Schiffri, C. Kiely, J. Chem. Soc. Chem. Commun. 16 (1995) 1655.
[21] J. Turkevich, P.C. Stevenson, J. Hillier, Discuss. Faraday Soc. 11 (1951) 55.
[22] M. Brust, M. Walker, D. Bethell, D.J. Schiffrin, R. Whyman, J. Chem. Soc. Chem. Commun. 7 (1994) 801.
[23] S. Pal, Y.K. Tak, J. Myong Song, Appl. Environ. Microbiol. 73 (2007) 1712.
[24] M. Burgos, M. Langlet, J. Sol–Gel Sci. Technol. 16 (1999) 267.
[25] M. Langlet, A. Kim, M. Audier, J. Mater. Sci. 38 (2003) 3945.
[26] E. Chadeau, N. Oulahal, L. Dubost, F. Favergeon, P. Degraeve, Food Control 21 (2010) 505.
[27] A. Wold, Chem. Mater. 5 (1993) 280.
[28] M. Langlet, A. Kim, M. Audier, C. Guillard, J.M. Herrmann, Thin Solid Films 429 (2003) 13.
[29] P.V. Kamat, J. Phys. Chem. B 106 (2002) 7729.
[30] A.L. González, C. Noguez, Comput. Theor. Nanosci. 4 (2007) 231.
[31] C. Sonnichsen, T. Franzl, T. Wilk, G.V. Plessen, J. Feldmann, New J. Phys. 4 (2002) 93.
[32] J.J. Mock, M. Barbic, D.R. Smith, D.A. Schultz, S. Schultz, J. Chem. Phys. 116 (2002) 6755.
[33] S.K. Ghosh, S. Kundu, M. Mandal, S. Nath, T. Pal, J. Nanoparticle Res. 5 (2003) 577.
[34] J. Kim, E. Kuk, K. Yu, J.O. Kim, S. Park, H. Lee, S. Kim, Y. Park, Y. Park, C. Hwang, Nanomed. Nanotechnol. 3 (2007) 95.
[35] A. Panáček, L. Kvítek, R. Prucek, M. Kolář, R. Veeřová, N. Pizúrová, V.K. Sharma, T. Nevěná, R. Zbořil, J. Phys. Chem. B 110 (2006) 16248.
[37] G. Schoen, Acta Chem. Scand. 27 (1973) 2623.
[38] S.W. Gaarenstroom, N. Winograd, J. Chem. Phys. 67 (1977) 3500.
[39] V.K. Kaushik, J. Electron Spectrosc. 56 (1991) 273.
[40] M. Manso, M. Langlet, M. Fernández, L. Vázquez, J.M. Martínez-Duart, Mater. Sci. Eng. C 23 (2003) 451.
[41] J.-Y. Choi, K.-H. Kim, K.-C. Choy, K.-T. Oh, K.-N. Kim, J. Biomed. Mater. Res. B Appl. Biomater. 80B (2007) 353.
[42] V.K. Sharma, R.A. Yngard, Y. Lin, Adv. Colloid Interf. Sci. 145 (2009) 83.
[43] L. Kvitek, A. Panaček, J. Soukupova, M. Kolar, R. Vecěrova, R. Prucek, M. Holecova, R. Zboril, J. Phys. Chem. C 112 (2008) 5825.
[44] D.W. Hatchett, H.S. White, J. Phys. Chem. 100 (1996) 9854.
[45] A. Sten, J. Chatt, N.R. Davies, Q. Rev. Chem. Soc. 12 (1958) 65.
[46] L. Chun-Nam, H. Chi-Ming, C. Rong, H. Qing-Yu, Y. Wing-Yiu, S. Hongzhe, T. Paul Kwong-Hang, C. Jen-Fu, C. Chi-Ming, J. Biol. Inorg. Chem. 12 (2007) 527.
[47] P.L. Taylor, O. Omotoso, J.B. Wiskel, D. Mitlin, R.E. Burrell, Biomaterials 26 (2005) 7230.
[48] S.M. Raffi, F. Hussain, T.M. Bhatti, J.I. Akhter, A. Hameed, M.M. Hasan, J. Mater. Sci. Technol. 24 (2008) 192.
[49] T. Hamouda, J.J. Baker, J. Appl. Microbiol. 89 (2000) 397.
[50] M. Messaoud, M. Houmard, S. Briche, F. Roussel, M. Langlet, J. Sol–gel Sci. Technol. (2010), first published on line, doi:10.1007/s10971-010-2240-7.

