

UNIVERSITÉ DE LIMOGES

Faculté des Sciences et Techniques

Ecole Doctorale 258 Sciences Technologies Santé
Institut Sciences de la Vie Santé - EA 3176 “Glycobiologie et Biotechnologies”

THESE

Pour obtenir le grade de
DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ DE LIMOGES

Discipline : Biologie – Sciences - Santé
(Option : Biologie cellulaire)

Hélène LE PAPE

Le 29 septembre 2003

ETUDE DES PROPRIETES GERMICIDES DE FIBRES DE CARBONE ACTIVE

« Application à la décontamination de l'air en cabine d'avion »

Thèse encadrée par : M. Patrick LEPRAT et M^{elle} Marcelle MOUNIER

Thèse réalisée en contrat CIFRE avec la Société SOFRANCE (Groupe Snecma, Nexon, France)

Jury :

M. Abderrahman MAFTAH

M. Fabien SQUINAZI

M. Yves CENATIEMPO

M. Pierre KRAUSZ

M^{elle} Marcelle MOUNIER

M. Patrick LEPRAT

M. Pascal CONTINI

M. Christophe DEVILLERS

Président du jury, Université de Limoges

Rapporteur – Mairie Paris

Rapporteur, Université de Poitiers

Examineur, Université de Limoges

Examineur, Université de Limoges

Examineur, Université de Limoges

Membre invité, Sofrance

Membre invité, Sofrance

A Olivier

A mes parents, Betty et Pol

A mon frère, Alban

Communications

Ce travail a fait l'objet de quelques travaux, recensés ci-dessous.

Publications (Annexes 1 et 2) :

- H. Le Pape, F. Solano-Serena, P. Contini, C. Devillers, A. Maftah, P. Leprat (2002). Evaluation of the anti-microbial properties of an activated carbon fibre supporting silver using a dynamic method. *Carbon*, **40** : 2947-2954.
- H. Le Pape, F. Solano-Serena, P. Contini, C. Devillers, A. Maftah, P. Leprat (2003). Involvement of reactive oxygen species in the bactericidal activity of activated carbon fibre supporting silver. *J. Inorg. Biochem.* (soumise).

Brevets :

- F. Cazals, P. Leprat, P. Levêque, M. Vergne, C. Rougier, H. Le Pape, O. Georgeot et E. Hartmann (2001) Brevet d'invention FR 2 820 419-A1 « Dispositif compact de décontamination d'effluents liquides à risques infectieux par voie physique ».

Communications orales:

- H. Le Pape, P. Leprat (2000), « Propriétés germicides des fibres de carbone activé – Application à la décontamination de l'air et de l'eau » Salon Pollutec Lyon, 17-20 octobre 2000.
- H. Le Pape, U. Le Marié, P. Leprat (2001), « La maîtrise des aérobiocontaminants » Journée APESA « Les entretiens de l'Environnement : L'air que nous respirons, l'air qui nous protège : les défis du XXI^{ème} siècle. » Centre de Congrès, Pau, 6-9 mars 2001.

Communications écrites :

- H. Le Pape, M. Mounier, J-L. Bernard, P. Contini, T. Mantel et P. Leprat. « Activité bactéricide de supports poreux à base de charbon actif ». Premier séminaire de la Pluridisciplinarité, Limoges parc Ester Technopôle, 27 juin 2000.
- H. Le Pape, M. Mounier, J-L. Bernard, P. Contini, T. Mantel et P. Leprat. « Activité bactéricide de la fibre de carbone activé ». Salon Pollutec Lyon, 17-20 octobre 2000.
- H. Le Pape, F. Solano-Serena, M. Mounier, J-L. Bernard, P. Contini et P. Leprat. « Activité bactéricide de la fibre de carbone activé ». Second séminaire de la Pluridisciplinarité, Limoges parc Ester Technopôle, 30 mai 2001.

Rapports d'activité :

- Rapport technique de contrat « Propriétés germicides des fibres de carbone activé » période de septembre à décembre 2000.
- Rapport technique de contrat « Propriétés germicides des fibres de carbone activé » période de janvier 2001 à juin 2001.
- Rapport technique de contrat « Propriétés germicides des fibres de carbone activé » période de juillet 2001 à décembre 2001.
- Rapport technique de contrat « Propriétés germicides des fibres de carbone activé » période de janvier 2002 à juin 2002.
- Rapport technique de contrat « Propriétés germicides des fibres de carbone activé » période de juillet 2002 à décembre 2002.
- Rapport technique de contrat « Propriétés germicides des fibres de carbone activé » période de janvier 2003 à juin 2003.

Résumé

La qualité de l'air en cabine d'avion est devenue un sujet de préoccupation grandissant pour le bien-être des occupants, surtout depuis l'épidémie du Syndrome respiratoire Aigu Sévère. Le traitement biologique de l'air en cabine, actuellement réalisé (par dilution dans l'air et par des filtres « High Efficiency Particulate Air ») permet une rétention mécanique de certains germes sans pour autant les détruire. Des microbes comme les virus ne sont en revanche pas forcément arrêtés par ces systèmes en raison de leur petite taille.

Les Fibres de Carbone Activé (FCA), connues pour leurs propriétés de catalyse et d'adsorption, peuvent être présentées comme alternative au traitement de l'air. De plus, lorsqu'elles sont imprégnées de métaux, elles présentent des propriétés antimicrobiennes.

La finalité du travail de thèse est 1) d'étudier les capacités de décontamination microbiologique de FCA en essayant de comprendre les mécanismes mis en jeu et, 2) d'étudier les potentialités d'application de ces propriétés dans le traitement antimicrobien de l'air. Nous avons tout d'abord testé les capacités germicides de FCA imprégnées ou non de métaux ou d'autres composés chimiques. Les résultats montrent que les FCA imprégnées d'argent (FCA(Ag)) présentent de bonnes propriétés antimicrobiennes vis-à-vis d'un large spectre de microorganismes, procaryotes et eucaryotes. Les travaux montrent qu'en milieu aqueux, FCA(Ag) libère et/ou génère des substances germicides, à durée de vie courte. Puisque, la présence d'oxygène est nécessaire à l'obtention d'une bonne efficacité antimicrobienne des FCA(Ag), l'hypothèse d'une génération d'espèces réactives de l'oxygène (ou ROS) a été émise. Différentes investigations ont été menées afin de vérifier cette hypothèse et les résultats montrent l'implication des ROS et de l'argent dans le mécanisme de germicidie. La formation de ROS serait catalysée par la FCA elle-même et l'argent sur la fibre et/ou élué dans le milieu aqueux. Les potentialités de décontamination de l'air par un procédé basé sur les propriétés germicides de la FCA ont été étudiées par la suite. Pour cela un pilote expérimental, intégrant des systèmes de génération et d'analyse de bioaérosol bactérien a été développé. Les résultats montrent qu'une eau, chargée en substances germicides après son passage sur la FCA(Ag), et aérosolisée, est apte à décontaminer un bioaérosol bactérien. Des mises au point expérimentales sont cependant encore nécessaires afin d'optimiser le procédé de décontamination microbiologique.

Mots clés : Fibre de Carbone Activé, Argent, Activité Antimicrobienne, Espèces Réactives de l'Oxygène, Stress Oxydatif

Table des matières

SIGLES ET ABREVIATIONS	11
LISTE DES TABLEAUX	14
LISTE DES FIGURES.....	16
LISTE DES ANNEXES	20
<u>INTRODUCTION.....</u>	<u>1</u>
<u>PARTIE 1 : ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE.....</u>	<u>4</u>
CHAPITRE 1 : LA QUALITE DE L’AIR EN CABINE D’AVION	5
I QUELQUES REGLEMENTATIONS SUR LA QUALITE DE L’AIR	8
II PARAMETRES PHYSIQUES INFLUENÇANT LA QUALITE DE L’AIR EN AVION.	10
II.1 Flux d’air et ventilation	10
II.2 Humidité Relative (HR)	11
II.3 Pression barométrique et teneur en oxygène	12
III CONTAMINANTS DE L’AIR.....	13
III.1 Taille et type de contaminants.....	13
III.2 Sources de contamination	14
III.3 Quelques molécules gazeuses	16
III.3.1 Dioxyde de carbone (CO ₂)	16
III.3.2 Monoxyde de carbone (CO).....	17
III.3.3 Ozone (O ₃)	17
III.3.4 Composés Organiques Volatils (COV).....	17
III.4 Bioaérosols	18
IV QUELQUES ETUDES EXPERIMENTALES SUR LES BIOAEROSOLS	20
V ELIMINATION DES CONTAMINANTS AEROPORTES / PROCEDES.....	29
CHAPITRE 2 : LES FIBRES DE CARBONE ACTIVE	32
I PREPARATION DE LA FIBRE DE CARBONE ACTIVE.....	34
I.1 Carbonisation.....	35

I.2 Activation.....	36
II PROPRIETES CHIMIQUES ET STRUCTURALES DES FCA	37
II.1 Structure poreuse.....	37
II.2 Caractéristiques chimiques de surface : groupements fonctionnels et sites actifs	39
II.2.1 Réactivité de surface	39
II.2.2 Groupements de surface	40
II.2.3 Formation des sites actifs à partir des groupements fonctionnels	41
II.3 Réactivité et géométrie de surface.....	42
III PROPRIETES BACTERICIDES DES FIBRES DE CARBONE ACTIVE	43
III.1 Activité bactéricide observée	43
III.2 Mécanismes de bactéricidie	46
CHAPITRE 3 : LES METAUX ET LES ESPECES REACTIVES DE L'OXYGENE .	49
I GENERALITES SUR LES ESPECES REACTIVES DE L'OXYGENE	50
II OXYGENE ET CELLULE	52
II.1 Métabolisme de l'oxygène dans la cellule.....	52
II.2 Stress oxydatif et systèmes de défense.....	53
II.2.1 Le stress oxydatif.....	53
II.2.2 Le système de défense.....	55
III IMPLICATION DES METAUX DANS LA GENERATION DES ESPECES OXYGENEES ACTIVES	58
<u>PARTIE 2 : MATERIELS ET METHODES</u>	61
I. MATERIEL	62
I.1 Microorganismes et conditions de culture.....	62
I.1.1 Souches de bactéries	62
I.1.2 Souches de levures.....	63
I.1.3 Souches de champignons	63
I.2 Typologie des FCA.....	64
II. TESTS D'ACTIVITE ANTIMICROBIENNE	65
II.1 Activité antimicrobienne avec contact entre les cellules et le media	65
II.2 Activité antimicrobienne des substances germicides générées par le media	67
II.2.1 Activité antimicrobienne d'une eau ayant circulé à travers une FCA(Ag)	67

II.2.2	Activité antimicrobienne d'une eau « traitée » additionnée ou non d'agents inhibiteurs des ROS et/ou d'un neutralisant des ions Ag ⁺	68
II.3	Analyse des effets antimicrobiens de l'argent sur les bactéries	69
II.4	Analyse statistique.....	69
III.	TECHNIQUES D'ANALYSES.....	70
III.1	Analyses biologiques	70
III.1.1	Détermination du nombre d'Unités Formant des Colonies (UFC) par dénombrement sur milieux nutritifs solides.....	70
III.1.2	Analyses de l'intégrité membranaire par CytoMétrie en Flux (CMF).....	70
III.1.2.1	<i>Analyse de l'intégrité membranaire de bactéries en contact avec l'eau « traitée » par FCA06</i>	72
III.1.2.2	<i>Analyse de l'intégrité membranaire de bactéries aérosolisées</i>	73
III.1.3	Etude du contenu en ATP	74
III.1.4	Etude de l'expression génétique par Reverse Transcriptase-Polymerase Chain Reaction (RT-PCR).....	75
III.2	Analyses physiques	78
III.2.1	Analyse par Microscopie Electronique à Balayage (MEB)	78
III.2.2	Analyse par X-Ray Photoelectron Spectroscopy (XPS).....	78
III.2.3	Analyse par Résonance Paramagnétique de l'Electron (RPE).....	79
III.2.4	Dosage d'Argent par spectrométrie d'absorption atomique dans la flamme..	80
IV	DECONTAMINATION DE L' AIR	81
IV.1	Souches aérosolisées et conditions de culture	81
IV.2	Pilote expérimental	81
IV.3	Méthodes.....	85

PARTIE 3 : RESULTATS ET DISCUSSION..... 87

CHAPITRE 1 : L'ACTIVITE ANTIMICROBIENNE DES FCA 88

I MISE EN EVIDENCE DES EFFETS ANTIMICROBIENS..... 90

I.1 Activité antimicrobienne des FCA

I.1.1 Activité bactéricide de FCA imprégnées ou brutes

***I.1.1.1 Contrôles*.....**

***I.1.1.2 Les FCA testées*.....**

I.1.2	Activité de FCA01 contre plusieurs types de microorganismes.....	96
I.1.2.1	<i>Bactéries</i>	97
I.1.2.2	<i>Levures</i>	99
I.1.2.3	<i>Champignons</i>	101
I.1.2.4	<i>Conclusion</i>	102
I.1.3	Evolution temporelle de l'activité germicide.....	102
I.1.3.1	<i>Vieillessement naturel</i>	102
I.1.3.2	<i>Vieillessement accéléré</i>	104
I.1.4	Caractérisation des FCA montrant les meilleures propriétés bactéricides	106
I.1.4.1	<i>Analyses au MEB</i>	106
I.1.4.2	<i>Caractérisations de surface par analyses XPS (X-ray Photoelectron Spectroscopy)</i>	108
I.2	Mise en évidence de la génération de substances germicides et de leur pouvoir germicide.....	109
I.2.1	FCA01.....	110
I.2.2	FCA06.....	111
I.2.3	Détermination par CMF de l'état physiologique des cellules traitées.....	113
II	ANALYSES DES MECANISMES DE BACTERICIDIE	115
II.1	Implication de l'argent	115
II.2	Implication de l'activité catalytique de la FCA.....	118
II.3	Implication de l'oxygène.....	118
II.4	Identification des espèces responsables de l'activité germicide.....	120
II.4.1	Identification de radicaux par analyse RPE.....	120
II.4.2	Identification des espèces germicides par utilisation de composés inhibiteurs ou piègeurs	123
II.4.3	Etude du stress oxydatif par RT-PCR	125
II.5	Mécanismes mis en jeu.....	127
	CHAPITRE 2 : APPLICATION A LA DECONTAMINATION DE L'AIR.....	129
I	VALIDATION DES PARAMETRES DU DISPOSITIF EXPERIMENTAL	130
I.1	Humidité Relative (HR).....	130
I.2	Génération du bioaérosol	132
I.2.1	Choix de la souche.....	132
I.2.2	Choix de la méthode de prélèvement.....	133

I.2.3 Stabilité du bioaérosol	134
I.3 Etat physiologique de la suspension bactérienne aérosolisée	137
I.3.1 Rendements après revivification.....	137
I.3.2 Courbes de croissance.....	138
I.3.3 CMF	140
I.4 Conclusion	145
II VALIDATION DU PRINCIPE DE DECONTAMINATION PAR AEROSOLS (H ₂ O ₂).....	147
III ESSAIS DE DECONTAMINATION DE L' AIR AVEC FCA06	150
III.1 Mise au point de la concentration en substances germicides de l'eau « traitée » ...	150
III. 2 Test de vieillissement accéléré.....	157
III. 3 Applicabilité – Simulation	160
<u>CONCLUSION.....</u>	162
BIBLIOGRAPHIE.....	165
ANNEXES.....	178

Sigles et abréviations

Ac : Anticorps

AC : Air Comprimé

ADN : Acide DésoxyriboNucléique

APU : Auxiliary Power Units

ARN : Acide RiboNucléique

ASHRAE : American Society of Heating Refrigerating and Air-conditioning Engineers