ANNEXE 4

SIMS Proceedings Papers

SURFACE and INTERFACE ANALYSIS

Received: 10 September 2009 Revised: 31 May 2010 Accepted: 31 May 2010 Published online in Wiley Interscience:

(www.interscience.wiley.com) DOI 10.1002/sia.3654

ToF-SIMS and XPS characterization of antimicrobial textiles for the food processing industry

Céline Brunon,[a] François Bessueille,[a] Carol Grossiord,[b] Elise Chadeau,[c] Nadia Oulahal,[c] Christine Darroux,[d] Isabelle Ferreira,[d] Michel Bourgeois,[d] Farida Simon,[e] Fabrice Rimbault,[f] Caroline Yu[f] and Didier Leonard[a]*

Textiles for the food processing industry are treated by a patented technology combining an ionic polymer (antimicrobial agent) and a precipitating agent to obtain an insoluble deposit expected to exhibit antimicrobial properties. ToF-SIMS and XPS are used in the understanding of the surface chemistry at various steps of treatments (cleaning step prior to surface modification, antimicrobial deposit, industrial ISO 15797 washing). ToF-SIMS and XPS analyses show that the signatures of the antimicrobial treatment are detected at the surface after treatment. After industrial ISO 15797 washings, the precipitating agent is rapidly removed (possibly replaced by washing agent components) while the antimicrobial agent (PHMB) is still detected but is significantly removed from the surface after five washings. ToF-SIMS and XPS data are compared to microbiological tests specifically intended in relation with food processing industry applications. After the antimicrobial treatment, the surface is biocide as well as after a single ISO 15797 washing, but after 5 washings, either the surface is slightly active (cotton-based textile) or not active anymore (polyester-based textile). The XPS N atomic percentage variation is unable to explain this difference. Even though a slight difference is observed for the ToF-SIMS normalized intensity for m/z = 184.1561 (PHMB molecular peak) between C/P and P/C samples, it can hardly be concluded that this would be the only explanation for the difference in activity. ToF-SIMS indicates that cotton is the textile component still detected at the surface of the washed samples. This could play a role in the remaining efficiency of the antimicrobial treatment after industrial washing. **Copyright © 2010 John Wiley & Sons, Ltd.**

Keywords: ToF-SIMS; XPS; textiles; antimicrobial treatment; washing; food processing industry

Introduction

Textiles have been, so far, mostly analyzed by surface analysis techniques (such as XPS, ToF-SIMS, SEM, . . .) to study the presence of surfactants and the effects of the laundering processes.[1–4] On the other hand, the surface of textiles is known to play a key role in the development of skin diseases and nosocomial infections.[5] In fact, textile materials provide an excellent environment for micro-organisms to grow, because of their large surface area and ability to retain moisture.[5] Textiles are thus potential carriers of micro-organisms, which can cause several defects such as deterioration of strength and quality or staining of textiles, odour generation and health concerns. Consequently, there is an increasing interest in the use of antimicrobial agents grafted at the surface of textiles used in several application fields and, more especially, in the food processing industry.[5]

Surface analysis techniques such as XPS, SEM, AFM and TEM have been used, so far, to characterize the so-called antimicrobial textiles[2,6,7] but even though ToF-SIMS exhibits several key advantages in this context (sensitivity, molecular fingerprinting . . .), it has not been used yet for such a development. In this work, we propose to specifically address the original information provided by ToF-SIMS characterization in a pluridisciplinar study aimed at developing new types of antimicrobial textiles to be used in the food processing industry. More precisely, textiles for the food processing industry are treated by a patented technology combining an ionic polymer (antimicrobial agent) and a precipitating agent to obtain an insoluble deposit expected to exhibit antimicrobial properties. ToF-SIMS as well as XPS are used to study the surface chemistry at various steps of treatments (cleaning step prior to surface modification, antimicrobial coating,

* *Correspondence to: Didier Leonard, Université de Lyon, Lyon, France. Laboratoire des Sciences Analytiques (LSA), CNRS, UMR 5180, Bât. J. Raulin, 5eme Et., Université Claude Bernard-Lyon 1, 43 Boulevard du 11 Novembre 1918, Villeurbanne, 69622, France. E-mail: didier.leonard@univ-lyon1.fr*

a *Université de Lyon, Lyon, France. Laboratoire des Sciences Analytiques (LSA), CNRS, UMR 5180, Bât. J. Raulin, 5eme Et., Université Claude Bernard-Lyon 1, 43 Boulevard du 11 Novembre 1918, Villeurbanne, 69622, France*

b *Science et Surface, 64, Chemin des Mouilles, 69130 Ecully, France*

c *Université de Lyon, Lyon, France. IUTA-Lyon1–site de Bourg en Bresse, Département Génie Biologique, Laboratoire de Recherche en Génie Industriel Alimentaire, EA 3733, Rue Henri de Boissieu, 01060 Bourg en Bresse Cedex 9, France*

d *Institut Français Textile et Habillement (IFTH). Avenue Guy de Collongue, 69130 Ecully, France*

e *TDV Industrie, 43 Rue du Bas des Bois, BP 121, 53012 Laval Cedex, France*

f *Centre Technique de la Teinture et du Nettoyage (CTTN), BP 41, Avenue Guy de Collongue, 69131 Ecully, France*

 Copyright © 2010 John Wiley & Sons, Ltd.