ATA : Air Transport Transportation

ATCC : American Type Culture Collection

ATP : Adénosine TriPhosphates

BCYE : Buffered Charcoal Yeast Extract- α -ketoglutarate

CAG : Charbon Actif en Grains

CCI : Charcoal Cloth International

CIP : Collection de l'Institut Pasteur

CMF : CytoMétrie en Flux

COV : Composés Organiques Volatils

CSS : Consolidated Safety Services

DMPO : 5,5 DiMéthyl-1-Pyrroline N-Oxyde

ECS : Environmental Control System

ED : Eau Distillée

ENSIL : Ecole Nationale Supérieure d'Ingénieurs de Limoges

FAA : Federal Aviation Administration

FAR : Federal Aviation Regulation

FCA : Fibre de Carbone Activé

FSC : Forward Scatter

FITC : Fluorescein IsoThioCyanate

GPx : Glutathion Peroxydase

HEPA : High Efficiency Particulate Air

HR: Humidité Relative

IP : Iodure de Propidium

JAA : Joint Aviation Authorities

JAR : Joint Aviation Regulation

MEB : Microscopie Electronique à Balayage

NAAQS : National Air Ambient Quality Standards

NAS : National Academy of Sciences

NASA : National Aeronautics and Spatial Administration

NBC : Nuclear Biological Chemical

NIOSH : National Institute for Occupational Safety and Health

OMS : Organisation Mondiale de la Santé

PBS : Phosphate Buffered Saline

PCA : Plate Count Agar

PCR : Polymerase Chain Reaction

RLU : Relative Light Unit

ROS : Reactive Oxygen Species

RPE : Résonance Paramagnétique de l'Electron

rpm : rotation par minute

SAE : Society of Automotive Engineers

SOD : SuperOxyde Dismutase

SRAS : Syndrome Respiratoire Aigu Sévère

SSC : Side SCatter

TCA : Tissu de Carbone Activé

UFC : Unités Formant des Colonies

US EPA : United States Environmental Protection Society

UV : Ultra Violet

XPS : X-ray Photoelectron Spectroscopy

YPD : Yeast Peptone Dextrose

Liste des tableaux

TABLEAU 1 : EXEMPLES DE RECOMMANDATIONS APPLICABLES A LA QUALITE DE L' AIR D' APRES NAGDA ET COLL., 2000 ET ASHRAE 161-2000 POUR LES AVIONS DE PLUS DE 19 PASSAGERS..	9
TABLEAU 2 : PRINCIPAUX COV DETECTES EN MILIEU AERONAUTIQUE.....	18
TABLEAU 3 : CARACTERISTIQUES ET RESULTATS DES ETUDES FAITES SUR DES BIOAEROSOLS EN CABINE D' AVION.....	21
TABLEAU 4 : DONNEES SUR LA CONCENTRATION EN MICROORGANISMES EN LIAISON AVEC DES PARAMETRES PHYSIQUES EN VOL.....	24
TABLEAU 5 : CAS D' INFECTIONS RECENSES EN MILIEU AERONAUTIQUE.....	28
TABLEAU 6 : DISTRIBUTION DE LA TAILLE DES PORES SELON DUBININ (1966).....	38
TABLEAU 7 : DISTRIBUTION DE LA TAILLE DES MICROPORES D' UNE FCA.....	38
TABLEAU 8 : QUELQUES ESPECES REACTIVES DE L' OXYGENE.....	51
TABLEAU 9 : RECAPITULATIF DES ENZYMES DE DETOXICATION ET DES REACTIONS CATALYSEES.....	53
TABLEAU 10 : QUELQUES CARACTERISTIQUES DES DIFFERENTES FCA.....	64
TABLEAU 11 : CONDITIONS EXPERIMENTALES POUR L' ETUDE DE L' ACTIVITE GERMICIDE D' EAU « TRAITEE » PAR FCA(AG).....	67
TABLEAU 12 : PROTOCOLE D' IMMUNO-MARQUAGE POUR ANALYSE EN CMF.....	74
TABLEAU 13 : QUELQUES CARACTERISTIQUES DES OLIGONUCLEOTIDES UTILISES. LE NUMERO D' ACCESSION SUR LES BANQUES DE DONNEES EST LE MEME POUR TOUS LES GENES : NC 000913 – GI : 16127994.....	77
TABLEAU 14 : NOMENCLATURE DES EQUIPEMENTS.....	83
TABLEAU 15 : POURCENTAGES ATOMIQUES DES ELEMENTS PRINCIPAUX COMPOSANT LA SURFACE DE FCA01.....	108
TABLEAU 16 : IDENTIFICATION DES GROUPEMENTS DE SURFACE DE FCA01.....	109
TABLEAU 17 : POURCENTAGES DE CELLULES AYANT INCORPORE L' IP (FENETRE IP+).....	114
TABLEAU 18 : CONCENTRATIONS EN ARGENT MESUREES DANS LA SUSPENSION APRES PASSAGE DE L' EAU DISTILLEE STERILE SUR LE DISPOSITIF POURVU DE FCA01 OU FCA06.....	115
TABLEAU 19 : RECAPITULATIF DES DIFFERENTS PARAMETRES MESURES SELON DIFFERENTS DEBITS EN AC ET EN EAU DANS M30. LE DEBIT EN M20 EST FIXE A 0,09 mL.MIN ⁻¹	132
TABLEAU 20 : CORRELATION ENTRE LES DIFFERENTS PARAMETRES OBTENUS AVEC LE DISPOSITIF D' ESSAI SUR L' AIR. LE DEBIT EN M20 EST FIXE A 0,09 mL.MIN ⁻¹	137
TABLEAU 21 : PARAMETRES DES COURBES DE CROISSANCE EFFECTUEES AVEC LES BACTERIES <i>E. COLI</i> AEROSOLISEES.....	139
TABLEAU 22 : POURCENTAGE D' EVENEMENTS RELATIFS A CHAQUE FENETRE DES CYTOGRAMMES.....	143

TABLEAU 23 : TEMPERATURES ET HR MOYENNES MESUREES AU COURS DES ESSAIS REALISES DANS
LES CONDITIONS 1 A 5..... 153

Liste des figures

FIGURE 1 : CLASSEMENT DES CONTAMINANTS SELON LEUR TAILLE.	14
FIGURE 2 : PRINCIPE DE FABRICATION D'UNE FIBRE DE CARBONE ACTIVE.	34
FIGURE 3 : REPRESENTATION SCHEMATIQUE DE LA MICROSTRUCTURE DU CHARBON ACTIVE (BANSAL ET COLL., 1988).	35
FIGURE 4 : STRUCTURE SCHEMATIQUE DES PORES DE FIBRE DE CARBONE ACTIVE (FCA) OU DE CHARBON ACTIF EN GRAINS (CAG) (MATATOV-MEYAL ET SHEINTUCH, 2002).	38
FIGURE 5 : GENERATION DE SITES ACTIFS PAR DECOMPOSITION DES GROUPES FONCTIONNELS OXYGENES AU COURS D'UN TRAITEMENT THERMIQUE (LI ET COLL., 2001).	42
FIGURE 6 : PRESENCE POTENTIELLE DE 12 GROUPEMENTS C-X SUR UNE SURFACE DE 100 Å ² (MODELE DE PITTMAN ET COLL., 1999). X REPRESENTE LES DIFFERENTES FONCTIONS OXYGENEES CITEES PRECEDEMMENT.	42
FIGURE 7 : PRESENCE POTENTIELLE DE 6 GROUPEMENTS CARBOXYLIQUES AU MAXIMUM PAR 100 Å ² DE SURFACE (MODELE DE PITTMAN ET COLL., 1999).	43
FIGURE 8 : DIFFERENTS GROUPES OXYGENES POUVANT ETRE GENERES A LA SURFACE DU GRAPHITE.	43
FIGURE 9 : INTERRELATIONS ENTRE LES PRINCIPALES REACTIONS ENZYMATIQUES DU SYSTEME ANTIOXYDANT.	56
FIGURE 10 : DISPOSITIF EXPERIMENTAL D'EVALUATION DE L'ACTIVITE ANTIMICROBIENNE DES FCA.	65
FIGURE 11 : SCHEMA DE PRINCIPE DE L'ANALYSE PAR CYTOMETRIE EN FLUX.	72
FIGURE 12 : SCHEMA DE PRINCIPE DU SPECTROPHOTOMETRE.	79
FIGURE 13 : PHOTO DU DISPOSITIF EXPERIMENTAL DE DECONTAMINATION DE L'AIR.	82
FIGURE 14 : PHOTO DU SYSTEME DE GENERATION DES AEROSOLS PAR DEUX NEBULISEURS (M20 ET M30).	83
FIGURE 15 : SYNOPTIQUE DU DISPOSITIF EXPERIMENTAL POUR LA DECONTAMINATION DE L'AIR.	84
FIGURE 16 : EVOLUTION DE LA CONCENTRATION BACTERIENNE D' <i>E. COLI</i> AU COURS DU TEMPS APRES PASSAGE PAR LE DISPOSITIF DEPOURVU DE MEDIA (◇) OU POURVU D'UNE MEMBRANE EN NITRATE DE CELLULOSE AU SEUIL DE COUPURE 0,2 µM (■).	92
FIGURE 17 : ACTIVITE BACTERICIDE DE FCA00 (◇), FCA01 (□), FCA02 (▲), FCA03 (Δ), FCA04 (◆), FCA05 (■) ET FCA06 (×) VIS-A-VIS D' <i>E. COLI</i>	93
FIGURE 18 : EVALUATION DE LA QUANTITE D'ATP INTRACELLULAIRE AU COURS DU TEMPS D'UNE SUSPENSION D' <i>E. COLI</i> CIRCULANT (■) OU NON (◇) SUR LE DISPOSITIF POURVU DE FCA01.	96

FIGURE 19 : ACTIVITE BACTERICIDE DE FCA01 VIS-A-VIS D' <i>E. COLI</i> (□), <i>M. LUTEUS</i> (◇), <i>K. OXYTOCA</i> (■), <i>B. SUBTILIS</i> (▲) ET <i>L. PNEUMOPHILA</i> (×).	98
FIGURE 20 : ACTIVITE GERMICIDE DE FCA01 VIS-A-VIS DE <i>S. CEREVISIAE</i> , SUR UNE SUSPENSION AJUSTEE A 10 ³ (●) OU 10 ⁵ (■) UFC.ML ⁻¹ .	99
FIGURE 21 : ACTIVITE GERMICIDE DE FCA01 VIS-A-VIS DE <i>P. PASTORIS</i> , SUR UNE SUSPENSION AJUSTEE A 10 ³ (◆), 10 ⁴ (■) OU 10 ⁵ (▲) UFC.ML ⁻¹ .	100
FIGURE 22 : ACTIVITE FONGICIDE DE FCA01 VIS-A-VIS DE <i>C. GLOBOSUM</i> (◆), <i>A. VERSICOLOR</i> (■) ET <i>P. FUNICOLORUM</i> (Δ).	101
FIGURE 23 : EVOLUTION CHRONOLOGIQUE DE L'EFFICACITE BACTERICIDE DE FCA01 VIS-A-VIS D' <i>E. COLI</i> A RECEPTION DU LOT INITIAL DE FCA (□), APRES 4 MOIS (■), APRES 9 MOIS (▲), APRES 19 MOIS (×) ET APRES 21 MOIS (◆).	103
FIGURE 24 : EVOLUTION TEMPORELLE, EN CONDITION DE VIEILLISSEMENT ACCELERE, DE L'ACTIVITE BACTERICIDE DE FCA01 VIS-A-VIS D' <i>E. COLI</i> AU PREMIER (◆), DEUXIEME (◇), TROISIEME (▲) ET QUATRIEME JOUR (Δ).	105
FIGURE 25 : PHOTOS AU MEB DE FCA01 (× 300).	106
FIGURE 26 : PHOTOS AU MEB DE FCA06 (× 300).	106
FIGURE 27 : SPECTRE DE COMPOSITION DE FCA01.	107
FIGURE 28 : ACTIVITE BACTERICIDE VIS-A-VIS D' <i>E. COLI</i> D'UNE EAU « TRAITEE » PAR FCA01, LES BACTERIES SONT ENSEMENCEES APRES 0 (◇) OU 32 MINUTES (◆).	111
FIGURE 29 : ACTIVITE BACTERICIDE VIS-A-VIS D' <i>E. COLI</i> D'UNE EAU « TRAITEE » PAR FCA06, LES BACTERIES SONT ENSEMENCEES APRES 0 (◆), 32 (◇) OU 64 (▲) MINUTES.	112
FIGURE 30 : ANALYSE DE L'INTEGRITE MEMBRANAIRE PAR CMF D'UNE POPULATION DE CELLULES VIVANTES ET DE CELLULES AYANT ETE EN CONTACT 0, 4, 8, 16 ET 32 MINUTES AVEC DE L'EAU « TRAITEE » PAR FCA06.	113
FIGURE 31 : EFFETS BACTERICIDES VIS-A-VIS D' <i>E. COLI</i> DE SOLUTIONS D'AGNO ₃ A LA CONCENTRATION DE 450 (◆) ET 7000 (□) PPB EN AG ⁺ .	117
FIGURE 32 : ACTIVITE BACTERICIDE DE FCA01 VIS-A-VIS D' <i>E. COLI</i> EN CONDITIONS D'AERATION NORMALE (□) ET D'ANOXIE (■). LE TEMOIN DE SURVIE DES BACTERIES EN ANOXIE EST EGALEMENT PRESENTE (×).	119
FIGURE 33 : SPECTRES RPE DU TEMOIN (EAU DISTILLEE + DMPO) (A GAUCHE) ET D'UN ESSAI APRES 16 MINUTES DE CIRCULATION SUR FCA01 (A DROITE).	121
FIGURE 34 : SPECTRES RPE DU TEMOIN (EAU DISTILLEE + DMPO) (A GAUCHE) ET D'UN ESSAI APRES 32 MINUTES DE CIRCULATION D'EAU DISTILLEE SUR FCA01 (A DROITE).	122
FIGURE 35 : ACTIVITE BACTERICIDE VIS-A-VIS D' <i>E. COLI</i> DE L'EAU « TRAITEE » PAR FCA06 SANS AJOUT NI DE COMPOSES INHIBITEURS NI D'AGENT NEUTRALISANT (◆), APRES AJOUT DE	

CATALASE (■), DE SOD (Δ), DE THIOGLYCOLATE DE SODIUM (×), DE SOD ET CATALASE (●), DE THIOGLYCOLATE DE SODIUM ET CATALASE (□), DE THIOGLYCOLATE DE SODIUM ET SOD (▲) ET DE SOD, CATALASE ET THIOGLYCOLATE DE SODIUM (◇).....	124
FIGURE 36 : EVALUATION DU NIVEAU D'EXPRESSION DE QUELQUES GENES D' <i>E. COLI</i> K12 APRES 4 MINUTES DE CONTACT AVEC DE L'EAU « TRAITEE » PAR FCA06. LE TRAIT SITUE A 1 MARQUE LE NIVEAU D'EXPRESSION DE GENES DANS DES CONDITIONS NON STRESSANTES.....	126
FIGURE 37 : EVOLUTION DE LA TEMPERATURE (◆), DE L'HR (□) ET DE LA CONCENTRATION DU BIOAEROSOL (▲), AU COURS DU TEMPS POUR UN TEMPS DE SEJOUR DE 4 MIN 42 SEC DANS T10.	135
FIGURE 38 : EVOLUTION DE LA TEMPERATURE (◆), DE L'HR (□) ET DE LA CONCENTRATION DU BIOAEROSOL (▲), AU COURS DU TEMPS POUR UN TEMPS DE SEJOUR DE 7 MIN 03 SEC DANS T10.	136
FIGURE 39 : EVOLUTION AU COURS DU TEMPS DE L'ABSORBANCE DE CULTURES D' <i>E. COLI</i> PRELEVEES APRES AEROSOLISATION A DES HR DE 22 % (×), 36 % (Δ) ET 53 % (◆).....	139
FIGURE 40 : ANALYSE PAR CMF DES DIFFERENCES DE FLUORESCENCE DE CELLULES VIVANTES, MORTES, AEROSOLISEES ET DE PARTICULES DE GELATINE.....	140
FIGURE 41 : ANALYSE PAR CMF DE PARTICULES DE GELATINE (A), DE CELLULES MORTES (B), DE CELLULES VIVANTES (C), ET DE BACTERIES AEROSOLISEES (D, E ET F) AYANT SUBIT UN DOUBLE MARQUAGE.	142
FIGURE 42 : ANALYSE PAR CMF DE L'INTEGRITE MEMBRANAIRE PAR CMF DE PARTICULES DE GELATINE (A), DE CELLULES MORTES (B), DE CELLULES VIVANTES (C) ET DE BACTERIES AEROSOLISEES (D, E ET F).	144
FIGURE 43 : EVOLUTION DE LA TEMPERATURE (◆), DE L'HR (□) ET DE LA CONCENTRATION DU BIOAEROSOL D' <i>E. COLI</i> (▲), AU COURS DU TEMPS POUR UN TEMPS DE SEJOUR DE 4 MIN 42 SEC DANS T10 APRES DECONTAMINATION DU BIOAEROSOL AVEC DE L'EAU OXYGENEE.....	148
FIGURE 44 : EVOLUTION DE LA TEMPERATURE (◆), DE L'HR (□) ET DE LA CONCENTRATION DU BIOAEROSOL D' <i>E. COLI</i> (▲), AU COURS DU TEMPS POUR UN TEMPS DE SEJOUR DE 4 MIN 42 SEC DANS T10 DANS UNE ATMOSPHERE SATUREE EN EAU OXYGENEE.	149
FIGURE 45 : REPRESENTATION SCHEMATIQUE DE L'EVOLUTION DES PARAMETRES EXPERIMENTAUX AU FUR ET A MESURE DE L'AVANCEE DES TESTS DE DECONTAMINATION DE L'AIR AVEC FCA06.	152
FIGURE 46 : EVOLUTION DU POURCENTAGE DE LETALITE DES BACTERIES SELON LES CONDITIONS 1 (▲), 2 (Δ), 3 (□), 4 (◆) ET 5 (×).....	154

FIGURE 47: EVOLUTION DU POURCENTAGE DE LETALITE DES BACTERIES SELON LES CONDITIONS 7 (◇) ET 8 (◆). CHAQUE COURBE EST LE RESULTAT D'UNE MOYENNE D'AU MOINS 3 EXPERIMENTATIONS.....	156
FIGURE 48 : EVOLUTION DU POURCENTAGE DE LETALITE APRES 24 (◇), 48 (□), 72 (▲), 96 (×) ET 120 HEURES (■) DE CIRCULATION D'EAU DISTILLEE STERILE SUR FCA06, EN CONTINU.....	158
FIGURE 49 : EVOLUTION DES POURCENTAGES DE LETALITE APRES 30 MINUTES DE TEMPS DE CONTACT ENTRE LE BIOAEROSOL ET L'EAU « TRAITEE » EXTEMPORANEMENT PAR FCA06.	159

Liste des annexes

ANNEXE 1 PUBLICATION N°1.....	179
ANNEXE 2 PUBLICATION N°2	180
ANNEXE 3 QUELQUES GROUPEMENTS ACIDES IDENTIFIES EN SURFACE DES FCA.....	200
(RODRIGUEZ-REINOSO, 1998).....	200
ANNEXE 4 QUELQUES GROUPEMENTS BASIQUES IDENTIFIES EN SURFACE DES FCA	201
ANNEXE 5 TEMPS DE SEJOUR REALISABLES AVEC T10 SELON LE VOLUME ET LE DEBIT D'AC APPLIQUES.....	202
ANNEXE 6 EVALUATION DE L'ETAT PHYSIOLOGIQUE, PAR CMF, D'UNE POPULATION BACTERIENNE MISE EN CONTACT AVEC DE L'EAU « TRAITEE » PAR FCA06 AVEC OU SANS AJOUT NI D'INHIBITEURS DE ROS OU D'AGENT NEUTRALISANT DES IONS ARGENT.....	203
ANNEXE 7 DETERMINATION DE LA QUANTITE D'EAU A NEBULISER POUR OBTENIR UNE HR DE 20 % A 20°C ET POUR UN DEBIT D'AC DE 50L.MIN ⁻¹	207

Introduction

De façon générale lorsque l'on parle de la qualité de l'air on parle de l'air atmosphérique. L'air est essentiel à la vie mais notre mode de vie modifie la qualité de l'air. Industrie, agriculture, transports, activités humaines introduisent des substances gazeuses, liquides ou solides dans l'air et modifient sa composition. Ces modifications sont alors appelées pollution.

A court terme et à l'échelle locale, les polluants rejetés dans l'air sont transportés et dilués par des turbulences de l'atmosphère. Le résultat est une concentration anormale de polluants dans l'air que nous respirons qui peut s'avérer néfaste pour notre santé, celle des animaux et celle des végétaux.

A moyen terme et à l'échelle régionale ou continentale, ces phénomènes sont amplifiés par le temps et l'espace. Le temps permet à des réactions chimiques d'intervenir et modifier les polluants. L'espace permet la rencontre des polluants avec d'autres molécules et il se produit alors des interactions entre elles ou des combinaisons (acidification des sols, amincissement de la couche d'ozone...).