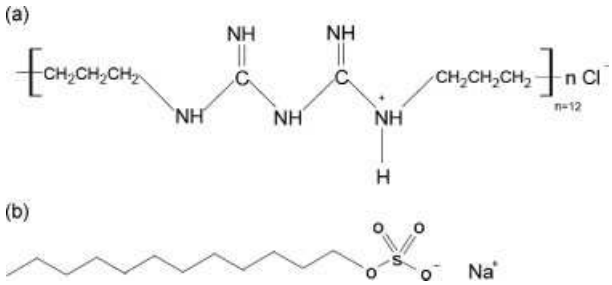


Figure 1. Chemical structures of: a) PolyHexaMethyleneBiguanide (PHMB) hydrochloride; and b) sodium laurylsulphate (LS).

industrial ISO 15 797 washing) and correlation is attempted to microbiological characterization specifically intended in relation with the food processing industry applications. For such a purpose, a *Listeria innocua* strain similar to *Listeria monocytogenes* is used. Food represents, indeed, the major source of *Listeria monocytogenes* infections, the causative agent for listeriosis in humans and animals.[8]

Experimental

Textile samples and household ECE washing procedure

Textile industrial samples (TDV Industries, Laval, France) are either 65% cotton/35% polyester (hereafter named C/P), or 65% polyester/35% cotton (named P/C). Raw products were made available for surface characterization, but to fit with industrial procedures, samples were systematically washed prior to any further treatment. This household washing step (hereafter named ECE washing) was performed using the standardized ECE washing powder (NF EN 26 330). The ECE washing powder (James H Heals & Co, Halifax, England) was also made available to be analyzed as a reference sample.

Antimicrobial treatment

The ECE washed samples were treated using a patent developed by coauthors. The IFTH (Institut Français du Textile et de l'Habillement, Ecully, France) patent (Patent EP 0955 069)[9] is based on a complexation between an ionic polymer and a precipitating agent: PolyHexaMethyleneBiguanide (PHMB) hydrochloride (antimicrobial agent) and sodium laurylsulphate (LS), respectively (Fig. 1). The chemical reaction between PolyHexaMethyleneBiguanide hydrochloride (cation) and sodium laurylsulphate (anion) leads to the deposition of an insoluble salt and a soluble salt: biguanidium laurylsulphate and sodium chloride, respectively. The insoluble salt is expected to exhibit antimicrobial properties.

ISO 15797 industrial washing procedure

Textiles were submitted to standardized ISO 15797 industrial washings. ISO 15797[10] washing procedure was performed at CTTN (Centre Technique de la Teinture et du Nettoyage, Ecully, France). Textiles were washed at 85 °C. For preliminary testing, the effects of one and five industrial washings (hereafter named ISO 15797) were compared with samples before (ECE washed) and after antimicrobial treatment. The ISO 15797 washing powder agent (WFK, Brüggen, Germany) was made available to be analyzed as a reference sample.

X-ray photoelectron spectroscopy

Measurements were carried out at Science et Surface (Ecully, France) using a PHI Quantera SXM instrument (Physical Electronics, Chanhassen, USA) equipped with a 180° hemispherical electron energy analyzer and a monochromatized Al Kα (1486.6 eV) source operated at 15 kV and 4 mA. The analysis spot had a diameter of 200 µm and the detection angle relative to the substrate surface was 45°. The samples were analyzed with dual-beam charge neutralization and the C–C/C–H component of C 1s peak was adjusted to 285 eV. The atomic concentrations were determined using sensitivity factors provided by the manufacturer. Standard deviations were calculated from measurements performed on three different areas.

Time-of-flight secondary ion mass spectrometry

Measurements were carried out at Université Claude Bernard-Lyon 1 (Villeurbanne, France) using a Physical Electronics TRIFT III ToF-SIMS instrument operated with a pulsed 22 keV Au^+ ion gun (ion current of 2 nA) rastered over a 212 µm × 212 µm. An electron gun was operated in pulsed mode at low electron energy for charge compensation. Ion dose was kept below the static conditions limit. Data were analyzed using the WinCadence software. Mass calibration was performed on hydrocarbon secondary ions. Data were normalized to the total intensity minus $H^{+/-}$ intensity (because of its critical dependence on slight variations in the experimental settings). Standard deviations were calculated from measurements performed on three different areas.

Microbiological tests

The procedure for microbiological tests performed at LRGIA (Laboratoire de Recherche en Génie Industriel Alimentaire EA 3733) is described elsewhere.[11] Briefly, this procedure is based on the ISO 20743-2005 standard for the determination of the antibacterial activity of textile.[12] After incubation for 24 h at 30 °C, the number of colony-forming units on trypticase soy agar (TSA) was counted and expressed relative to the weight of the textile (CFU.g^{-1}). The antibacterial activity could be calculated according to the formula: $A = (C^{24} - C^0) - (T^{24} - T^0)$, '$C$' and '$T$' representing the numbers of bacteria enumerated after removal from control (i.e. reference ECE washed) and treated textiles, respectively; '24' and '0' meaning time of incubation in hours for each condition. A biocide textile means a complete inhibition after contact (less than 1 h). A textile is considered to be active (antibacterial) only when A calculated is higher than 2 because of inhibition during 24 h. Standard deviations were calculated from measurements performed on two samples.

Results and Discussion

If the analysis of as-produced samples is a prerequisite for analytical purposes, the systematic use of a washing procedure (ECE washing) by textile industrials prior to any surface treatment has made us consider ECE washed samples as the reference samples before the antimicrobial treatment. Furthermore, industrial use of textile products requires to test the influence of an industrial washing procedure (standardized ISO 15797 industrial washing). The samples compared in this study are listed in Table 1 (in which sample identification is proposed for easier reading of the Results and Discussion section). Furthermore, ECE washing

 Copyright © 2010 John Wiley & Sons, Ltd.

Table 1. List of samples studied in this work and sample identification: 65% polyester/35% cotton (P/C) and 65% cotton/35% polyester (C/P) samples as-produced, after ECE washing (ECE W), then after antimicrobial PHMB/LS treatment (LS/PHMB) as well as after ISO 15797 washings (ISO W) applied to both reference (ECE washed) and treated surfaces

Sample identification	Treatments
Sample A	P/C (as-produced)
Sample B	P/C + 1 ECE W = REF
Sample C	REF + 1 ISO W
Sample D	REF + 5 ISO W
Sample E	REF + LS/PHMB
Sample F	REF + LS/PHMB + 1 ISO W
Sample G	REF + LS/PHMB + 5 ISO W
Sample H	C/P (as-produced)
Sample I	C/P + 1 ECE W = REF
Sample J	REF + 1 ISO W
Sample K	REF + 5 ISO W
Sample L	REF + LS/PHMB
Sample M	REF + LS/PHMB + 1 ISO W
Sample N	REF + LS/PHMB + 5 ISO W

powder, ISO 15797 washing powder, PHMB and LS were also analyzed. In the following sections, XPS analysis, then ToF-SIMS characterization, and finally microbiological test results are discussed and compared.

Table 2 displays XPS results. The main information brought by XPS analysis is the variation in atomic percentage. Detailed analysis of chemical shifts did not make it possible to identify significant variations. Main conclusions from Table 2 can be drawn from the elemental contributions related to PHMB (N) and lauryl sulfate (S) although discussion must be carefully driven (presence of sulphur-based compounds in the washing agents). The main observations can be summarized as follows: slight difference between surfaces of both as-produced (C/P and P/C) samples; washing leads to a surface modification (less C, more O), being more observed for C/P than P/C; washing residues are limited but N and S can still be slightly detected after washing; antimicrobial treatment leads to a significant detection of N and S; when the treated sample is washed (ISO 15797 washing), treatment is partly washed away and only N remains a possible identification of the presence of the antimicrobial treatment.

ToF-SIMS analysis of as produced textiles, ECE washing powder, ISO 15797 washing powder, PHMB and LS allowed the identification of fingerprinting signatures. Preferably molecular ions were chosen. Any signature known to be related to ubiquitous contamination that an industrial treatment can bring (such as those related to PDMS) was specifically avoided. The main fingerprinting signatures detected are the following: $C_{12}H_{25}OSO_3^-$ (m/z = 265.1472; peak detected at m/z = 265.1328) for LS, $C_5H_9O_2^-$ (m/z = 101.0602; peak detected at m/z = 101.0740) for cellulose and $C_7H_4O_2^-$ (m/z = 120.0211; peak detected at m/z = 120.0573) for polyester in the negative mode as well as $C_8H_{18}N_5^+$ (molecular peak, m/z = 184.1561; peak detected at m/z = 184.1517) for PHMB in the positive mode.

Figure 2 displays the ToF-SIMS spectra in the positive mode (m/z = 100–200) of samples H, I and L (Table 1). As expected, the as-produced textile is not clean (PDMS signatures are significantly detected such as $C_5H_{15}Si_2O^+$ (m/z = 147.0661)). However, after ECE washing, the surface is relatively clean. The ECE washing permits thus a reasonable cleaning of the surface, which justifies its systematic use by textile industrials prior to any surface treatment. Similar observations were obtained in the case of P/C samples. Industrial washing (ISO 15797) leads mostly to an increase of the sodium content (this washing agent is primarily based on sodium carbonate) but does not hinder the observation of cotton and

Table 2. XPS atomic concentrations (%) at the surface of 65% polyester/35% cotton (P/C) and 65% cotton/35% polyester (C/P) samples as-produced, after ECE washing, then after antimicrobial PHMB/LS treatment as well as after ISO 15797 washings applied to both reference (ECE washed) and treated surfaces. Reference washing powders (ECE washing powder and ISO 15797 washing powder) were also analyzed. Standard deviations were calculated from measurements performed on three different areas. See Table 1 for sample identification