Les sources de pollution peuvent être naturelles (les forêts émettent des Composés Organiques Volatils, les incendies émettent des gaz polluants et des métaux lourds et les éruptions volcaniques entraînent une perte d'ozone) ou anthropiques (émissions de polluants par les installations industrielles et artisanales, par les installations de combustion individuelles, collectives ou industrielles, par les installations de combustion de déchets ou par les transports).

Le problème de la pollution de l'air est généralement abordé dans le sens de la pollution atmosphérique, c'est-à-dire l'air « libre » extérieur. La pollution de l'air intérieur est peu prise en compte. Les deux aspects de pollution de l'air sont bien évidemment étroitement liés, la qualité de l'air extérieur étant déterminante pour la qualité de l'air intérieur. Toutefois, la qualité de l'air intérieur, c'est-à-dire dans les espaces confinés (habitat, lieux de travail, lieux publics) devient de plus en plus aujourd'hui un objet de préoccupation. Ce travail s'intéressera plus particulièrement à des espaces confinés tels que les transports et plus particulièrement le milieu aéronautique.

Parmi les modes de transport existant aujourd'hui, l'avion est certainement celui qui connaît l'essor le plus important. Il représente cependant un environnement particulier en raison du confinement qui y règne par rapport aux autres moyens de transport publics. La santé et le confort des occupants utilisant ce mode de transport sont dépendants de la qualité de l'air de cet environnement.

Depuis quelques décennies les études réalisées sur la qualité de l'air en milieu aéronautique se sont principalement intéressées à la contamination de nature chimique (COV...), mais s'intéressent aujourd'hui de plus en plus à la contamination biologique (microorganismes, allergènes...). Cette dernière a suscité un intérêt grandissant depuis la mise en place de systèmes de recirculation de l'air en cabine d'avion et la prise en compte de la potentielle exposition des passagers à des microorganismes aéroportés infectieux. En effet, des cas de transmission de germes infectieux : tuberculose, grippe, rougeole ou plus récemment le virus du Syndrome Respiratoire Aigu Sévère (SRAS) ont été recensés au cours de vols.

Actuellement l'élimination des microorganismes en cabine d'avion est réalisée par dilution avec de l'air neuf extérieur et grâce à des filtres à particules de haute efficacité couplé aux systèmes de circulation de l'air. Aucun traitement de décontamination n'est actuellement appliqué. Pour remédier à ces problèmes potentiels de contamination microbiologique de l'air et de risque de transmission de germes infectieux entre passagers, les industriels de l'aéronautique cherchent à mettre en place des systèmes de décontamination des bioaérosols présents en cabine d'avion. Des études sont réalisées sur des systèmes de décontamination microbiologique dont les principes sont basés sur la destruction des microbes par photocatalyse ou par choc électrique.

C'est dans ce contexte que notre équipe de recherche, en partenariat avec la société Sofrance (Groupe Snecma) a expertisé les potentialités d'une nouvelle technologie de décontamination de l'air basée sur l'utilisation de Fibres de Carbone Activé (FCA), en vue d'une application à l'air en cabine d'avion.

Développées depuis le début des années 60, les FCA représentent une nouvelle forme de charbon actif. En raison de leurs propriétés d'adsorption et de catalyse, elles sont déjà utilisées dans le traitement de l'air, non pas avec un objectif de décontamination microbienne mais pour l'élimination de micropolluants organiques tels que les COV. Ces médias sont

également connus pour posséder des capacités germicides, puisqu'ils sont utilisés comme support de pansement afin d'éviter les proliférations bactériennes, et pour la protection individuelle dans les combinaisons NBC. Du fait de la présentation du matériau sous la forme de feutre ou de tissu, de sa malléabilité, celui-ci peut être facilement incorporé dans des filtres ou des dispositifs de décontamination.

Les travaux de recherche présentés dans ce manuscrit ont été financés par un contrat CIFRE en partenariat avec la Société Sofrance dont le métier est la filtration pour des applications dans les domaines spatial, aéronautique, militaire et industriel. Les objectifs de la thèse s'inscrivent par rapport à l'état des lieux (bibliographie et besoins formulés par les industriels) sur la qualité de l'air en milieu aéronautique qui montre des besoins en terme de traitement microbiologique. Le choix de l'expertise d'un système de décontamination intégrant de la FCA a été motivé pour deux raisons : d'une part la société Sofrance utilise déjà ce média dans des systèmes d'épuration de l'air et d'autre part quelques études bibliographiques montrent que certaines typologies de FCA ont des propriétés germicides.

Le travail de la thèse a donc consisté à expertiser les potentialités de décontamination de diverses FCA en milieu aqueux pour aboutir à une application à la décontamination de l'air.

La première partie est consacrée à l'étude bibliographique, dans laquelle sera décrite la qualité de l'air en milieu aéronautique (Chapitre 1), avec en particulier une description détaillée des bioaérosols. Les modes de fabrication et les principales caractéristiques des FCA seront détaillées dans le Chapitre 2. L'exposé bibliographique se terminera ensuite par des données sur les espèces réactives de l'oxygène et leurs interactions avec certains métaux.

La deuxième partie répertoriera le matériel utilisé et des techniques analytiques biologiques et physiques employées pour réaliser ce travail.

Enfin, la troisième partie (résultats et discussion) débute par un premier chapitre consacré aux propriétés germicides de FCA et à la compréhension des mécanismes responsables de cet effet germicide. Le deuxième chapitre est dédié à l'étude des potentialités d'application d'un procédé à base de fibres de carbone activé pour la décontamination de l'air utilisant les propriétés germicides des FCA. Le principe du procédé est basé sur la décontamination d'un bioaérosol artificiel avec un aérosol de substances germicides générées grâce à FCA(Ag). Le pilote expérimental, les mises au point des paramètres et la validation du principe de décontamination seront tout d'abord détaillés. Les résultats concernant les essais de décontamination de l'air seront ensuite présentés.

Partie 1 :

Etude bibliographique

Chapitre 1 :

La qualité de l'air en cabine d'avion

L'avion devient un mode de transport essentiel dans notre société, ainsi le nombre de passagers augmente considérablement depuis quelques années et ne cesse de croître (NAGDA et coll., 2000). Environ un milliard de personnes voyage en avion chaque année sur l'ensemble des lignes nationales et internationales (BAGSHAW et coll., 2002). L'avion est un environnement unique qui peut occasionner certaines gênes à ses occupants à cause de ses particularités telles que les faibles pressions barométrique et en oxygène, la faible humidité, la basse température ou encore l'existence de bruits et de vibrations, le manque de place et le risque de transmission de maladies de personne à personne (DUMYAHN et coll., 2000 ; HALL et coll., 2000 ; SPACE et coll., 2000 ; BAGSHAW et coll., 2002).

Compte tenu de ces considérations, il devient primordial de s'intéresser aux risques sanitaires générés par cet environnement et plus particulièrement par la qualité de l'air en cabine d'avion. Selon les facteurs et les niveaux de contamination, la qualité de l'air peut avoir un impact sur la sécurité (assurée par l'équipage et les équipements de ventilation entre autres), sur la santé (maladies infectieuses) et sur le confort (odeurs, facteurs irritants, humidité relative...), ce dernier étant considéré par l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS) comme faisant partie intégrante de la santé (BALOUET, 2000).

En effet, la qualité de l'air cabine dans les transports aériens est devenue une source d'intérêt pour le public, les médias, les compagnies aériennes, les aviateurs et les législateurs depuis le début des années 80 (ASHRAE 161-2000 ; NAGDA et coll., 2000 ; SPACE et coll., 2000). La presse spécialisée, et plus spécialement la presse américaine suivie de près par la presse européenne, a souvent laissé entendre qu'il y avait une détérioration de la qualité de l'air suite à la mise en place de la nouvelle génération de systèmes de contrôle de l'environnement (Environmental Control System ou ECS) (DECHOW et coll., 1997) qui aboutit à une généralisation de la recirculation de l'air. Il est estimé que le renouvellement de l'air est faible et que le fait d'utiliser un système de recirculation entraîne la dissémination d'agents infectieux, une diminution du niveau d'oxygène et une augmentation de la concentration en dioxyde de carbone (CO₂) (HUNT et SPACE, 1994 ; HUNT et coll., 1995).

En conséquence, des travaux effectués par des agences gouvernementales, des constructeurs d'avions, des universités et des équipes de recherche indépendantes visent à étudier tous les paramètres qui entrent en jeu dans la qualité de l'air cabine (SPACE, 1993 ;

CARLILE, 1996 ; ASHRAE 161-2000). Toutes ces études ont été motivées par l'opinion publique, qui met en doute cette qualité et pense que les conditions environnementales en cabine d'avion ont des incidences sur la santé (HUNT et SPACE, 1994 ; LIPPMANN et coll., 2002), mais également par des passagers et membres d'équipage qui se sont plaints de symptômes qu'ils ont attribués aux facteurs environnementaux dans cet espace confiné (BAGSHAW et coll., 2002). En effet, tous les facteurs cités précédemment peuvent avoir pour conséquence des symptômes tels que la fatigue, des vertiges, des nausées, des maux de tête ou des irritations des yeux, du nez ou de la gorge (SPACE, 1993 ; HUNT et SPACE, 1994 ; CARLILE, 1996 ; ASHRAE 161-2000 ; LIPPMANN et coll., 2002). Les études expérimentales faites sur la qualité de l'air de 1985 à 1998 sont répertoriées dans une revue réalisée par NAGDA et coll. (2000). Cette revue a fait suite à un ouvrage édité par la National Academy of Sciences (NAS) en 1986 qui avait déjà abordé le sujet.

La cabine d'avion pourrait être assimilée à un espace intérieur tel qu'une habitation ou un bureau, dans lequel les occupants sont exposés à un mélange d'air extérieur et d'air recyclé. Cependant la cabine est un micro-environnement particulier qui comporte des différences non négligeables dont une occupation de plus haute densité, une obligation de pressurisation et des passagers qui sont dans « l'impossibilité de partir quand ils le désirent » (ASHRAE 161-2000 ; LIPPMANN et coll., 2002). Ceci entraîne la genèse de facteurs environnementaux spécifiques comme une faible humidité, une pression d'air réduite, une exposition potentielle à des contaminants tels que l'ozone (O₃), le monoxyde de carbone (CO) et autres agents chimiques, des Composés Organiques Volatils (COV) et des agents biologiques (LEE et coll., 2000 ; LIPPMANN et coll., 2002). La santé et le confort des passagers dépendent de l'apport en air neuf, de la présence de sources de contamination et de la concentration des différents contaminants, du contrôle de l'humidité et de la température, de la configuration et du volume de la cabine, de la configuration des systèmes de pressurisation et de la ventilation (SPACE, 1993).

Les paramètres reflétant la qualité de l'air, qui ont été plus particulièrement discutés dans diverses publications, sont : la ventilation et le flux d'air, la quantité de CO₂ et de CO, l'Humidité Relative (HR), les aérosols bactériens, les COV et les pesticides, la fumée de tabac, l'ozone, la pressurisation et la pression partielle en O₂. Dans une cabine d'avion il existe un niveau d'aérobiocontamination comparable à n'importe quel autre espace intérieur (pièce, bureau, bus ou train) (BAGSHAW et coll., 2002). Le nombre élevé de personnes

voyageant par avion et leur proximité étroite requise à bord soulève une inquiétude à propos de la transmission de maladies d'origine microbiologique par contact de personne à personne et par l'air (WICK et IRVINE, 1995).

Bien qu'il n'y ait aucune donnée montrant la fréquence des interventions médicales, voire de décès, suite à des expositions contaminantes en vol, les études faites montrent que les cas de transmission de maladies sont relativement rares mais existent (LIPPMANN et coll., 2002).

I QUELQUES REGLEMENTATIONS SUR LA QUALITE DE L' AIR

En l'absence de normes, de nombreux comités se sont mis en place afin d'établir des standards pouvant être appliqués à la qualité de l'air en cabine d'avion.

En ce qui concerne les concentrations en contaminants, le Tableau 1 regroupe quelques standards proposés par certains organismes ou comités tels que la Federal Aviation Administration (FAA), l'American Society of Heating Refrigerating and Air-Conditioning Engineers (ASHRAE), la National Air Ambient Quality Standards (NAAQS), la United States Environmental Protection Agency (US EPA) et la Society of Automotive Engineers (SAE).

Les standards proposés par ASHRAE couvrent les contaminants chimiques et biologiques de même que certains paramètres physiques de la cabine (température, humidité, pression...) (NAGDA et coll., 2000).

Il n'existe pas de normes quant aux concentrations de bactéries, virus et champignons aéroportés (NAGDA et coll., 2000). Diverses recommandations sont actuellement proposées par des organismes tels que la FAA ; la Joint Aviation Authorities (JAA) et, par des organisations telles que l'OMS (BALOUE, 2000)

Tableau 1 : Exemples de recommandations applicables à la qualité de l'air d'après NAGDA et coll., 2000 et ASHRAE 161-2000 pour les avions de plus de 19 passagers.

Contaminants	Temps d'exposition	Valeurs limites	Références
CO ₂	/	5 000 ppm	FAA
	en moyenne sur le vol	2 500 ppm	JANSSEN, 1989
CO	/	50 ppm	FAA
	1 heure	35 ppm	NAAQS
	8 heures	9 ppm	NAAQS
	en moyenne sur le vol	9 ppm	US EPA
O ₃	valeur maximale	0,25 ppm	FAA
	3 heures	0,1 ppm	FAA
	1 heure	0,12 ppm	NAAQS
	en moyenne sur le vol	0,12 ppm	US EPA
Particules ≥ 10 µm	8 heures	0,08 ppm	NAAQS
	24 heures	150 µg.m ⁻³	NAAQS
	en moyenne sur le vol annuel	150 µg.m ⁻³ 50 µg.m ⁻³	US EPA NAAQS
Particules ≥ 2,5 µm	24 heures	65 µg.m ⁻³	NAAQS
	annuel	15 µg.m ⁻³	NAAQS
Pression en altitude	/	doit être au minimum dans la zone de la pression atmosphérique qui règne à 2 440 m (8 000 ft)	FAA
Vitesse de ventilation dans la zone de respiration	en continue	566-1 700 L.min ⁻¹	ASHRAE Std. 55-1995
Bioaérosols	avec de l'air recyclé, l'efficacité minimum de filtration doit être de 95 % à 0,3µm		
Humidité Relative		≤ 25 %	SAE
Pression partielle en oxygène	Valeur minimale	1,57.10 ⁴ Pa	FAA

Les paramètres « vitesse de ventilation » et « dioxyde de carbone » sont sélectionnés selon des critères de confort. Les autres paramètres sont fixés en tenant compte de considérations en termes de santé et de sécurité. « En moyenne sur le vol » signifie que la moyenne est faite sur la durée pendant laquelle la qualité de l'air est dépendante des systèmes de ventilation de l'appareil, c'est-à-dire depuis l'embarquement de l'équipage jusqu'au débarquement des passagers, ce temps ne comprend pas les temps de maintenance et de nettoyage de l'avion.

II PARAMETRES PHYSIQUES INFLUENÇANT LA QUALITE DE L’AIR EN AVION

Durant le vol, la cabine est un environnement ventilé et fermé où les passagers sont totalement dépendants des instruments qui contrôlent la qualité de l’air en cabine, comme les ECS. Ces systèmes doivent gérer et contrôler de nombreux paramètres qui interagissent et contribuent à la bonne qualité de l’air en cabine. Dans cette partie nous détaillerons les principaux paramètres à prendre en compte pour statuer sur cette qualité.

II.1 Flux d’air et ventilation

D’une façon générale, l’air apporté en cabine d’avion est un mélange d’air neuf et d’air recyclé : 50-50 % dans le cas du Boeing 767 (HUNT et SPACE, 1994 ; HUNT et coll., 1995) et 60 % d’air neuf et 40 % d’air recyclé pour les Airbus A310 et A340 (CARLILE, 1996). Les recommandations (JAR 25-281, FAA et ASHRAE 62-1989) exigent que l’air délivré soit au moins pour la moitié composé d’air neuf (SPACE, 1993 ; CARLILE, 1996 ; LEE et coll., 2000). L’air neuf est soutiré au niveau des moteurs ou dans certaines circonstances au niveau des groupes auxiliaires de puissance (ou APU pour « Auxiliary Power Units »). Le volume total d’air est renouvelé approximativement toutes les 2-3 minutes dans une cabine de taille standard, soit 20 à 30 changements d’air en 1 heure. En comparaison, dans un immeuble standard, l’air est changé 1 à 2,5 fois par heure avec 75 % d’air recyclé (HUNT et SPACE, 1994).

La quantité d’air délivrée par occupant n’est pas définie par le besoin en oxygène mais par deux facteurs principaux qui sont l’élimination du CO₂ et la distribution homogène de la température en cabine (CARLILE, 1996). Ce fort taux de renouvellement de l’air sert en effet à contrôler les gradients de température, mais aussi à prévenir les zones stagnantes d’air froid, et à dissiper les odeurs (SPACE, 1993 ; HUNT et SPACE, 1994 ; CARLILE, 1996 ; LIPPMANN et coll., 2002).

Pour un passager en position assise, il est délivré environ au moins 80 fois plus d’air (mélange d’air neuf et recyclé) qu’il ne lui est nécessaire. Son besoin est de 6,8 L d’air par minute et environ 567 L d’air sont délivrés par personne par minute. Les contaminants

générés dans la cabine sont éliminés par la ventilation (phénomène de dilution avec l'apport d'air extérieur) (LIPPMANN et coll., 2002).

II.2 Humidité Relative (HR)

L'HR, à une température donnée, est le rapport de la vapeur présente dans l'air sur la quantité de vapeur contenue dans cet air à saturation. Une HR de l'ordre de 40 à 60 % représente la valeur typique recommandée pour le confort des passagers, mais serait par contre défavorable pour la sûreté de l'avion. En effet, une trop forte HR entraînerait des phénomènes de condensation au niveau des parois, gorgeant ainsi les matériaux d'isolation d'eau, ce qui augmenterait la masse de l'avion, diminuerait les performances d'isolation et entraînerait le développement de champignons et de bactéries, voire même la corrosion de la coque (ASHRAE 161-2000).