Sample identification	C	N	O	Na	Si	P	S	Ca	Mg	Cl
Sample A	67.1 ± 0.4	0.3 ± <0.1	31.7 ± 0.5	0.3 ± 0.1	0.1 ± <0.1	0.1 ± <0.1	0.1 ± <0.1	0.2 ± <0.1	–	–
Sample B	66.7 ± 2.4	–	32.5 ± 2.5	0.1 ± <0.1	0.3 ± 0.1	–	0.2 ± <0.1	0.2 ± <0.1	–	–
Sample C	65.5 ± 3.0	0.1 ± <0.1	33.9 ± 3.4	0.3 ± 0.1	0.1 ± <0.1	–	0.1 ± 0.1	–	–	–
Sample D	63.2 ± 0.8	–	36.5 ± 1.0	0.3 ± 0.1	–	–	–	–	–	–
Sample E	69.1 ± 0.3	12.6 ± 0.4	15.1 ± 0.6	–	0.5 ± <0.1	–	2.7 ± <0.1	–	–	–
Sample F	70.3 ± 1.1	6.5 ± <0.1	21.6 ± 1.3	0.3 ± 0.1	–	0.6 ± <0.1	0.4 ± <0.1	0.3 ± 0.1	–	–
Sample G	63.2 ± 0.8	3.8 ± 0.6	31.4 ± 1.5	0.3 ± <0.1	0.3 ± <0.1	0.4 ± <0.1	0.3 ± 0.1	0.3 ± 0.1	–	–
Sample H	67.5 ± 0.2	0.3 ± 0.1	30.4 ± 0.2	–	0.7 ± 0.2	0.1 ± <0.1	–	0.7 ± <0.1	0.3 ± <0.1	–
Sample I	62.6 ± 0.5	0.3 ± <0.1	35.2 ± 0.9	–	0.5 ± 0.2	0.3 ± 0.1	0.2 ± <0.1	0.7 ± <0.1	0.2 ± 0.1	–
Sample J	60.7 ± 0.8	0.2 ± 0.1	38.7 ± 1.2	0.2 ± <0.1	–	–	–	0.2 ± <0.1	–	–
Sample K	60.2 ± 0.6	–	39.5 ± 0.5	0.2 ± 0.1	–	–	–	0.1 ± <0.1	–	–
Sample L	70.4 ± 0.6	11.9 ± 0.5	14.6 ± 0.1	–	0.2 ± <0.1	–	2.8 ± 0.2	0.1 ± <0.1	–	–
Sample M	65.1 ± 0.2	5.2 ± 0.5	28.5 ± 0.5	0.2 ± <0.1	0.1 ± <0.1	0.3 ± <0.1	0.5 ± <0.1	0.1 ± <0.1	–	–
Sample N	62.2 ± 1.5	2.4 ± 1.5	34.4 ± 3.3	0.2 ± 0.1	0.2 ± <0.1	0.3 ± <0.1	0.2 ± <0.1	0.1 ± <0.1	–	–
ECE washing powder	59.7 ± 0.7	–	25.8 ± 0.3	8.9 ± 0.3	–	0.7 ± <0.1	4.7 ± <0.1	–	–	0.2 ± <0.1
ISO 15797 washing powder	62.5 ± 1.1	0.3 ± <0.1	28.2 ± 0.4	6.3 ± 0.4	0.7 ± 0.1	0.4 ± <0.1	1.5 ± <0.1	–	–	0.1 ± <0.1

Copyright © 2010 John Wiley & Sons, Ltd.

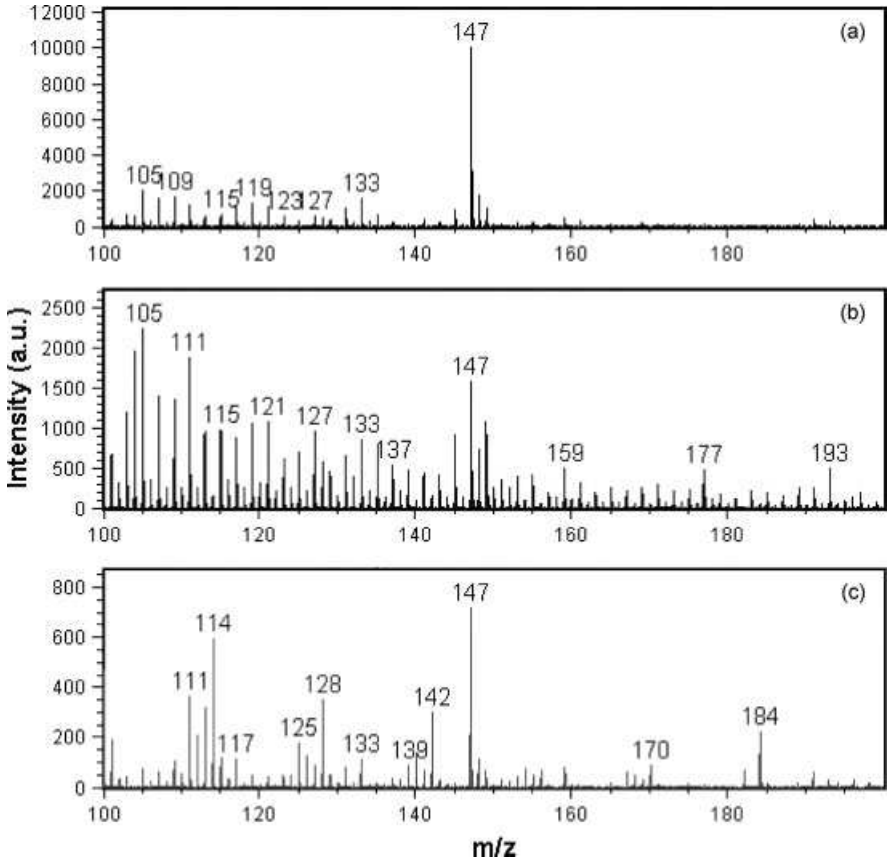


Figure 2. ToF-SIMS positive mode spectra of: a) 65% cotton/35% polyester (as-produced) (C/P); b) ECE washed 65% cotton/35% polyester (C/P) (reference sample prior to any surface treatment); c) ECE washed 65% cotton/35% polyester (C/P) after antimicrobial PHMB/LS treatment.