A très haute altitude, l'air est extrêmement sec (de l'ordre de 2 %), alors qu'au sol et dans les phases de vol intermédiaires, l'air doit être déshumidifié avant son injection en cabine afin de prévenir une humidité excessive (LEE et coll., 2000 ; LIPPMANN et coll., 2002). A haute altitude, l'HR de l'air s'accroît progressivement après son passage dans le système de recirculation de l'air cabine grâce aux principales sources d'humidité présentes dans la cabine, c'est-à-dire la respiration et l'évaporation par sudation des passagers (LIPPMANN et coll., 2002). L'évaporation d'eau à partir de la nourriture et des boissons peut également contribuer à une très légère augmentation de l'HR. Les valeurs d'HR en cabine peuvent varier de 5 à 35 % avec une moyenne se situant aux alentours de 20 %. Une valeur moyenne supérieure d'HR peut difficilement être obtenue en raison du fort taux de renouvellement de l'air avec l'air extérieur qui est extrêmement sec. Une longue exposition (supérieure à 3-4 heures) à cette faible HR est une source d'inconfort et peut entraîner une sécheresse de la gorge et des yeux (SPACE, 1993 ; HUNT et SPACE, 1994 ; CARLILE, 1996 ; ASHRAE 161-2000). Malgré cela, la réglementation ASHRAE 55-1992 recommande le maintien du pourcentage d'HR entre 25 et 30 % pour des vols relativement longs, avec un minimum de 20 % (ASHRAE 161-2000 ; LEE et coll., 2000 ; LIPPMANN et coll., 2002). Une HR inférieure à 20 % peut cependant être acceptée pour de courts trajets. Il faut noter qu'il existe un conflit entre le maintien de l'HR et le contrôle des contaminants car augmenter l'HR, signifie une diminution de l'apport d'air extérieur et permet donc une accumulation des polluants (LIPPMANN et coll., 2002).

Le fait qu'il y ait une HR très faible en cabine présente cependant certains avantages tels que l'inhibition de la prolifération des champignons, la diminution de la viabilité de certaines bactéries ou encore la diminution de la perception de certaines odeurs. La faible humidité a en outre l'inconvénient de favoriser le dépôt de particules respirables et ainsi par ce biais la probabilité de survie des germes aéroportés est augmentée.

Pour le confort des passagers, il est possible d'augmenter l'HR à l'aide d'humidificateurs. La mise en place de ces systèmes a pour conséquence de générer une pénalité de poids liée à l'eau à transporter, de plus une telle zone humide est un terrain propice à la prolifération bactérienne (LIPPMANN et coll., 2002). Certains humidificateurs ont malgré tout été développés et sont utilisés sur de petits appareils mais ce sont des équipements coûteux qui peuvent générer un risque accru de transmission de maladies infectieuses. De tels systèmes doivent être couplés à des assécheurs au niveau des parois de l'appareil. Une maintenance rigoureuse, des nettoyages et des désinfections des humidificateurs sont également nécessaires.

II.3 Pression barométrique et teneur en oxygène

La principale différence existant entre l'environnement d'une cabine d'avion et celui au sol est relative à l'atmosphère. L'air dans les appareils modernes est à une pression inférieure de celle du niveau de la mer. Ces conditions entraînent deux conséquences : une diminution de la pression en oxygène et une expansion des gaz dans le corps humain (BAGSHAW et coll., 2002). Les appareils volant au-dessus de 6 000 mètres doivent donc être pressurisés (Arrêté du Ministère des transports du 05/11/1987).

En ce qui concerne la pression en cabine, le but de la Federal Aviation Regulation (FAR) est principalement de protéger les occupants du phénomène d'hypoxie. FAR 25 exige que cette pression soit au minimum équivalente à celle qui règne dans la zone atmosphérique à environ 2 440 mètres (ASHRAE 161-2000). En ce qui concerne la teneur en oxygène, un humain consomme 4,25 L d'oxygène par minute alors que le système de ventilation délivre environ 119 L d'oxygène par minute par occupant, ce qui représente une quantité 28 fois supérieure par minute par personne (HUNT et SPACE, 1994 ; ASHRAE 161-2000).

III CONTAMINANTS DE L’AIR

Après avoir répertorié, les principaux paramètres qui contribuent à la qualité de l’air en cabine d’avion, nous nous focaliserons désormais sur le paramètre qui nous concerne pour ce travail : la contamination de l’air et plus précisément l’aérobiocontamination. Dans un premier temps, nous développerons d’une façon générale quels sont les différents types et sources de contaminants, puis nous nous attarderons sur les bioaérosols.

III.1 Taille et type de contaminants

Un classement des différents contaminants est établi selon des critères de taille depuis les molécules gazeuses (0,0003 à 0,003 μm), aux aérosols biologiques, minéraux et organiques (0,01 à 1 μm), aux fibres et grains de poussière (entre 1 et 100 μm), jusqu’aux plus grosses particules : les matériaux fibreux dont la longueur excède 25 mm (Figure 1).

Tous ces contaminants peuvent également être classés selon deux grandes catégories : les particules et les gaz. Par définition, les particules ($\geq 0,01 \mu\text{m}$) peuvent être éliminées par filtration mécanique alors que les molécules gazeuses ($\leq 0,003 \mu\text{m}$) sont éliminées par des mécanismes physico-chimiques tels que l’adsorption ou la catalyse (BALOUE, 2000).

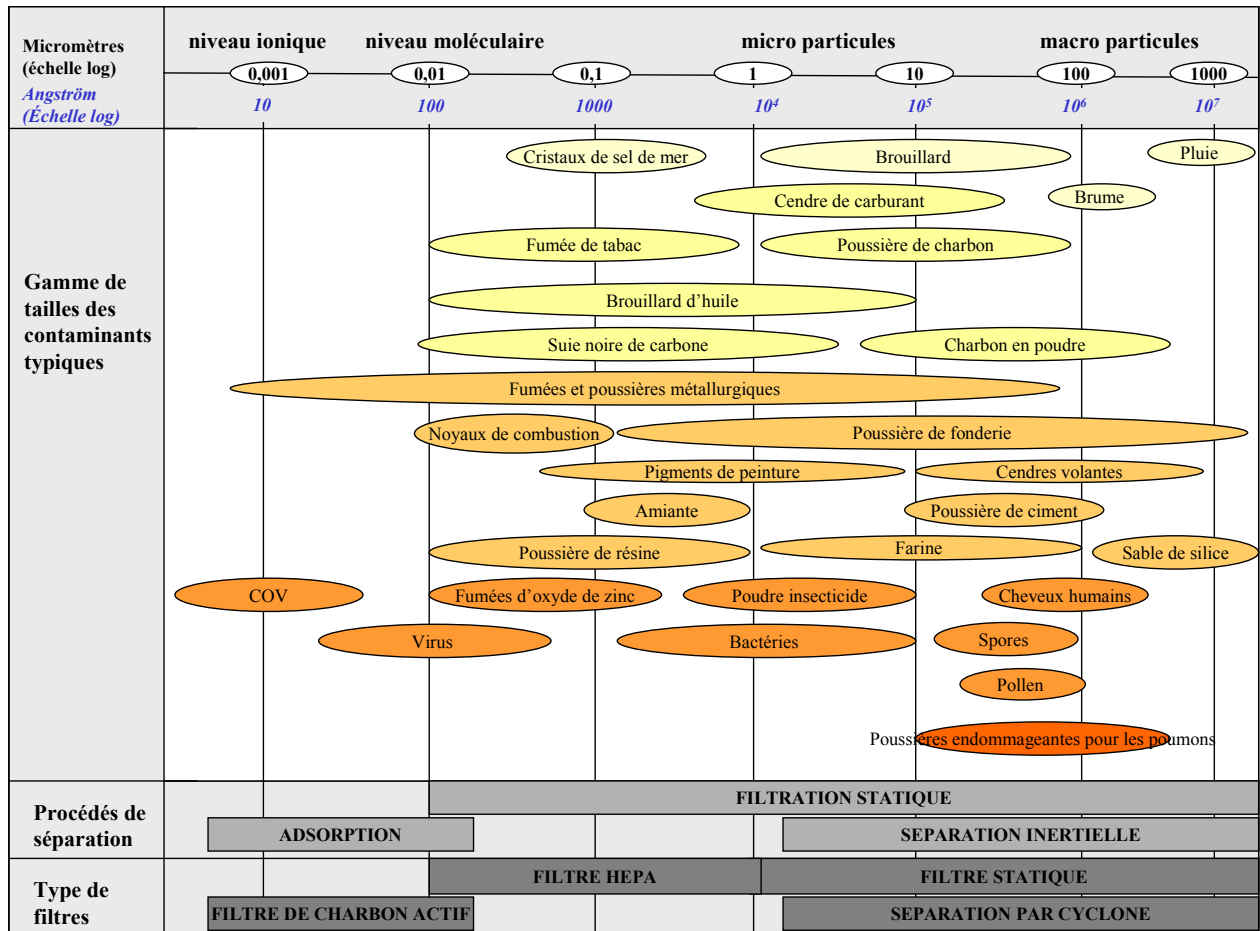


Figure 1 : Classement des contaminants selon leur taille.
(HEPA : “High Efficiency Particulate Air”)

III.2 Sources de contamination

Les contaminants peuvent provenir de l’intérieur de l’avion (la cabine elle-même et les occupants) ou de l’extérieur de l’avion (air ambiant). Il existe donc plusieurs sources, mais également plusieurs modes de propagation et plusieurs modes d’élimination (LIPPMANN et coll., 2002). Pour parler de façon plus générale, les biocontaminants sont normalement introduits par les passagers et l’air extérieur, occasionnellement par l’ECS durant les opérations au sol, alors que les composés chimiques aéroportés ont pour origine l’avion ou les activités qui y sont réalisées (moteurs, opérations de désinfection, repas...) (BALOUE, 2000).

Ces sources de contamination peuvent être classées en 5 catégories :

- l'air ambiant

La ventilation de la cabine se fait grâce à l'air ambiant, soit de façon naturelle lorsque les portes sont ouvertes, soit de façon forcée par les étages compresseurs des moteurs ou des APU. L'air ambiant comprend les polluants habituellement trouvés dans la zone géographique dans laquelle est localisé l'aéroport, les polluants apportés par les gaz d'échappement des avions et des véhicules de service. Les principaux sont le CO₂, le CO, les hydrocarbures, les oxydes d'azote ou de sulfures (LIPPMANN et coll., 2002)... Enfin cet air ambiant contient des microorganismes et des allergènes comme les spores de champignons et le pollen.

- l'air provenant des moteurs ou air pressurisé

L'air extérieur est introduit dans la cabine de l'avion par les étages compresseur des moteurs principaux (en vol) ou les APU. De ce fait, il peut se charger accidentellement d'huile de lubrification ou de fluides hydrauliques. Généralement cette contamination par l'air pressurisé est la conséquence d'incidents où des fumées et de la vapeur passent dans le cockpit et la cabine. La fréquence de ces incidents varie considérablement d'un avion à l'autre (3,88 incidents pour 1000 cycles de vol pour le BAe 146 à 0,09 pour 1000 cycles de vol pour le Boeing B737 (LIPPMANN et coll., 2002)).

- les occupants

Ils sont les principales sources d'émission de bio-effluents allergènes et d'agents infectieux. Ils peuvent être classés selon deux catégories : les passagers relativement sédentaires et immobiles et l'équipage qui est plus actif (ASHRAE 161-2000). De part les processus métaboliques normaux, ils émettent une grande variété de molécules telles que : des alcools, des aldéhydes, des mercaptans et des sulfures, des acides organiques (acides pyruvique, caprylique ou valérique), des composés nitrogénés organiques ainsi que d'autres composés tels que l'hydrogène, l'ammoniaque, le CO et le CO₂ (LIPPMANN et coll., 2002). Ces émissions comprennent aussi les éléments provenant de la peau et des poumons (tels que le CO₂, les bactéries ou les virus). De plus, une personne malade peut disséminer des agents microbiens (par le biais d'aérosols). Enfin, les produits d'hygiène (colognes, parfums...), les vêtements sont des sources émettrices de molécules gazeuses et/ou particulaires.

- les matériaux propres à l'avion

La plupart des composants de l'avion sont en matière plastique comme par exemple les compartiments à bagages, les parois latérales, les plafonds, les toilettes... Les occupants sont par conséquent exposés à de nombreux plastifiants comme les phtalates. Ces plastiques sont des sources émettrices de COV de même que les enduits et les colles utilisés dans l'assemblage des matériaux. La surface interne des avions et le fuselage sont enduits de matériaux anticorrosifs et antimicrobiens. Les sièges et les revêtements de sol peuvent être traités par des agents anti-tâches et des produits antifongiques et antibactériens. Cependant aucune étude n'a été publiée quant aux risques d'émissions engendrées par ces enduits. Enfin, les tissus et fluides (réfrigérants, lubrifiants, fuel, fluides hydrauliques) peuvent émettre des polluants (LIPPMANN et coll., 2002).

- les émissions liées aux opérations effectuées dans l'avion

Cette catégorie regroupe : les services de repas et boissons (odeurs de nourriture, éthanol des boissons alcoolisées servies), les compartiments de cargaison (vapeurs chimiques, allergènes d'animaux...), l'utilisation des désinfectants, pesticides (leur utilisation est variable d'une destination à l'autre), solvants de nettoyage (l'intérieur d'un avion est nettoyé entre chaque vol), et la maintenance (le remplacement de sièges, de moquettes ou de sol, a pour conséquence une accumulation de poussières dans l'avion) (LIPPMANN et coll., 2002).

III.3 Quelques molécules gazeuses

III.3.1 Dioxyde de carbone (CO₂)

Dans la cabine, le CO₂ est principalement généré par la respiration des passagers et de l'équipage, et, par les réfrigérateurs (CARLILE, 1996 ; LEE et coll., 2000). Différentes études montrent que les concentrations en CO₂ peuvent varier, selon le moment du vol, entre 293 à 4 238 ppm en cabine (LIPPMANN et coll., 2002). La teneur en CO₂ est utilisée comme indicateur de la qualité de l'air et donc du bon fonctionnement de la ventilation (SPACE, 1993 ; DUMYAHN et coll., 2000). Durant un vol, la moyenne de CO₂ se situe entre 600 et 1 500 ppm et une étude effectuée par la National Aeronautics and Spatial Administration (NASA) montre que des concentrations inférieures à 5 000 ppm n'ont aucun effet sanitaire sur les passagers et l'équipage. Entre 5 000 et 30 000 ppm, il peut se produire des changements

biochimiques comme le phénomène d'hypercapnie (augmentation de la pression en CO₂ du sang artériel) qui entraîne une baisse du pH sanguin. Une concentration supérieure à 30 000 ppm peut provoquer des atteintes pathologiques allant des maux de tête, vertiges et troubles de la vue au coma voire à la mort (HUNT et SPACE, 1994 ; LEE et coll., 2000). Bien que la teneur en CO₂ soit considérée comme un marqueur de la qualité de l'air, le taux de renouvellement de l'air tel qu'il est réalisé (20 à 30 fois par heure) n'est cependant pas suffisant à lui seul pour éliminer la totalité de CO₂ produit (BALOUET, 2000).

III.3.2 Monoxyde de carbone (CO)

Le CO est un sous-produit de combustion, il provient principalement des fumées de cigarettes (CARLILE, 1996) et de la combustion du fuel (LEE et coll., 2000). La généralisation des vols non-fumeurs a contribué au respect des valeurs seuils. Les concentrations en CO sont généralement très inférieures à celles considérées comme dangereuses pour la santé (NAGDA et coll., 2000) (Tableau 1).

III.3.3 Ozone (O₃)

O₃ est naturellement présent dans l'atmosphère. C'est la conséquence de la conversion photochimique de l'oxygène par les Ultra Violets (UV) du soleil. Les concentrations en O₃ varient selon les saisons (CARLILE, 1996) et augmentent avec l'altitude (SPACE, 1993). A altitude de croisière, O₃ est naturellement présent et c'est le principal polluant de l'air ambiant. Pour contrôler ces concentrations en O₃, il existe des convertisseurs catalytiques ou des systèmes d'adsorption sur charbon (LIPPMANN et coll., 2002).

III.3.4 Composés Organiques Volatils (COV)

Alors que les éléments tels que les microorganismes, et les poussières peuvent être éliminées par filtration, il n'en est pas de même pour les composés gazeux (HUNT et SPACE, 1994 ; HUNT et coll., 1995). Ces composés sont émis par les différents produits proposés en cabine d'avion (repas, boissons...), par les produits de nettoyage, les pesticides ou les désinfectants. En trop fortes concentrations, les COV peuvent être une source d'inconfort (mauvaises odeurs...). DECHOW en 1996 a effectué des mesures de concentrations des COV

lors de différents vols. Leur détection est possible suite à leur piégeage à l'aide de pompes d'aspiration dans des tubes contenant des matériaux adsorbants (ex : gel de silice ou carbone activé). Le prélèvement est réalisé pendant plusieurs heures puis les concentrations sont évaluées après extraction des composés par désorption thermique. Cette étude a permis de montrer la présence de 64 COV différents. Plusieurs d'entre eux sont présents en trop faible quantité pour pouvoir être quantifiés. Les principaux composés détectés sont récapitulés dans le Tableau 2.

Tableau 2 : Principaux COV détectés en milieu aéronautique.

COV	Concentration (ppb)	Origine
éthanol	149-1780	boissons alcoolisées
acétone	3-236	produit métabolique, tabac
toluène	2,3-135	fuel et tabac
formaldéhyde (le seul aldéhyde détecté)	3-26	tabac, agents nettoyeurs
acide acétique	4-11	repas et agents nettoyeurs
nicotine	0,2-26	tabac

Cette étude conclut que la plupart des substances présentes se retrouvent également dans d'autres espaces intérieurs (habitats, bureaux...). Leurs teneurs peuvent être comparées à celles de ces espaces intérieurs, tout en ne les excédant pas (DECHOW, 1996).

III.4 Bioaérosols

Les bioaérosols comprennent toutes les particules d'origine biologique aéroportées (bactéries, virus, actinomycètes, spores de champignons, pollen, allergènes...).

La première source de contamination est l'air extérieur pour lequel il faut différencier l'air au sol et en altitude. Au sol, il contient un panel abondant d'agents biologiques et plus particulièrement des champignons et des grains de pollen. Il comporte également des bactéries, des fragments d'animaux (insectes) ou de plantes en concentrations très diverses. Ces concentrations dépendent des conditions environnementales. Au sol, cet air entre dans l'avion par le biais de la ventilation ou lors de l'ouverture des portes et peut donc contenir un mélange de bioaérosols divers (CHALMERS et coll., 1986 ; LIPPMANN et coll., 2002).