polyester peaks (data not illustrated). Table 3 displays the variation of the 120.02/101.06 intensity ratio as a function of the samples (P/C or C/P) and of the nature of the washing procedure (ECE or ISO, 1 or 5 washings) (samples A to D). Various intensity ratios were calculated with characteristic peaks of polyester and cotton and they all illustrated a similar variation to that displayed by the 120.02/101.06 intensity ratio: the intensity of cotton characteristic peak is more important for C/P than for P/C. No statistically significant variation was obtained after washing.

A significant change in the surface composition is observed after the PHMB/LS antimicrobial treatment (Fig. 2). Even though PDMS signatures are again more detected, PHMB signatures can be easily identified such as the molecular peak $C_8H_{18}N_5^+$ (m/z = 184.1561). Table 3 displays normalized intensities for characteristic signatures of the treatment. These normalized intensities clearly indicate the detection of the deposit on both samples (samples E and L), which confirms the N variation exhibited in XPS results (Table 2). The variation when ISO 15797 washing is somewhat surprising. After one washing, the relative intensity for m/z = 184.1561 is rather higher than on the treated sample. Considering the rather slight decrease for normalized CN^- and a significant decrease of the XPS N atomic percentage (Table 2), it could mean that the PHMB is partly washed away but that its observation in the depth probed by ToF-SIMS is still significant. The normalized intensity of the LS characteristic negative mode peak (m/z = 265.1472) indicates a rapid decrease of the LS content, even after one ISO 15797 washing. It is possibly replaced by anionic washing agent components such as phosphates, whose characteristic ToF-SIMS peaks are somewhat more observed (data not illustrated). LS is clearly not detected anymore after five ISO 15797 washings. In the case of PHMB, the XPS N atomic percentage, CN^- normalized intensity, and the normalized intensity for the molecular characteristic peak (m/z = 184.1561) rather indicate it is still present, which means the antimicrobial agent can still be detected at the surface even though LS is not present anymore.

Surface analysis data were compared to the microbiological tests results displayed in the far-right column of Table 3. Washing powders did not exhibit any activity. Considering the treated samples, the surfaces are not active (before-treatment samples C, D, J, K; Table 1) or the surfaces contain a significant concentration of antimicrobial agent that leads to a biocide property (no activity can be calculated as bacteria used for the tests are killed) (after-treatment samples E, L; Table 1). After a single ISO 15797 washing, the surface remains biocide but after 5 ISO 15797 washings, either the surface is active ($A = 3.9 \pm 0.6$) (sample N) or it is not active anymore (sample G). CN^- as well as the XPS N atomic percentage variation are unable to explain this difference and they should not be considered as relevant surface analysis signatures for correlation with microbiological results. Even though a slight difference is observed in Table 3 for the normalized intensity for m/z = 184.1561 (PHMB molecular peak) between C/P and P/C samples, it can hardly be concluded that this would be the only explanation for the difference in activity. On the other hand, the 120.02/101.06 intensity ratio exhibits some surprising results. If the value for the treated sample is not meaningful (normalized intensities for m/z = 101.0602 and 120.0211 being very low), the

 Copyright © 2010 John Wiley & Sons, Ltd.

Table 3. ToF-SIMS normalized intensities and intensity ratios (%) at the surface of 65% polyester/35% cotton (P/C) and 65% cotton/35% polyester (C/P) samples as-produced, after ECE washing, then after antimicrobial PHMB/LS treatment, and finally after industrial (ISO 15797) washings applied to both reference (ECE washed) and treated surfaces. Ions at m/z = 120.0211 (noted 120.02) (negative mode), 101.0602 (noted 101.06) (negative mode), 184.1561 (noted 184.15) (positive mode) and 265.1472 (noted 265.15) (negative mode) are ToF-SIMS specific signatures for polyester, cotton, PHMB and LS, respectively. Standard deviations were calculated from measurements performed on three different areas. Results of microbiological tests are displayed in the far right column. A biocide textile means a complete inhibition after contact (less than 1 h). A textile is considered to be active (antibacterial) only when A calculated is higher than 2 because of inhibition during 24 h. Standard deviations were calculated from measurements performed on two samples. See Table 1 for sample identification