A haute altitude, l'air extérieur ambiant est beaucoup moins concentré en bioaérosols. Les radiations solaires, la présence d'ozone, la faible température et la faible humidité sont autant de conditions défavorables à la croissance microbienne et réduisent donc fortement la présence de microorganismes et autres molécules d'origine biologique. De plus, l'air compressé utilisé pour la ventilation, inactive fortement les agents biologiques de par ses caractéristiques hostiles (température de 250°C et pression de 3 000 kPa) (LIPPMANN et coll., 2002). Cet air est extrêmement chaud (250°C) puisqu'il provient des moteurs, il est ensuite refroidi à 112°C, puis après quelques passages supplémentaires sur des échangeurs thermiques il est injecté dans le système de distribution d'air de l'appareil. Lorsque cet air est introduit dans le système de ventilation il est pour ainsi dire stérile (WICK et IRVINE, 1995). A haute altitude, l'air extérieur n'est donc pas considéré comme une source de contamination.

Le second vecteur, source de microorganismes, est lié à la présence des occupants. Ils sont la principale source émettrice de microorganismes aéroportés et représentent le plus important réservoir d'agents infectieux (CHALMERS et coll., 1986 ; WICK et IRVINE, 1995 ; DECHOW et coll., 1997 ; LIPPMANN et coll., 2002). Ils apportent les microorganismes par le biais de la peau, du cuir chevelu, du nez et de la bouche. Ils peuvent également introduire les microbes dans l'avion *via* leurs chaussures, leurs bagages à main ou leurs habits. Lorsqu'un passager ou une personne de l'équipage est malade, il peut de plus être la source de dissémination de germes pathogènes. Une personne infectieuse peut libérer des germes en respirant ou toussant et les personnes les plus exposées sont celles qui sont les plus proches d'elle. Il n'y a aucune preuve selon laquelle les germes seraient disséminés par le système de ventilation, mais il ne faut pas écarter le fait qu'une contamination de personne à personne soit accentuée dans un espace confiné tel que la cabine d'avion. Le mélange d'air neuf et recyclé ne se fait pas dans la cabine et, de plus, il est filtré sur des filtres de haute efficacité qui sont des systèmes très performants d'élimination mécanique des particules. Cependant des incidents de transmission de maladies de personne à personne ont été recensés (voir Tableau 5), ils concernent des cas de grippe, de rougeole, de tuberculose et de SRAS (BAGSHAW et coll., 2002 ; PAQUET et coll. 2003).

En considérant les deux sources identifiées de microorganismes (l'air extérieur au sol et les occupants de l'avion) on retrouve, d'une part, les microbes provenant de l'environnement au sol, qui peuvent croître dans la cabine bien qu'aucune étude n'ait encore

démontré une contamination due à ces microorganismes (LIPPMANN et coll., 2002), et d'autre part, les agents infectieux, qui se transmettent de personne à personne mais qui croissent très mal en dehors du corps humain.

Un facteur pouvant aggraver la contamination microbiologique de l'air cabine est la prolifération de germes dans des filtres du système de recirculation d'air ou dans des humidificateurs qui peuvent être des lieux propices aux développements microbiens. Dans ces réservoirs, les principaux contaminants sont les bactéries hydrophiles à Gram négatif et les actinomycètes : bactéries filamenteuses à Gram positif pouvant être allergènes et qui peuvent se disséminer sous la forme de sporophores de cellules résistantes faisant office de spores.

IV QUELQUES ETUDES EXPERIMENTALES SUR LES BIOAEROSOLS

En 1986, CHALMERS et coll., dans un ouvrage de la NAS portant sur l'environnement en cabine d'avion, montrent la nécessité de faire des études sur les contaminants biologiques. Ils évoquent le fait qu'il est impossible d'évaluer les impacts des bioaérosols sur la santé puisqu'il n'existe aucune donnée sur leurs concentrations.

Parmi les mesures de polluants réalisées, très peu concernent la contamination bactérienne ou fongique dans les cabines d'avion. Il existe donc peu de sources d'informations disponibles sur la composition microbiologique de l'air cabine. La majorité des études faites concernent surtout les sous-produits du tabac et les autres contaminants (WICK et IRVINE, 1995). Sur les 15 dernières années, seulement 8 études sur les agents biologiques sont recensées : NAGDA et coll. (1989 et 1992), Air Transport Association (ATA) (1994), SPENGLER et coll. (1994 et 1997), DUMYAHN et coll. (2000), WICK et IRVINE (1995), DECHOW (1996 et 1997), LEE et coll. (1999 et 2000) et ASHRAE/CSS (Consolidated Safety Services) (1999). Les mesures ont été faites sur environ 250 vols intérieurs et internationaux, 17 avions différents de par la catégorie et l'âge (LIPPMANN et coll., 2002). Le Tableau 3 résume les caractéristiques et les résultats obtenus sur la contamination biologique lors de ces différentes études. Le Tableau 4 récapitule les concentrations en bactéries et en champignons et quelques caractéristiques associées de l'air en vol (HR et température).

Tableau 3 : Caractéristiques et résultats des études faites sur des bioaérosols en cabine d'avion.

Auteurs	Vols Avions	Agents biologiques	Conditions de prélèvements d'air	Résultats	Conclusions
NADGA et coll., 1989, 1992	92 vols (fumeurs et non-fumeurs) 12 lignes aériennes 10 avions	Bactéries aéroportées cultivables et champignons	<ul style="list-style-type: none"> - Les prélèvements sont réalisés avec un impacteur multi-trous (SAS compact), en fin de vol juste avant la descente. - Ils sont faits en milieu et queue d'avion. 	<ul style="list-style-type: none"> - La concentration en microbes augmente avec le nombre de passagers. - Les concentrations en agents biologiques sont supérieures en section fumeurs et dans les avions avec recirculation d'air. - Plus le taux de changement d'air est faible et plus il y a de microbes. 	<ul style="list-style-type: none"> - Les bactéries et champignons sont typiques de l'environnement au sol et sont présents en concentrations équivalentes. - Il semble n'y avoir aucun risque pour la santé.
ATA 1994	35 vols intérieurs 8 lignes aériennes 2 avions avec recirculation et 2 sans	Bactéries aéroportées cultivables et champignons	<ul style="list-style-type: none"> - Les prélèvements sont réalisés avec un impacteur multi-trous (SAS compact), en fin de vol. - Toutes les parties de l'avion sont analysées. 	<ul style="list-style-type: none"> - Les concentrations sont inférieures à 10^3 UFC.m⁻³ et proportionnelles au nombre d'occupants. - Les concentrations mesurées sont relativement faibles. - Aucun agent infectieux n'a été détecté. 	<ul style="list-style-type: none"> - Les occupants et leur activité sont responsables des contaminants. - Il n'y a aucun risque pour la santé. - L'élimination effectuée par les systèmes de ventilation semble suffisante.

SPENGLER et coll. 1994 et 1997	22 vols intérieurs	Bactéries aéroportées cultivables	- Les prélèvements sont réalisés avec un impacteur multi-trous (Burkard).	- Il n'y a pas de différence significative entre les concentrations de bactéries, champignons et de poussière d'un véhicule à l'autre (à l'exception des bactéries au moment du débarquement).	- Les mesures des concentrations en agents biologiques, en avion, sont généralement plus faibles que dans les endroits communs ou dans l'air extérieur.
	8 lignes aériennes	Allergènes et endotoxines dans la poussière	- Les prélèvements sont faits à tout moment du vol et partout dans l'avion.	- Les concentrations en bactéries ont tendance à être un peu plus élevées en avion avec recirculation.	- Aucune mesure de concentration à risque n'a été faite.
	10 avions	Etude comparative avec d'autres transports publics	- Un échantillonnage de poussière est réalisé sur les tapis et les sièges.	- La principale source de contamination est les passagers.	- L'identification des effets d'HR, température, mouvement de l'air et taux d'occupation pourrait aider à comprendre les fluctuations de concentrations en agents infectieux.
DUMY-AHN et coll., 2000	27 endroits (avions, trains, bus, métro)	Bactéries aéroportées cultivables	- Les prélèvements sont réalisés avec un impacteur multi-trous.	- Les souches de champignons sont similaires dans tous les véhicules étudiés.	
	1 avion	Champignons cultivables de l'air et dans la poussière	- Les prélèvements sont effectués dans la queue de l'avion, et en milieu de train, bus et métro.	- Des allergènes de chat sont présents dans presque tous les échantillons de poussière, avec des concentrations très élevées dans 2 trains et 1 métro.	
		Comparaison avec les concentrations d'autres transports publics	- Les prélèvements se font à tous moments des voyages.		
WICK et IRVINE 1995	44 vols	Bactéries aéroportées cultivables et champignons	- Les prélèvements se font grâce à un impacteur centrifuge (RCS).	- Une augmentation des concentrations en bactéries et champignons est observée durant les périodes de grande activité des passagers.	- La concentration mesurée en avion est plus faible qu'en ville et n'a aucun risque pour la santé (pas de transmission aux passagers).
	1 ligne aérienne	Comparaison avec les concentrations trouvées en milieux urbains	- Les mesures de concentrations de poussière sont faites sur 1-3 m ² (4-6 sièges).	- Il existe une petite différence entre les concentrations en bactéries et champignons selon l'endroit où est effectuée la mesure.	
	8 avions		- Les prélèvements sont effectués à tout moment du vol, et dans tous les endroits : appareils, aéroports, abris de bus...		

<p>DE- CHOW 1996 et DE- CHOW et coll. 1997</p>	<p>14 vols 2 lignes aériennes 2 avions (A310 et A340)</p>	<p>Bactéries aéroportées cultivables et champignons</p>	<p>- Les prélèvements sont effectués avec un impacteur Slit FH2. - Les analyses sont faites dans tous les endroits de l'avion, et à différents intervalles de temps au sol et durant le vol.</p>	<p>- Les concentrations en champignons sont très faibles mais les concentrations en bactéries dépassent souvent les limites imposées en hôpital. - Les concentrations les plus élevées en bactéries sont relevées au début du vol et au débarquement. - Les concentrations en bactéries sont plus faibles en cockpit qu'en cabine. - Les concentrations en bactéries augmentent avec la densité des occupants.</p>	<p>- La principale source de contamination est la présence de passagers. -L'exposition des passagers aux champignons est sans incidence pour la santé. - Le seul risque est celui de transmission de personne à personne donc celui de transmission à courte distance.</p>
<p>LEE et coll. 1999 et 2000</p>	<p>3 vols 1 ligne aérienne 1 avion</p>	<p>Bactéries aéroportées cultivables et champignons</p>	<p>- Les prélèvements sont effectués avec un impacteur multi-trous (Burkard). - Un échantillonnage est effectué en classes business et économique. - Les prélèvements sont réalisés juste après le décollage, à mi-vol et juste avant l'atterrissage.</p>	<p>- Toutes les concentrations mesurées en bactéries et champignons sont inférieures à $10^3.m^{-3}$. - Les concentrations les plus élevées sont mesurées en début et à la fin de chaque vol.</p>	<p>- La qualité de l'air est généralement satisfaisante. - Les concentrations sont généralement faibles et augmentent avec l'activité des passagers.</p>
<p>ASHRAE / CSS PIERCE et coll. 1999 JAN- CZWES KI 2001</p>	<p>8 vols 1 avion</p>	<p>Bactéries aéroportées cultivables et champignons</p>	<p>Les prélèvements sont effectués avec un impacteur multi-trous (SAS compact) à l'avant et à l'arrière de l'appareil. - Les échantillonnages sont faits pendant l'embarquement, le vol et le débarquement.</p>	<p>- Les concentrations sont faibles comparées à celles d'espaces intérieurs. - Les concentrations sont plus élevées à l'embarquement et au débarquement et aucune bactérie infectieuse n'a été isolée. - Deux souches de champignons potentiellement infectieux ont été isolées (<i>Aspergillus niger</i> et <i>Paecilomyces variotti</i>).</p>	<p>- Les résultats indiquent qu'il semble qu'il y ait peu de risques pour les occupants. - La transmission potentielle de maladie par la ventilation est faible. Une transmission potentielle en raison de la proximité des gens est à envisager. - L'augmentation de l'apport en air extérieur ne modifie pas le risque de transmission de personne à personne.</p>

Tableau 4 : Données sur la concentration en microorganismes en liaison avec des paramètres physiques en vol.

	NAGDA et coll., 1989	DECHOW, 1996	SPENGLER et coll., 1997	CSS, 1994	ASHRAE/ CSS, 1999	LEE et coll., 1999	WICK et IRVINE, 1995
Nombre de vols étudiés	92	/	6	35	8	/	45
Bactéries (UFC.m ⁻³ d'air)	Moy 131 Max 642 Min /	Moy / Max 1 700 Min 20	Moy 201 Max 681 Min /	Moy / Max 360 Min 0	Moy / Max 244 Min 39	Moy / Max 93 Min 44	Moy 430 Max 1 763 Min 56
Cham- pignons (UFC.m ⁻³ d'air)	Moy 9 Max 61 Min 0	/	Moy 11 Max 30 Min 0	Moy / Max 110 Min 0	Moy / Max 37 Min <1	Moy / Max 107 Min 17	Moy 43 Max 450 Min 0
T (°C)	Moy 24,2 Max 27,3 Min 21	/	Moy 23,8 Max 25,6 Min 22,2	Moy 24,4	Moy 23 Max 26,1 Min 17,8	Moy / Max 25,3 Min 21,3	/
HR (%)	Moy 17 Max 38,1 Min 4,7	/	Moy 18 Max 19 Min 17	Moy 16,8	Moy 14,7 Max 27,8 Min 8,8	Moy / Max 42,6 Min 10	/

UFC : Unités Formant des Colonies

Les données majeures issues de ces études se recoupent généralement et peuvent être synthétisées en quelques grands points :

- Les concentrations en bactéries cultivables sont généralement supérieures aux concentrations en champignons cultivables. Les bactéries sont typiques de l'environnement et de la flore naturelle de l'Homme ; les champignons sont typiques de l'air extérieur et des espaces intérieurs (DECHOW et coll., 1997 ; DUMYAHN, 2000).

- La majorité des bactéries détectées sont non-pathogènes, les spores aérobies non-pathogènes sont très peu présentes et les microcoques et autres bactéries à Gram positif sont présents en très faibles concentrations. Il n'y a ni salmonelles, ni actinomycètes ni *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*) mais dans certains cas quelques *Staphylococcus epidermis* (*S. epidermis*) ont été détectés.

- Les concentrations en spores de champignons relevées sont faibles.

- La contamination de l'air ventilé est minime, généralement en raison de la haute efficacité de la filtration et de plus, en altitude, comme il a été précisé auparavant, la contamination de l'air neuf, qui est apporté, est quasiment inexistante (HUNT et SPACE,

1994 ; DECHOW et coll., 1997). Une concentration en germes moyenne de 76 UFC.m⁻³ est mesurée dans l'Airbus A310 et de 28 UFC.m⁻³ dans l'Airbus A340 (HUNT et SPACE, 1994 ; HUNT et coll., 1995 ; DECHOW et coll., 1997).

- Les plus fortes concentrations en microorganismes sont mesurées, quand les passagers sont en activité, quand il y a une forte densité de personnes, quand il y a de l'air recyclé ou quand le taux de changement d'air est faible. Les concentrations les plus élevées sont mesurées à proximité du sol (aéroport) aux moments de l'embarquement et du débarquement (DECHOW et coll., 1997 ; LEE et coll., 2000 ; DUMYAHN, 2000).

- Statistiquement, les concentrations en bactéries et le nombre de champignons cultivables ne sont pas différents entre les avions ou selon les lignes aériennes et entre les cabines d'avions et les autres types de transports en commun (train, bus, métro). Les niveaux de contamination microbienne sont même inférieurs à ceux observés dans des immeubles. Le niveau de contamination est plus élevé dans un aéroport que dans un avion en vol de croisière (ASHRAE 161-2000 ; NAGDA et coll., 2000).

Les concentrations en microorganismes doivent cependant être considérées avec précaution. D'une part, les méthodes d'analyse utilisées ne permettent pas l'isolement de tous les microorganismes et d'autre part, il n'existe aucune norme relative à l'échantillonnage de l'air en cabine d'avion.

En ce qui concerne les méthodes d'analyse, pour toutes ces études, les échantillonnages ont été réalisés avec des préleveurs impacteurs puis analysés par revivification des germes sur milieux de culture. Ceci ne permet pas toujours la détection des agents infectieux libérés par les passagers. En effet, les milieux de culture ne prennent pas en compte les besoins spécifiques liés à tous les types microbiens. De plus, l'impaction est connue pour générer des effets létaux sur une population microbienne. Et enfin, une fraction des microorganismes présents est viable mais non cultivable en raison des conditions hostiles régnant dans la cabine (faible humidité...) en plus des effets générés par l'impaction. De la même façon, les virus sont difficiles à étudier toujours pour des raisons techniques, car les conditions expérimentales permettant leur isolement et leur numération sont fastidieuses. La difficulté réside donc dans le fait de prélever et d'isoler les bactéries et les virus tout en préservant leur activité biologique pour pouvoir les cultiver et donc les identifier et les

numérer (LIPPMANN et coll., 2002). Par conséquent, les concentrations en microorganismes aéroportés sont sous-estimées car leur détection est uniquement basée sur la capacité des cellules à être cultivées.

En ce qui concernant l'échantillonnage, un guide regroupant quelques recommandations a été réalisé afin d'homogénéiser les prélèvements d'agents biologiques (HERNANDEZ et SWARTZ, 2000). Voici quelques-unes de ces recommandations :

- utiliser une grande variété de méthodes d'analyses (culture, méthode colorimétrique, microscopie directe, immuno-essai, Polymerase Chain Reaction (PCR)...),
- augmenter le volume prélevé afin de mieux évaluer les concentrations en bioaérosols,
- ne pas prendre en compte la présence des toxines jusqu'à ce que des techniques d'analyse adaptées soient mises au point et qu'il soit prouvé que la présence de ces toxines a un impact sur la santé,
- faire des analyses comparatives entre les avions les plus vieux et les plus récents,
- prendre en compte la recirculation de l'air, les systèmes de filtration d'air, l'apport d'air neuf, la durée du vol et le nombre de passagers.

Les premières conclusions rapportées sur la qualité de l'air en cabine mentionnent que l'existence d'une recirculation de l'air n'engendre pas d'effet néfaste sur qualité de l'air et que les particules biologiques sont principalement émises par les passagers. De plus, il n'existe apparemment pas de risques pour la santé liés aux bactéries et spores de champignons, le seul risque est la transmission de maladies de personne à personne.

Mais, bien que les conclusions de ces études ne soient pas alarmistes, il faut cependant rester critique, comme le précise HOCKING (2000) qui considère que certaines de ces conclusions sont à prendre avec beaucoup de précautions : il existe en effet un risque de contamination possible par le biais de micro-gouttelettes aéroportées (DECHOW et coll., 1997). De plus, même si la concentration en bioaérosol est inférieure à celle trouvée en espace

intérieur, le risque de contamination est augmenté puisque l'espace disponible par passager est également inférieur (WICK et IRVINE, 1995).

Les études citées précédemment font un point sur le niveau de contamination microbiologique de l'air en cabine et concluent sur les risques potentiels encourus pour la santé. D'autres études recensent des cas de transmissions de maladies par des bactéries infectieuses et également par les virus pour lesquels on estime qu'ils sont la cause de 50 à 60 % des maladies contractées à bord (NAGDA et coll., 1989) (Tableau 5).

Tableau 5 : Cas d'infections recensés en milieu aéronautique.

	Référence	Source	Caractéristique du vol	Nombre	Résultats commentaires
Grippe	MOSER et coll., 1979	1 personne	vol intérieur (Alaska) de 3 heures (dont 2 où la cabine n'a pas été ventilée)	Sur 54 personnes à bord, 72 % ont été malades.	La transmission a été favorisée par la faible ventilation, au sol et pendant le vol.
	KLONTZ et coll., 1989	11 personnes toussant activement	vol intérieur (Floride) de 2 heures et demi	30 % des passagers ont été malades.	La transmission s'est faite en vol et il y a des preuves de transmission secondaire.
Rougeole	AMLER et coll., 1982	3 enfants	vol international (Venezuela - USA)	/	La transmission à d'autres personnes a été suspectée avec une preuve de transmission secondaire. La transmission s'est faite soit dans l'avion soit dans l'aéroport avec une preuve de transmission secondaire.
	CDC, 1983	1 personne	vol intérieur (USA)	Un cas d'infection a été relevé.	La transmission s'est faite en vol avec une possibilité de transmission en aéroport.
	SLATER et coll., 1995	Non identifié	vol international (USA – Israël) de 10 heures et 2 heures en aéroport)	Sur 350 passagers 8 cas d'infections ont été relevés.	Il y a eu infection de 2 membres d'équipage confirmée, mais pas de preuve de transmission aux passagers.
Tuberculose	DRIVER et coll., 1994 CDC, 1995	1 personne	39 vols internationaux et 128 vols intérieurs d'une durée supérieure à 1 heure	274 personnes ont été en contact et 59 passagers ont subi le test de dépistage.	Il n'y a pas de preuve de transmission.
	McFARLAND, 1993	1 personne	vol international (Angleterre– USA) de 9 heures	Sur 325 passagers et 18 membres d'équipage 79 ont été dépistés.	Il n'y a pas de preuve de transmission.
	CDC, 1995	1 personne	vol international de 4 heures et demi (Mexique – USA)	Sur 92 passagers 22 ont été dépistés.	La transmission possible à 2 passagers a été conclue avec une probabilité faible.
	CDC, 1995 MILLER et coll., 1996	1 personne	vol international (Allemagne – USA) de 8 heures puis vol interne (USA) d'1 heure	Sur 219 occupants, 120 ont été dépistés.	La transmission à 5 passagers est possible avec une probabilité faible.
	MOORE et coll., 1996	1 personne	2 vols intérieurs d'un quart d'heure chacun	Sur 212 passagers et 15 membres d'équipage 100 ont été dépistés.	La transmission n'est pas à exclure avec une faible probabilité.
	CDC, 1995	1 personne	vol international (Taiwan – USA)	661 passagers dont 87 ont été dépistés.	La transmission à 5 passagers et 1 membre d'équipage n'est pas à exclure.
	CDC, 1995 KENYON et coll., 1996	1 personne	vol interne de 20 heures (USA)	Sur 1 042 passagers et membres d'équipage, 760 ont été dépistés.	La transmission probable à 3 passagers a été évaluée.
	WANG, 2000	1 personne	vol international (USA – Taiwan) de 14 heures	Sur 308 passagers et membres d'équipage, 225 ont subi le dépistage.	Il n'y a aucune preuve de transmission mais les passagers les plus proches ont été suivis.
Maladie méningoco-ccique	CDC, 2001	1 personne	vol international (Australie – USA)	Un à deux des passagers les plus proches ont été identifiés mais sont restés asymptomatiques.	
SRAS	PAQUET et coll., 2003	1 personne	vol Hong Kong – Pékin	21 personnes ont été contaminées.	

Même si les conclusions ne sont pas catégoriques sur les cas de transmission de maladies et, même si dans certaines conditions, des cas ont été recensés suite à des incidents techniques encourus en vol (comme par exemple un arrêt momentané de la ventilation), il n'en reste pas moins que ces cas montrent bien que le risque zéro n'existe pas et que les compagnies aériennes sont conscientes des risques.

V ELIMINATION DES CONTAMINANTS AEROPORTES / PROCEDES

Les deux grandes classes de contaminants, les particules (pollen, poussière, bactéries, virus, champignons...) et les gaz, sont éliminées selon deux grands procédés. Les particules sont éliminées par filtration et par dilution avec l'air extérieur et, les gaz par des méthodes chimiques destructives (convertisseur d'ozone, convertisseur catalytique des COV, filtres à base de charbon activé...(LEE et DAVIDSON, 1999)).

Le but principal du traitement des bioaérosols est d'obtenir une bonne évacuation ou un bon traitement afin d'éviter la contamination de l'équipage et des passagers par des personnes infectées et contagieuses ou par des allergènes (BAGSHAW et coll., 2002). Le principal moyen actuellement employé, pour éliminer les bioaérosols, est la filtration mécanique. Les filtres à air utilisés dans les systèmes de ventilation : les filtres HEPA « High Efficiency Particulate Air », récupèrent une grande partie des microorganismes et autres contaminants biologiques (SPACE, 1993 ; HUNT et SPACE, 1994 ; HUNT et coll., 1995 ; LIPPMANN et coll., 2002). Ils piègent des particules d'un diamètre supérieur à 0,3 µm avec une efficacité estimée à 99,97 % (THOMAS et coll., 2001). Théoriquement cela permet l'élimination des poussières, des particules de tabac, des bactéries individuelles et de quelques virus en général piégés sur des poussières (CARLILE, 1996 ; DECHOW et coll., 1997).

Cependant, même si les systèmes mis en place pour maintenir cette qualité semblent relativement efficaces, des difficultés persistent.

En effet, la transmission de maladies par des bioaérosols infectieux présents à bord a été rapportée (Tableau 5) car les virus qui ont une taille comprise entre 0,003 et 0,05 μm sont difficilement piégeables (DECHOW et coll., 1997) et les champignons et bactéries piégés dans ces filtres ne sont pas tués (ils sont en « phase de latence »). Lorsque l'humidité est suffisante, ces filtres peuvent être colonisés par les microorganismes (principalement des champignons) et servent alors de support de croissance.

D'autre part, les efficacités de filtration annoncées par les fabricants peuvent ne pas s'avérer toujours vraies. Des études d'efficacité contre les aérosols ont été effectuées sur sept types d'unités de filtration, dont certaines étaient équipées de filtres HEPA. La diminution des concentrations en aérosols variait en général de 30 à 90 %, contrairement aux 99,97 % annoncés (VIEILLEFOND, 1977). Il est montré dans cette étude qu'une filtration avec recirculation peut diminuer la concentration en bioaérosol mais ne permet pas d'atteindre des concentrations proches de zéro comme le précisent les spécifications des filtres HEPA. Une étude similaire a été faite par REISMAN et coll. (1990) et montre que dans une pièce équipée d'un purificateur d'air pourvu d'un filtre HEPA, la réduction du nombre de particules de diamètre supérieur à 0,3 μm n'atteint que 70 %.

Des nouveaux systèmes d'élimination des contaminants ont, pour ces raisons, été étudiés. Ainsi HALL et coll. (2000) proposent un prototype de purificateur d'air pour les cabines d'avion basé sur une technologie d'oxydation photocatalytique : l'excitation aux UV d'un semi-conducteur photoactif, le dioxyde de titane (TiO_2). Le procédé permet de tuer les bioaérosols et a également pour effet de transformer les COV dangereux en composés non-toxiques. Le principe d'action est le suivant : quand TiO_2 est photoactivé par les UV il catalyse la formation d'espèces réactives de l'oxygène (« Reactive Oxygen Species » ou ROS) à partir de vapeur d'eau. Ces composés extrêmement oxydants décomposent les molécules organiques et tuent les microorganismes. Pour le traitement des COV, ce procédé est compétitif par rapport au traitement sur charbon actif en termes de coût, de consommation d'énergie, de taille et de poids mais concernant l'élimination des microorganismes il est équivalent aux filtres HEPA. Cependant, un inconvénient non négligeable concerne la durée de vie qui est très inférieure à celle du couple charbon actif/ filtre HEPA.

Une société française, Airinspace, a conçu un procédé de décontamination de l'air pour le milieu hospitalier et prépare une nouvelle version de ce procédé pour le domaine aéronautique (SENDER, 2003). Ce procédé s'inspire d'une technologie russe utilisée dans les stations spatiales dans lesquelles des systèmes de décontamination de l'air tuent les germes grâce à une succession de chocs électriques.

Le but de ces travaux de thèse étant de proposer et d'étudier la faisabilité d'un nouveau procédé de décontamination de l'air à base de Fibre de Carbone Activé (FCA), dans le second chapitre, nous tenterons donc de comprendre la chimie et la réactivité de surface de ce média.

Chapitre 2 :

Les Fibres de Carbone Activé

Le charbon actif, en grains ou en poudre, est un matériau connu pour ses propriétés adsorbantes. Il est utilisé depuis longtemps dans l'industrie pour l'épuration de fluides ou dans l'industrie chimique pour ses capacités de catalyse (BRASQUET et LE CLOIREC, 1997 ; MATATOV-MEYTAL et SHEINTUCH, 2002).

Une forme nouvelle de charbon actif, dont le large spectre d'utilisation va de la fabrication de vêtements contre les vapeurs toxiques au traitement et l'épuration des fluides, a fait son apparition. Sa capacité à piéger les composés organiques semble prometteuse (LI et coll., 2002). Cette forme nouvelle consiste en une Fibre de Carbone Activé (FCA) d'origine naturelle ou synthétique ; et semble être une bonne alternative à l'utilisation des charbons actifs en grains.

Les FCA sont faciles à fabriquer et ceci dans des formes variées : brutes ou imprégnées d'agents chimiques tels que les métaux et oxydes métalliques (RYU et coll., 1999a et 1999b). De plus, étant compactes et malléables, elles peuvent s'intégrer dans des installations existantes tels que les systèmes de climatisation, les appareils d'air conditionné, les filtres à air d'habitacles automobiles, les filtres domestiques ou industriels.

Les FCA sont souvent préférées au charbon actif en grains car elles possèdent un certain nombre d'avantages : une grande surface spécifique (1 300 à 2 000 m².g⁻¹), une vitesse d'adsorption élevée, une structure microporeuse développée (de 0,5 à 2,5 cm³.g⁻¹), une réactivité de surface et une capacité de régénération *in situ* par chauffage avec un courant électrique (CHERET, 1996 ; PARK et coll., 1999 ; MANGUN et coll., 1999 ; POWELL et coll., 2000). Elles sont capables de piéger un large spectre de polluants allant des COV aux substances toxiques non biodégradables tels que les tensioactifs, les pesticides et les détergents (WANG et coll., 1998). Il a été montré que ces fibres avaient de meilleures capacités d'adsorption que le charbon actif en grains (WANG et coll., 1998 ; RYU et coll., 1999c ; RYU et coll., 2000).

I PREPARATION DE LA FIBRE DE CARBONE ACTIVE

Les FCA sont obtenues à partir de précurseurs naturels (coton) ou synthétiques (viscose, polyacrylamide, polyacrylamine, fibres phénoliques...) contenant une part importante de carbone dans leur composition élémentaire chimique (SUZUKI, 1994 ; CHERET, 1996 ; OSMOND, 2000). Elles sont obtenues par combustion partielle et décomposition thermique de substances carbonées (Figure 2). L'élaboration de la fibre de carbone activé se fait en deux étapes principales : la carbonisation et l'activation. A ces étapes, peut être ajoutée une étape d'imprégnation de la fibre par différents agents chimiques. L'imprégnation peut se faire avant l'étape d'activation et permet donc l'optimisation de cette dernière, ou après et entraîne le dépôt de composés chimiques en surface de la fibre tels que des métaux (OSMOND, 2000). Il peut également y avoir des étapes de pré-oxydation et d'oxydation supplémentaires visant à améliorer les propriétés catalytiques et d'adsorption.

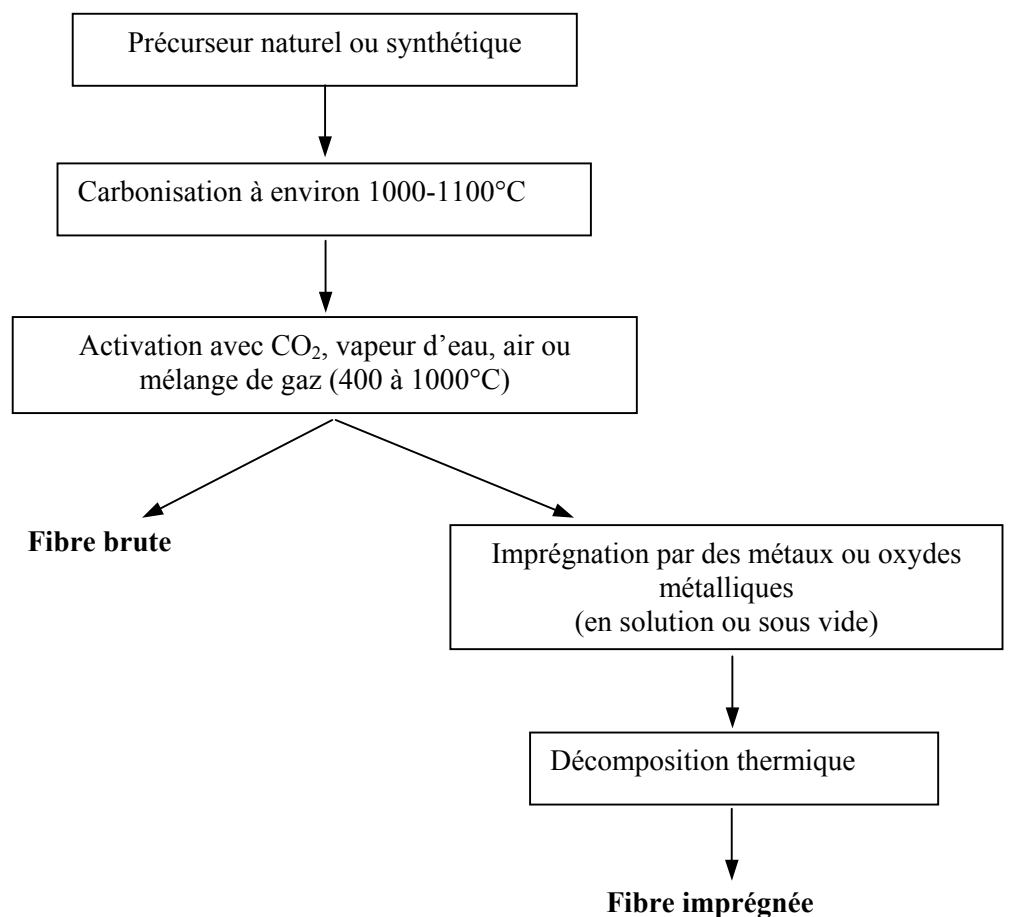


Figure 2 : Principe de fabrication d'une fibre de carbone activé.

I.1 Carbonisation

La carbonisation est un procédé thermique qui augmente la teneur en carbone du précurseur. Cette étape sert à éliminer, par pyrolyse (OSMOND, 2000), les espèces autres que le carbone, notamment l'hydrogène, l'oxygène, des traces de sulfure ou d'azote sous forme de produits volatils (WIGMANS, 1989 ; RODRIGUEZ-REINOSO, 1998). La carbonisation s'effectue sous un courant continu de gaz inerte à une température allant de la température ambiante à 1 100°C. Pour des températures supérieures à 1 300°C le produit obtenu est quasiment pur en carbone. La nature du précurseur, la température finale de carbonisation et la vitesse de chauffe influencent les propriétés du produit formé (CHERET, 1996 ; NIMALI, 1996). Ces conditions de carbonisation agissent non seulement sur la chimie de surface mais également sur son intégrité physique (OSMOND, 2000).

Au cours de la carbonisation, les atomes de carbone se réarrangent pour former une structure condensée. Dans cette structure, les atomes de carbone sont organisés sous forme de plans de cycles aromatiques. Le nuage d'électrons délocalisés sur ces cycles donne au charbon son excellente qualité d'adsorption. L'arrangement des plans de cycles aromatiques se fait de façon aléatoire ce qui entraîne la formation d'interstices entre les feuillets, également appelés pores (Figure 3).

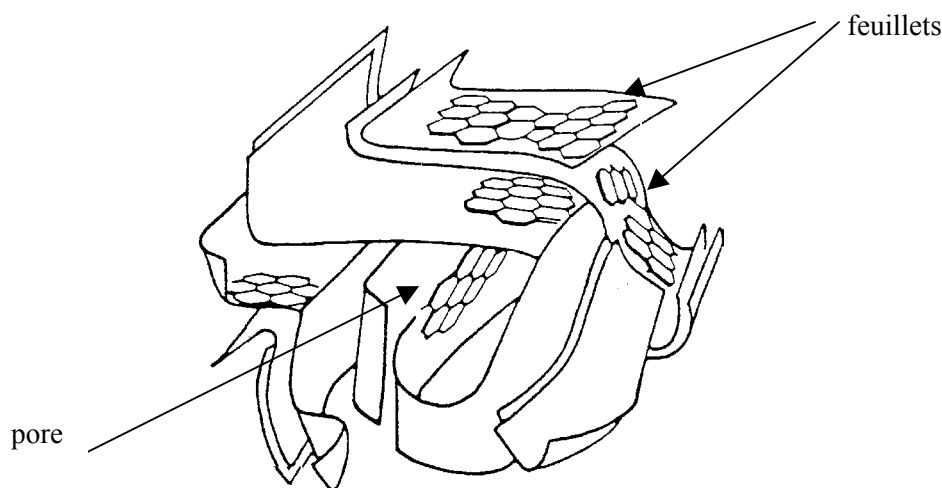


Figure 3 : Représentation schématique de la microstructure du charbon actif (BANSAL et coll., 1988).

Après cette étape, le matériau a une structure poreuse faible. Il ne peut pas être utilisé en tant qu'adsorbant dans cet état. Le volume poreux est accentué lors de l'activation (WIGMANS, 1989 ; CHERET, 1996 ; NIMALI, 1996).