Sample identification	I(120.02)/I(101.06)	Norm. I(184.16)	Norm. I(CN^-)	Norm. I(265.15)	Activity
Sample A	164.4 ± 37.8	–	–	–	Not tested
Sample B	310.8 ± 99.3	–	–	–	Not tested
Sample C	271.9 ± 140.0	–	–	–	Not active
Sample D	244.7 ± 215.1	–	–	–	Not active
Sample E	81.9 ± 38.5	0.17 ± 0.02	2.51 ± 0.10	3.38 ± 0.76	Biocide
Sample F	27.3 ± 7.5	0.27 ± 0.03	1.90 ± 0.05	1.90 ± 0.39	Biocide
Sample G	17.1 ± 10.2	0.03 ± 0.01	1.45 ± 0.55	<0.01	Not active
Sample H	53.6 ± 12.9	–	–	–	Not tested
Sample I	77.7 ± 18.4	–	–	–	Not tested
Sample J	73.7 ± 37.1	–	–	–	Not active
Sample K	50.1 ± 37.0	–	–	–	Not active
Sample L	95.8 ± 31.0	0.21 ± 0.04	1.99 ± 0.54	3.42 ± 1.50	Biocide
Sample M	21.5 ± 5.8	0.41 ± 0.10	1.83 ± 0.39	1.98 ± 0.26	Biocide
Sample N	7.6 ± 0.5	0.04 ± 0.02	0.71 ± 0.06	<0.01	Active

values are meaningful for the treated samples after ISO 15797 washing(s) as the deposit was partly removed. Both normalized intensities (data not shown) and the 120.02/101.06 intensity ratio displayed in Table 3 indicates that the component of the textile observed by ToF-SIMS is rather cotton. This could indicate that cotton plays a role in the capacity to retain some antimicrobial activity related to PHMB. Future work will be focused on further studying the specific role of both the PHMB concentration and the textile surface composition to retain sufficient antimicrobial activity even after industrial washing.

Conclusion

ToF-SIMS and XPS were used to understand the surface chemistry at various steps of food processing industry textile modification to trigger antimicrobial properties (cleaning step prior to surface modification, antimicrobial deposit, industrial ISO 15797 washing). ToF-SIMS results indicated that the relative contribution from the two components of the textile samples (polyester and cotton) is different at the surface for cotton-rich (C/P) or polyester-rich (P/C) samples (more cotton for C/P). Both XPS and ToF-SIMS illustrated a significant variation in the surface content of the antimicrobial deposit before and after ISO 15797 washings. After ISO 15797 washings, the precipitating agent (laurylsulphate) is rapidly removed (possibly replaced by washing agent components) while the antimicrobial agent (PHMB) is still detected but is significantly removed from the surface after five washings. Surface analysis data were compared to antimicrobial tests results. After a single ISO 15797 washing, the surface remains biocide, but after 5 ISO 15797 washings, either the surface is active (C/P case) or it is not active anymore (P/C case). The detection of cotton could indicate a specific role in the capacity to retain some antimicrobial activity even after industrial washing.

Acknowledgements

This study is a part of the research project, Actiprotex, supported by Techtera, the competitiveness cluster for technical and functional textiles, based in the Rhône-Alpes region, and by the French Government.

References

[1] P. Monllor, M. A. Bonet, F. Cases, *Eur. Polym. J.* **2007**, *43*, 2481.
[2] Y. Xing, X. Yang, J. Dai, *J. Sol-Gel Sci. Technol.* **2007**, *43*, 187.
[3] H. Y. Ki, J. H. Kim, S. C. Kwon, S. H. Jeong, *J. Mater. Sci.* **2007**, *42*, 8020.
[4] N. Brack, R. Lamb, D. Pham, P. Turner, *Colloids Surf., A* **1999**, 146.
[5] T. Ramachandran, K. Rajendrakumar, R. Rajendran, *Inst. Eng. (India) Tech. J.: Textile Eng.* **2004**, *84*, 42.
[6] H. Wang, J. Wang, J. Hong, Q. Wei, W. Gao, Z. Zhu, *J. Coat. Technol. Res.* **2007**, *4*, 101.
[7] T. Yuranova, A. G. Rincon, C. Pulgarin, D. Laub, N. Xantopoulos, H. J. Mathieu, J. Kiwi, *J. Photochem. Photobiol., A* **2006**, *181*, 363.
[8] J. M. Lauchlin, R. T. Mitchell, W. J. Smerdon, K. Jewell, *Int. J. Food Microbiol.* **2004**, *92*, 15.
[9] R. J. R. Chatelin, M. Bourgeois, EP Patent 0 955 069 A1, **2006**.
[10] Standard ISO 15797, **2002**.
[11] E. Chadeau, N. Oulahal, L. Dubost, F. Favergeon, P. Degraeve, *Food Control* **2010**, *21*, 505.
[12] Standard ISO 20743, **2005**.

 Copyright © 2010 John Wiley & Sons, Ltd.