I.2 Activation

La seconde étape est l'activation du produit. Ce traitement sert à améliorer la porosité du matériau en augmentant son volume poreux et en élargissant le diamètre des pores formés lors de la carbonisation, mais également en créant de nouveaux pores. Ces pores sont créés par élimination sélective d'atome de carbone ce qui permet ainsi d'accéder à la structure interne de la fibre (OSMOND, 2000 ; PARK et KIM, 2001). La structure et la distribution des pores sont déterminées par le précurseur lui-même et l'étape de carbonisation.

L'activation sert également à accroître le nombre de sites actifs nécessaires à l'adsorption (WIGMANS, 1989). Les atomes de carbone qui sont à la périphérie des cycles aromatiques possèdent des électrons non appariés. Ils sont donc très réactifs et, lors de l'activation, ont tendance à former des fonctions oxydées en surface (NIMALI, 1996). Pour simplifier les mécanismes, on peut résumer l'activation en deux étapes. Dans la première, la structure du squelette carboné est désorganisée, ce qui entraîne l'ouverture des pores et permet d'optimiser les capacités d'adsorption. Dans la seconde, l'activation est un peu plus poussée et permet l'oxydation des atomes de carbone des cycles aromatiques produisant des sites actifs et des pores de diamètres plus importants (NIMALI, 1996 ; OSMOND, 2000).

L'activation peut être influencée par la présence d'impuretés métalliques faisant partie de la composition élémentaire du précurseur, ceux-ci peuvent jouer le rôle de catalyseur et activer le processus ou au contraire inhiber la gazéification de la fibre.

L'étape d'activation apparaît donc comme primordiale pour optimiser les performances d'adsorption et de catalyse des FCA car ces propriétés sont conditionnées par la structure poreuse et la chimie de surface du matériau (RYU et coll., 2000 ; PARK et KIM, 2001).

Il existe deux types d'activation : l'activation dite physique et l'activation dite chimique :

- Activation physique : Elle peut s'effectuer, entre 650 et 900°C (OSMOND, 2000) ou entre 800 et 1000°C (PARK et KIM, 2001) selon les procédés de fabrication, sur un matériau déjà carbonisé, sous atmosphère inerte, par des agents oxydants tels que la vapeur d'eau, le dioxyde de carbone, l'air ou un mélange de gaz. L'agent activant oxyde les parties les plus réactives de carbone sous forme de CO ou de CO₂.

- Activation chimique : Contrairement au cas précédent, la carbonisation et l'activation peuvent se faire simultanément. Un traitement thermique entre 400 et 600°C (PARK et KIM, 2001), sous gaz inerte, du carbone imprégné d'un ou plusieurs composés chimiques est effectué. L'agent activant est ajouté au précurseur avant sa carbonisation, il est ensuite éliminé par lavage grâce à un solvant approprié.

Ces agents activants sont en général des acides de Lewis (chlorures de zinc, aluminium, fer...), des sels d'acides (acides phosphorique, borique...) ou des carbonates de métaux alcalins (WIGMANS, 1989 ; RYU et coll., 2000 ; PARK et KIM, 2001).

II PROPRIETES CHIMIQUES ET STRUCTURALES DES FCA

II.1 Structure poreuse

La structure poreuse est en général caractérisée par deux principaux paramètres : la porosité et la surface spécifique qui dépend directement du volume poreux. Que ce soit pour le charbon actif en grain ou en poudre, la structure poreuse est hétérogène, elle comprend des macro-, méso- et micropores. Pour les FCA, cette structure poreuse est beaucoup plus homogène ; on retrouve surtout des micropores disposés de façon uniforme (Figure 4) (LI et coll., 2002).

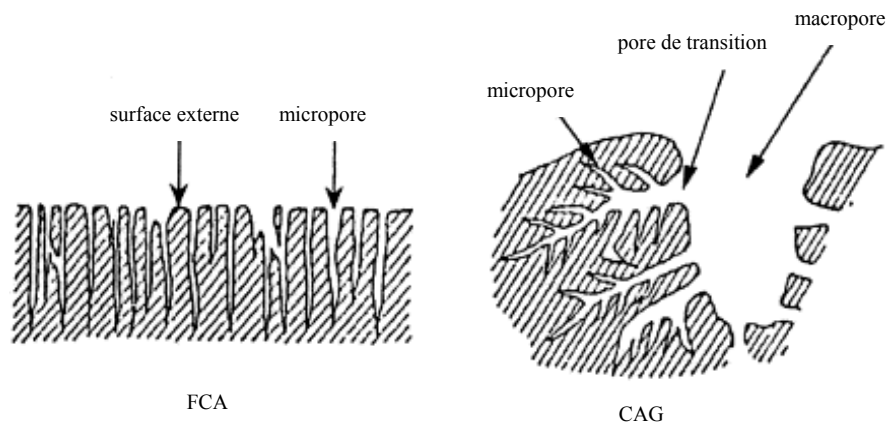


Figure 4 : Structure schématique des pores de Fibre de Carbone Activé (FCA) ou de Charbon Actif en Grains (CAG) (MATATOV-MEYTAL et SHEINTUCH, 2002).

Les pores peuvent être ouverts donc en contact direct avec l'extérieur, ou fermés. La taille et la distribution de ces pores affectent les propriétés d'adsorption du matériau (LI et coll., 2002). Les pores sont classés selon leur diamètre, en trois catégories (Tableau 6).

Tableau 6 : Distribution de la taille des pores selon DUBININ (1966).

Dénomination	Diamètre
Macropore	> 500 Å
Mésopore	20-500 Å
Micropore	< 20 Å

Au niveau de la FCA, qui comporte essentiellement des micropores, on peut distinguer trois sous-catégories de pores (CHERET, 1996 ; RYU et coll., 2000) (Tableau 7).

Tableau 7 : Distribution de la taille des micropores d'une FCA.

Dénomination	Diamètre
Micropore	14-20 Å
Supermicropore	7-14 Å
Ultramicropore	< 7 Å

La surface spécifique dépend directement de la porosité : plus la microporosité est grande et plus la surface spécifique est importante.

II.2 Caractéristiques chimiques de surface : groupements fonctionnels et sites actifs

II.2.1 Réactivité de surface

Bien que les propriétés précédemment citées (surface spécifique et porosité) jouent un rôle primordial dans les capacités d'adsorption et de catalyse de la fibre, ce sont les groupements fonctionnels présents à la surface de la fibre qui influencent majoritairement ces capacités. Une bonne connaissance de la chimie de surface du matériau et de ses sites actifs permet donc de mieux comprendre les réactions susceptibles de se produire en surface de la fibre.

L'importante réactivité de surface est liée aux atomes de carbone délocalisés qui ont des valences résiduelles et qui constituent par conséquent des sites très réactifs. Ces atomes de carbone montrent de grandes tendances de chimisorption vis à vis d'hétéroatomes tels que l'oxygène, l'hydrogène ou l'azote (NIMALI, 1996 ; PRADHAN et SANDLE, 1999 ; LI et coll., 2002). Des recherches ont été faites pour identifier la nature de ces sites actifs qui sont à l'origine du pouvoir catalytique et d'adsorption de la FCA.

Les groupements fonctionnels de surface les plus couramment identifiés sont des fonctions oxygénées. Les complexes fonctionnels oxygénés se forment lorsque la fibre est traitée par un agent oxydant. Il est maintenant admis que cette oxydation est réalisée lors de l'activation du matériau (NIMALI, 1996 ; PARK et KIM, 2001). Ces groupements sont de trois sortes : acides, basiques ou neutres. Les plus fréquemment identifiés sont les groupements acides (PRADHAN et SANDLE, 1999). Les groupes fonctionnels basiques de surface sont à ce jour moins connus (JULIEN, 1994).

La nature des groupements fonctionnels ainsi que les propriétés qui en découlent (acidité, basicité, polarité) sont dépendantes de la composition du précurseur et du processus de fabrication (carbonisation / activation). Ces groupements fonctionnels peuvent cependant être modifiés en post-production par l'utilisation de différents réactifs chimiques. A titre d'exemples, une nitrogénéation entraîne la formation de groupements basiques, une chloration

celle de groupements polaires et une oxydation permet la formation de groupes acides (POLANIA-L. et coll., 1993 ; JULIEN, 1994 ; LISOVSKII et coll., 1997 ; OSMOND, 2000).

Une étude faite par POLANIA-L et coll. (1993) montre qu'il est possible de modifier sensiblement la teneur en groupements oxygénés de surface des carbones activés. Cela peut se faire par un traitement thermique sous gaz N₂, un traitement acide, une estérification avec du méthanol ou une oxydation. Ces traitements entraînent l'augmentation ou la diminution du nombre des groupes acides ou basiques.

Les FCA subissent souvent une oxydation, électrochimique (oxydation anodique) ou chimique (H₂O₂, H₂SO₄...) qui a pour but d'augmenter le nombre de groupements oxygénés en surface, car il a été montré que ces groupements fonctionnels amélioreraient le taux d'adsorption de certains composés chimiques (LISOVSKII et coll., 1997 ; PARK et coll., 1999, RYU et coll., 2000, LI et coll., 2002 ; RONG et coll., 2002). Le type de traitement d'oxydation appliqué affecte la quantité relative d'oxydes de surface (OSMOND, 2000). L'oxydation améliore l'activité de surface en augmentant la surface spécifique par création d'ultramicropores et par création de groupes contenant de l'oxygène (YUE et coll., 1999). Après un tel traitement, il est possible de trouver jusqu'à 29 % d'oxygène parmi l'ensemble des groupements présents à la surface des pores du matériau (MANGUN et coll., 1999).

Une oxydation importante de la fibre permet également d'améliorer l'adsorption de polluants environnementaux spécifiques tels que l'acétone, l'ammoniac, le phénol...(MANGUN et coll., 1999). Grâce à cette oxydation poussée de la fibre, il est envisageable de régénérer *in situ* le matériau en appliquant un chauffage par une résistance électrique (MANGUN et coll., 1999). Ce traitement oxydatif fait varier le caractère acide ou basique des groupements de surface. Ces changements de groupements de surface entraînent des modifications des propriétés d'adsorption du carbone activé (LISOVSKII et coll., 1997).

II.2.2 Groupements de surface

Les charbons actifs prennent un caractère acide quand ils sont exposés à de l'oxygène ou à des oxydants tels que le peroxyde d'hydrogène, l'acide nitrique ou à des mélanges d'acides sulfuriques entre 200 et 700°C. Les processus d'oxydation augmentent la

concentration en surface de ces groupes chimiques (LISOVSKII et coll., 1997 ; LI et coll., 2002).

Les principaux groupements acides faisant partie de la composition de surface de la fibre de carbone activé sont les fonctions carbonyle, lactone, hydroxyle/phénol, quinone, carboxyle et ester (LEE et DAVIDSON, 1999 ; PITTMAN et coll., 1999 ; YUE et coll., 1999 ; PARK et coll., 1999 ; WAN et coll., 1998 ; LI Z. et coll., 1998 ; PRADHAN et SANDLE, 1999) (Annexe 3). Les trois groupes dominants sont les groupes acides carboxyliques, quinones et hydroxyles. La prédominance de ces trois fonctions peut être expliquée par les étapes d'oxydation successives. En effet la première réaction d'oxydation donne naissance à un groupement hydroxyle à partir d'un groupe -CH, celui-ci est ensuite oxydé en fonction carbonyle puis carboxyle (MANGUN et coll., 1999).

Des groupements basiques (Annexe 4) sont également présents en surface des FCA. Ils ont des structures de type pyrone ou chromène. Cette basicité est conférée par la présence de doublets. Cette propriété augmente avec un traitement thermique sous atmosphère inerte. Un traitement thermique permet l'élimination de l'oxygène or les groupements basiques se développent suite à cette disparition. Non seulement le matériau est plus basique mais il est aussi plus polaire. Par contre dès que le matériau est remis au contact de l'atmosphère donc de l'oxygène, la basicité diminue (LISOVSKII et coll., 1997 ; CARROTT et coll., 2001 ; LI et coll., 2002).

II.2.3 Formation des sites actifs à partir des groupements fonctionnels

Les sites actifs sont générés après décomposition des groupements fonctionnels de surface oxygénés durant un traitement thermique (Figure 5) (LISOVSKII et coll., 1997 ; LI et coll., 2001). Ce traitement thermique a de nombreux impacts sur les propriétés catalytiques et d'adsorption de la fibre. En effet, il affecte ces propriétés en modifiant la surface spécifique, et le nombre de sites actifs (SHIN et coll., 1997). Les premières fonctions de surface à être décomposées sont les groupements carboxyliques (SHIN et coll., 1997 ; LI et coll., 2001), puis ce sont les fonctions lactones et enfin les fonctions phénols, éthers et carbonyles (LI et

coll., 2001) ou les groupements cétones puis quinones à très hautes températures (SHIN et coll., 1997).

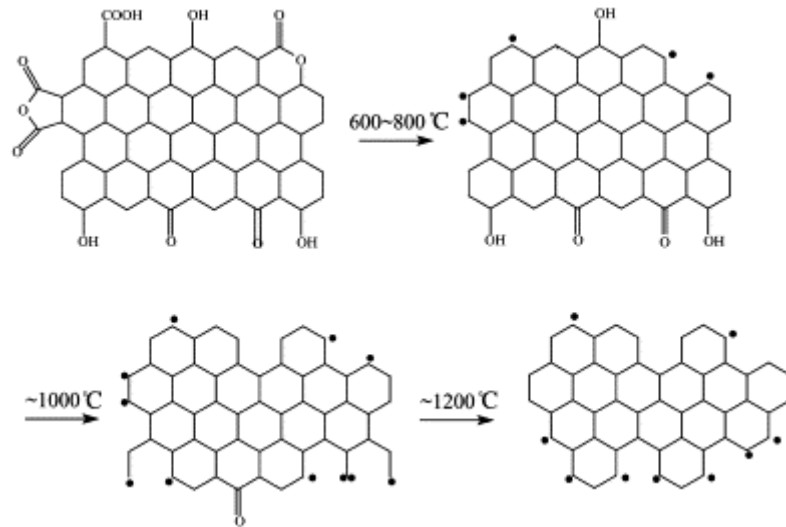


Figure 5 : Génération de sites actifs par décomposition des groupes fonctionnels oxygénés au cours d'un traitement thermique (LI et coll., 2001).

II.3 Réactivité et géométrie de surface

Des modèles ont été proposés pour expliquer les réactions *in situ* pouvant se produire à la surface de la fibre, ces modèles décrivent les plans aromatiques et les groupements qui leur sont associés, leur répartition possible ou les réactions se produisant entre eux.

PITTMAN et coll. (1999), ont proposé deux modèles représentant des cycles aromatiques et des groupements en surface qui leur sont liés, ceci dans le but de comprendre l'arrangement possible de ces sites actifs (Figure 6 et Figure 7).

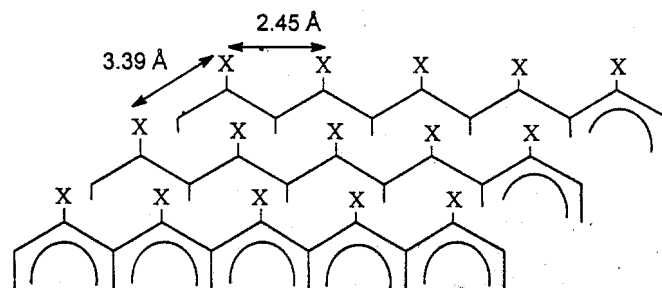


Figure 6 : Présence potentielle de 12 groupements C-X sur une surface de 100 \AA^2 (modèle de PITTMAN et coll., 1999). X représente les différentes fonctions oxygénées citées précédemment.

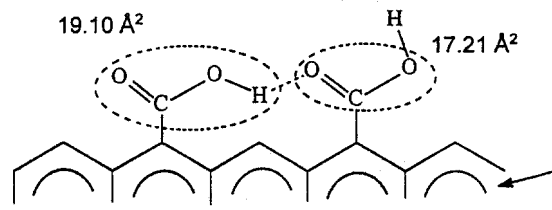


Figure 7 : Présence potentielle de 6 groupements carboxyliques au maximum par 100 \AA^2 de surface (modèle de PITTMAN et coll., 1999).

Un modèle proposé par PRADHAN et SANDLE (1999) montre la réactivité des différents oxydes de surface, et de part leur instabilité les changements qui peuvent se produire (Figure 8).



Figure 8 : Différents groupes oxygénés pouvant être générés à la surface du graphite.

L'implication de la géométrie de surface et son impact sur les phénomènes d'adsorption avec des médias plus ou moins oxydés ont été étudiés (JAGIELLO et coll., 1992). Il est ressorti de cette étude que les phénomènes d'interactions molécule-surface étaient dépendants de la géométrie de la molécule ainsi que de la densité moyenne de surface en groupes oxygénés de la FCA (POWELL et coll., 2000).

III PROPRIETES BACTERICIDES DES FIBRES DE CARBONE ACTIVE

III.1 Activité bactéricide observée

Lorsque les FCA sont utilisées pour le traitement des fluides (liquides ou gaz) ou dans le milieu médical pour le traitement des plaies (pansements), il a été remarqué que les

microorganismes étaient capables d'adhérer sur ces matériaux carbonés (TRIPATHI et coll., 1998 ; WAN et coll., 1999 ; OSMOND, 2000 ; POWELL et coll., 2000 ; YAMAMOTO et coll., 2001). Le mécanisme d'interaction entre la fibre et les bactéries reste encore inexpliqué. Selon GEORGES et DAVIES (1988), une adsorption de 4.10^{10} bactéries *Escherichia coli* (*E. coli*) par gramme de FCA est envisageable. Cette adsorption a également été démontrée avec une souche de *Saccharomyces cerevisiae* (*S. cerevisiae*) et quelques autres souches bactériennes : *Bacillus subtilis* (*B. subtilis*), *Pseudomonas aeruginosa* (*P. aeruginosa*), *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*) (GEORGE et DAVIES, 1988 ; OSMOND, 2000).

POWELL et coll. (2000) ont travaillé sur l'adsorption de virus (bactériophage MS2) sur deux types de charbons : un charbon actif en grain et une fibre de carbone activé. La FCA montre une capacité d'adsorption des virus supérieure à celle du CAG : un gramme de FCA est capable d'adsorber $1,4.10^8$ virus alors que le CAG est capable d'adsorber $3,4.10^7$ virus. Cette capacité supérieure d'adsorption de la fibre est certainement liée à la meilleure accessibilité des pores et sites actifs pour les virus, la fibre ayant une architecture plus ouverte que celle des grains et une plus grande surface spécifique.