Résumé

Dans l'industrie agro-alimentaire, l'adhésion de micro-organismes altérants ou pathogènes sur les surfaces induit des effets néfastes à la fois en termes de qualité, d'hygiène et de santé publique. Les vêtements professionnels constituent un des vecteurs de contamination par le personnel. Ce travail de thèse concerne l'évaluation de l'activité antimicrobienne de textiles antimicrobiens développés pour le secteur hospitalier et le secteur agro-alimentaire et rentre dans le cadre du projet collaboratif Actiprotex. Trois méthodologies ont été employées pour le dépôt d'agents antimicrobiens sur les textiles : méthodologie plasma (PVD/PECVD) ou sol-gel pour le dépôt d'argent, foulardage avec une solution contenant du laurylsulfate et du Poly Hexaméthylène Biguanide (PHMB) pour provoquer une co-précipitation du PHMB. Les activités antimicrobiennes de chaque textile ont été évaluées après 24 h de contact (suivant la norme ISO 20743-2005). Les quantités d'agent antimicrobien à la surface des textiles ont été évaluées par 2 techniques d'analyses de surface : la spectroscopie photoélectronique par rayons X (XPS) et la spectrométrie de masse d'ions secondaires (ToF-SIMS). Les textiles traités par plasma à l'argent se sont avérés être efficaces vis-à-vis de *Listeria innocua* LRGIA 01. Pour le traitement sol-gel, les textiles testés étaient également très actifs vis-à-vis de *L. innocua* LRGIA 01 et d'*Escherichia coli* XL1 blue. Cependant, *E. coli* XL1 blue est apparue plus sensible à l'argent que *L. innocua* LRGIA 01. Les textiles traités au PHMB se sont également avérés être très actifs vis-à-vis de *L. innocua* LRGIA 01 et de *Staphylococcus aureus* méthi-R nosoco 3011 cependant des cellules viables mais non cultivables (VNC) ont également été mises en évidence après contact de ces 2 souches avec le textile traité au PHMB. *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 15742 s'est quant à elle avérée être plus résistante que ces 2 souches. La tenue aux lavages industriels ou ménagers des dépôts plasma d'argent et de PHMB par foulardage a également été évaluée. Les dépôts plasma d'argent résistent mal au lavage alors que le dépôt PHMB par foulardage s'est avéré résister à 10 lavages industriels. Pour mieux comprendre le mécanisme d'action du PHMB vis-à-vis de *L. innocua* LRGIA 01 en milieu liquide, trois approches ont été mises en œuvre : la microscopie à épifluorescence en présence de marqueurs fluorescents pour évaluer l'état de la membrane des cellules, la spectrofluorimétrie en présence de sondes fluorescentes (DPH et TMA-DPH) pour évaluer la fluidité de la membrane des cellules et enfin la spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier (IRTF) pour évaluer les changements de conformation de la membrane. Les résultats obtenus par ces 3 méthodes permettent de proposer un mode d'action du PHMB de type « carpet », c'est à dire une fixation de l'agent antimicrobien en surface puis une désorganisation de la membrane conduisant à des changements de sa conformation puis à la formation de pores et à la mort cellulaire.

Mots clés : textiles antimicrobiens (antibactériens), argent, PHMB, PVD/PECVD, sol-gel, XPS, ToF-SIMS, viabilité cellulaire, fluidité et intégrité membranaire.

Abstract

Adhesion of pathogenic or spoilage microorganisms on the surfaces present in food industry can lead to contaminations of foods. Besides the economical impact for this industrial sector, these contaminations might alleviate food quality and hygiene and affect public health. Professional clothes constitute one of the vectors of contamination by the staff of food-processing industry. This work is a part of a collaborative project (Actiprotex) and concerns the evaluation of the antimicrobial activity of antimicrobial textiles developed for the hospital sector and the food-processing industry. Three methodologies were employed to obtain deposits of antimicrobial agents on textiles surfaces: plasma (PVD / PECVD) or sol-gel methodologies for the silver deposit and spin coating with a solution containing laurylsulfate and PolyHexamethylene Biguanide (PHMB). The antimicrobial activities of functionalized textiles were estimated after 24 hours of contact (according to the standard ISO 20743-2005). The quantities of antimicrobial agent at the extreme surface of the textiles were estimated by two techniques of analyses of surface: the photoelectronic spectroscopy by X-rays (XPS) and the mass spectrometry of secondary ions (ToF-SIMS). Textiles functionalized by plasma methodology with silver were effective against *Listeria innocua* LRGIA 01. For the textiles functionalized by sol-gel methodology, the tested textiles were also very active towards *L. innocua* LRGIA 01 and *Escherichia coli* XL1 blue. However, *E. coli* XL1 blue seemed to be more sensitive to the silver on textiles than the *L. innocua* LRGIA 01 strain. Textiles treated with the PHMB also turned out to be very active towards *L. innocua* LRGIA 01 and *Staphylococcus aureus* methi-R nosoco 3011, however viable but not cultivable cell (VNC) were also revealed after contact of these 2 strains with the PHMB treated textile. *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 15742 was more resistant to PHMB than these 2 strains. The washing resistance of silver- or PHMB-deposits was also estimated. Most of the silver deposit following plasma treatment was washed out while the PHMB deposit turned out to resist to 10 industrial washes. To understand the mechanism of action of the PHMB against *L. innocua* LRGIA 01, three approaches were considered: the epifluorescence microscopy in the presence of fluorescent dyes to estimate the state of the membrane cells, spectrofluorimetry in the presence of fluorescent probes (DPH and TMA-DPH) to estimate the membrane fluidity of cells and finally the infrared transformed Fourier spectroscopy (IRTF) to estimate the changes of conformation of the membrane.

Key words: antibacterial textiles, silver, PHMB, PVD/PECVD, sol-gel, XPS, ToF-SIMS, cell viability, cell membrane fluidity and integrity.