En raison des performances accrues de la FCA par rapport au CAG et de l'intérêt qu'elle pouvait présenter dans les processus épuratoires, les développements ultérieurs ont consisté à trouver le moyen d'inhiber la prolifération des microorganismes sur les FCA afin d'éliminer tous les inconvénients que cela engendrait : risques de contamination due au développement des germes, mauvaises odeurs. Ainsi de nombreux chercheurs ont essayé de mettre au point des FCA possédant des propriétés bactéricides (OYA et coll., 1996 ; LI C.Y. et coll., 1998 ; WANG et coll., 1998 ; TRIPATHI et coll., 1998 ; WAN et coll., 2001 ; PIMENOV et coll., 2001 ; TAMAI et coll., 2001 ; PARK et JANG, 2003).

Les FCA peuvent être imprégnées de métaux comme le cobalt et l'argent (OYA et coll., 1996) mais plus généralement ce sont des médias imprégnés d'argent en quantité plus ou moins importante (allant de 0,0065 à 45 % wt) qui ont été développés ; ce métal ayant été choisi en raison de son fort pouvoir bactéricide. L'imprégnation peut se faire de façon chimique, en immergeant le tissu dans une solution contenant de l'argent, le plus souvent du nitrate d'argent (OYA et coll. 1993b ; OYA et coll., 1993c ; OYA et coll., 1994 ; WANG et coll., 1998 ; LI C.Y. et coll., 1998 ; PARK et JANG, 2003) ou avec un autre composé à base

d'argent comme l'acétate d'argent (OYA et coll., 1993a). L'imprégnation peut également se faire sous vide avec les mêmes solutions (WAN et coll., 1999 et 2001).

Les tests d'activité antimicrobienne effectués avec ces produits sont de deux types ; sur milieu solide (inhibition ou non de la croissance des microorganismes par la présence du métal imprégné) et en milieu liquide (survie ou non des microorganismes dans une suspension contenant le média). Globalement, les médias imprégnés montrent de fortes propriétés bactéricides contre les souches testées (*B. subtilis*, *S. aureus*, *E. coli*) mais aucune étude ne propose d'explications quant aux mécanismes du processus de bactéricidie.

Toutes sortes d'imprégnations ou de greffages avec des agents germicides ont été réalisés afin d'améliorer les propriétés antimicrobiennes des FCA.

Une FCA imprégnée d'organométalliques a été proposée par TAMAI et coll. (2001) qui ont réalisé une imprégnation avec des composés organométalliques qui, après décomposition, devenaient des oxydes métalliques (CaO, MgO, NiO, CoO ou ZnO). Les essais d'activité bactéricide ont été réalisés sur trois souches bactériennes : *B. subtilis*, *E. coli* et *S. aureus*, et l'efficacité bactéricide a été déterminée par mesure de l'inhibition de la croissance bactérienne, en milieux liquide et solide. Il a été conclu que l'activité bactéricide dépendait du type d'oxyde métallique. CaO, MgO, CoO et ZnO semblaient conférer au média les propriétés bactéricides les plus prometteuses.

Enfin, PIMENOV et coll. (1998) ont déposé un brevet sur une FCA modifiée présentant de fortes propriétés bactéricides. Cette FCA est greffée de composés organiques, fixés par adsorption physique sur le média. Les propriétés décontaminantes sont alors apportées par des composés azotés (azotes secondaires, tertiaires ou quaternaires) ou par des composés aromatiques (vert brillant ou ribanol) pouvant s'adsorber à la matrice carbonée ou par des halogénés organiques (chlore ou brome). Ils ont également travaillé sur l'adsorption et la désactivation de microorganismes par une nouvelle FCA, Aqualen®, imprégnée d'un principe actif de composition non divulguée (PIMENOV et coll., 2001). Cette FCA montre également un fort pouvoir de décontamination sur une souche bactérienne telle que *E. coli*.

III.2 Mécanismes de bactéricidie

Initialement, lors de la mise au point des FCA à propriétés germicides, l'argent avait pour principale fonction d'empêcher le développement et donc indirectement l'adhésion prolongée des microorganismes sur le matériau (OYA et coll., 1993a ; LI C.Y. et coll., 1998). Les chercheurs ont par la suite mis en évidence des propriétés bactéricides des FCA qui impliquaient des espèces chimiques autres que l'argent. Ainsi des travaux ont été effectués afin de comprendre les mécanismes impliqués.

Même si les études réalisées sur les FCA bactéricides n'abordent pas ou peu l'explication des mécanismes mis en jeu, il existe cependant des hypothèses explicatives. En effet, il existe des matériaux aux propriétés similaires, tels que des zéolites ou des céramiques, imprégnés de métaux lourds montrant les mêmes propriétés bactéricides (SAWAI et coll., 1996 ; YAMAMOTO et coll., 1999). Dans ces cas, les hypothèses énoncées concernent l'action du métal imprégné, soit par son activité bactéricide propre, soit par sa contribution dans la génération d'espèces actives de l'oxygène fortement bactéricides, et/ou une action directe du support (phénomène d'adsorption).

FURR et coll. (1994) ont tenté, avec des FCA imprégnées d'argent existant sur le marché, de comprendre les mécanismes mis en jeu et surtout d'évaluer l'implication de l'argent imprégné. Ils ont travaillé avec différents Tissus de Carbone Activé (TCA) : Actisorb Plus® (tissu imprégné d'argent), Actisorb® (le même tissu non imprégné) et avec une solution de nitrate d'argent. Concernant l'activité bactéricide de ces TCA, deux hypothèses sont émises : les bactéries sont adsorbées sur le tissu et subissent par contact l'activité bactéricide de l'argent et/ou l'argent imprégné est relargué en solution et agit « *in vitro* » sur les microorganismes en suspension. Les tests ont été menés sur *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Enterococcus faecium* et *Enterococcus faecalis*. Les chercheurs n'ont pas pu conclure quant à une action unique des ions argent. Il semblerait toutefois que les microorganismes qui ont adhéré sur le TCA sont inactivés par l'action de l'argent. Cette étude émet cependant l'hypothèse la plus plausible quant aux mécanismes mis en jeu : l'argent est le principal acteur dans le mécanisme de bactéricidie.

L'argent en plus de ses propriétés antimicrobiennes est également connu pour ses propriétés de catalyseur d'oxydation comme de nombreux autres métaux (STOHS et BAGCHI, 1995 ; SAWAI et coll., 1996 ; DAVIES et ETRIS, 1997 ; SAWAI et coll., 1998). Cependant parmi tous les métaux de transition, l'argent est unique dans son comportement avec l'oxygène. En effet, l'unique chimisorption de l'oxygène atomique en surface de l'argent, que ce soit en milieu gazeux ou aqueux, combinée au mouvement libre de l'oxygène sur cette matrice argent permet d'avoir un métal d'une grande activité catalytique (DAVIES et ETRIS, 1997). De nombreuses études ont été faites sur ces phénomènes de catalyse qui ont pour finalité la formation d'espèces réactives de l'oxygène à partir du dioxygène.

Des travaux portant sur un matériau carbone contenant de l'oxyde de zinc ont été menés par YAMAMOTO et coll. (1999 et 2001). Ces auteurs essaient de donner une explication concernant le mécanisme bactéricide de la poudre d'oxyde de zinc. L'activité antibactérienne provenait principalement de la génération de peroxyde d'hydrogène à partir de la surface du matériau (SAWAI et coll., 1998 ; YAMAMOTO et coll., 2001). Cette observation était attendue car le mécanisme présumé d'action de l'oxyde de zinc est la synthèse d'espèces réactives de l'oxygène. Les résultats indiquent qu'à l'action du peroxyde d'hydrogène s'ajoutent l'action des cations Zn^{2+} libérés du matériau et les modifications de pH résultantes. Ils avaient remarqué que l'activité bactéricide augmentait avec la quantité d'oxyde de zinc.

INOUE et coll. (2002) ont travaillé sur les propriétés bactéricides d'une zéolite ($900 \text{ m}^2 \cdot \text{g}^{-1}$) imprégnée d'argent. Ils ont voulu montrer l'influence de la présence d'oxygène sur l'activité bactéricide de la zéolite imprégnée. Ils ont ainsi tenté de clarifier les mécanismes impliqués dans l'induction de l'activité bactéricide puisque des études précédentes suggéraient que l'activité antibactérienne était simplement la conséquence de l'élution d'ions Ag^+ du matériau dans le milieu contenant les microorganismes. Des analyses ont été réalisées avec le matériau dans des conditions aérées et non aérées. Les résultats indiquent que la présence d'oxygène dissous était essentielle pour induire l'effet décontaminant puisque cette activité bactéricide n'était observée qu'en condition aérobie. De plus, la présence d'espèces

réactives de l'oxygène semblait être primordiale puisque des expérimentations réalisées en aérobie avec des inhibiteurs de ces espèces (catalase, benzoate de sodium, azide de sodium) montraient une disparition de l'effet bactéricide initialement observé.

D'autres auteurs avaient préalablement montré l'intervention d'espèces réactives de l'oxygène dans le mécanisme de bactéricidie de poudres céramiques d'oxydes métalliques (ZnO, CaO, MgO...) (SAWAI et coll., 1996 et 1998). Pour mettre en évidence la présence d'espèces réactives de l'oxygène (plus particulièrement H_2O_2 et $\text{O}_2^{\circ-}$), des expérimentations avec une sonde à oxygène et deux enzymes ont été mises en oeuvre. La première enzyme utilisée est la superoxyde dismutase (SOD) qui catalyse la formation de H_2O_2 et O_2 à partir de deux molécules d' $\text{O}_2^{\circ-}$, et la seconde enzyme est la catalase, qui catalyse la décomposition de H_2O_2 en H_2O et O_2 . H_2O_2 et $\text{O}_2^{\circ-}$ ne sont pas détectables directement avec une sonde à oxygène mais après ajout des deux enzymes, ces espèces sont transformées en oxygène moléculaire qui lui est détectable. Ils ont ainsi pu mettre en évidence, de façon indirecte, la génération d'espèces réactives de l'oxygène à partir des poudres céramiques chargées en oxydes métalliques et proposer une explication quant à l'activité bactéricide de ces poudres.

Chapitre 3 :

Les métaux et les espèces réactives de l'oxygène

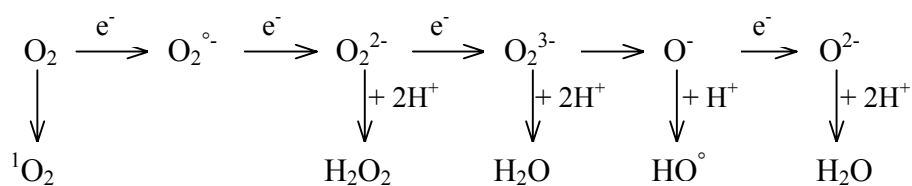
I GENERALITES SUR LES ESPECES REACTIVES DE L'OXYGENE

Les espèces réactives de l'oxygène (ou ROS) sont formées à la suite d'une réaction impliquant le dioxygène : O_2 . Cette molécule est unique parmi les molécules diatomiques, c'est un biradical dont les deux atomes d'oxygène sont réunis par une liaison simple, et qui comporte deux électrons célibataires de spins parallèles. En raison de la direction parallèle des spins de ces électrons, la réactivité de l'oxygène moléculaire est très faible mais lorsque cette molécule acquiert assez d'énergie, elle peut facilement accepter un électron supplémentaire par appariement à l'un de ses électrons célibataires (MARTINEZ-CAYUELA, 1995). Il s'en suit une série de réactions entraînant la formation de radicaux libres, comme l'anion radicalaire superoxyde ($O_2^{\circ-}$) ou le radical hydroxyle (OH°); ou des composés non radicalaires (espèces actives) comme l'ion peroxyde (O_2^{2-}), le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) et l'oxygène singulet (1O_2) (Tableau 8) (FONTAINE, 2001). Les ROS regroupent l'ensemble des dérivés radicalaires et non radicalaires. Ce sont des espèces très réactives c'est-à-dire ayant des durées de demi-vie très courtes, qui pourront oxyder des macromolécules telles que l'Acide DésoxyriboNucléique (ADN), les lipides et les protéines (SAWAI et coll., 1996 ; BAROUKI et MOREL, 2001).

Tableau 8 : Quelques espèces réactives de l'oxygène.

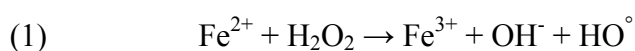
	Espèces réactives	Symbole chimique	Commentaires
Radicaux libres	anion superoxyde	$O_2^{\circ-}$	Espèce réactive très instable en milieu aqueux qui peut réagir spontanément avec lui-même pour former H_2O_2 .
	radical hydroxyle	HO°	Il est très réactif mais a une durée de vie très courte de l'ordre de la fraction de microseconde.
	radical oxyde nitrique	NO°	Il est formé avec l'arginine (basique et chargé). Il est présent naturellement dans le cerveau, dans les cellules immunitaires et également dans l'atmosphère en tant que polluant produit par les gaz d'échappement des voitures.
	peroxynitrite	$ONOO^-$	Il est le résultat de la combinaison de NO° et $O_2^{\circ-}$. Il est très réactif et peut réagir avec divers substrats (protéines, lipides membranaires) par des réactions d'oxydation et de nitration.
	radical peroxyde	ROO°	Il est formé par l'addition d'oxygène moléculaire sur les radicaux libres de carbone. Il est peu réactif et est capable de diffuser à travers les membranes biologiques.
Espèces actives	oxygène singulet	1O_2	Il est très réactif. Il réagit avec les doubles liaisons des lipides insaturés, les doubles liaisons conjuguées, les protéines et les aminoacides, les bases puriques et pyrimidiques... La cible préférée étant semble-t-il les membranes lipidiques qui deviennent perméables. Sa durée de demi-vie est variable selon les conditions environnementales (100 ns dans la membrane lipidique, 250 ns dans le milieu cellulaire, 4 μ s dans l'eau à température ambiante et 40-65 min dans le vide).
	peroxyde d'hydrogène (eau oxygénée)	H_2O_2	Il a un très fort pouvoir oxydant. Il est capable de traverser la membrane cellulaire et permet la formation de HO° .

La réduction séquentielle complète de l'oxygène moléculaire conduit à la formation d'eau par une succession de réactions (MARTINEZ-CAYUELA, 1995) :



H₂O est par excellence une molécule inoffensive. Il n'en est pas de même pour les ROS formées de façon intermédiaire.

La présence de traces de métaux de transition favorise la formation des ROS. La réaction la plus connue étant la réaction de Fenton qui fait intervenir les ions Fe²⁺ (1) (AUST et coll., 1986 ; AUST, 1989 ; FONTAINE, 2001). Il y a également la réaction d'Haber-Weiss catalysé par les métaux de transition et qui est la principale source de HO[°] (2) (MARTINEZ-CAYUELA, 1995).



Il existe en plus de toutes ces espèces, toute une famille de molécules dérivées qui résultent de réactions avec d'autres molécules telles que le dichlore ou le diazote. La production et la toxicité des espèces actives de l'oxygène peuvent être exacerbées par de nombreux facteurs de l'environnement. Les dérivés oxygénés peuvent être présents naturellement dans l'environnement après action de la lumière, des radiations UV, de la pollution ou d'un excès anormal de dioxygène (BAROUKI et MOREL, 2001 ; FONTAINE, 2001).

II OXYGENE ET CELLULE

II.1 Métabolisme de l'oxygène dans la cellule

Au cours de la respiration cellulaire, la cellule génère de l'Adénosine TriPhosphates (ATP) à travers la réduction de l'oxygène par une série d'addition d'électrons et de protons. Au cours du transport électronique, il y a production de O₂^{°-} et de H₂O₂. Les ROS continuellement produits lors de la respiration cellulaire correspondent normalement à moins de 5 % de l'oxygène rentrant dans la chaîne respiratoire (BAROUKI et MOREL, 2001 ; FONTAINE, 2001).

La réduction de l'O₂ se fait par la cytochrome C oxydase et demande 4 électrons qui sont ajoutés en 4 étapes individuelles. Tour à tour O₂^{•-}, H₂O₂, OH[•] et finalement H₂O sont obtenus. Cette enzyme laisse échapper de petites proportions de chaque intermédiaire. Les organismes doivent faire face à ces fuites et se prémunir contre l'action délétère de ces ROS. C'est pour cela que les cellules possèdent des antioxydants de nature protéique, des enzymes qui catalysent leur destruction et des molécules qui jouent un rôle « tampon » vis-à-vis des ROS grâce à leur capacité à s'oxyder (AMANATIDOU et coll., 2001 ; BAROUKI et MOREL, 2001). Ces « agents » servent à la prévention continue, à la détoxification active suite à un stress oxydant et enfin à la détoxification passive. Toutes les cellules aérobies possèdent les enzymes suivantes récapitulées dans le Tableau 9.

Tableau 9 : Récapitulatif des enzymes de détoxification et des réactions catalysées.

Enzymes	Réactions catalysées
superoxyde dismutase (SOD)	$O_2^{\bullet-} + O_2^{\bullet-} + 2H^+ \rightarrow H_2O_2 + O_2$
catalase	$H_2O_2 \rightarrow H_2O + \frac{1}{2} O_2$
peroxydase	$H_2O_2 + NADH, H^+ \rightarrow 2H_2O + NAD^+$
glutathion-peroxydase (GPx)	$2 G-SH + H_2O_2 \rightarrow G-S-S-G + 2H_2O$
glutathion-réductase	$G-S-S-G + NADH, H^+ \rightarrow 2G-SH + NADP^+$

Les organismes anaérobies sont dépourvus de ces enzymes, ce qui explique en grande partie leur sensibilité à l'oxygène (PELMONT, 1993 ; GRIMAUD et coll., 2001).

II.2 Stress oxydatif et systèmes de défense

II.2.1 Le stress oxydatif

Les ROS sont impliquées dans de nombreux processus biologiques, naturels (à des fins d'envoi de signaux, d'intervention au niveau de la croissance cellulaire ou lors de l'apoptose ou du vieillissement) ou pathologiques (inflammation, cancer) (FARR et KOGOMA, 1991 ; FONTAINE, 2001 ; BAROUKI et MOREL, 2001). Normalement, il existe un équilibre entre la production de ROS et la capacité antioxydante des cellules. Le système oxydant et anti-oxydant est un système complexe qui fait intervenir un équilibre entre la production et l'élimination des ROS. Si l'équilibre est rompu par un excès de ROS ou une

défaillance des systèmes antioxydants, la cellule est confrontée à un stress oxydant (autrement appelé stress oxydatif) (DEMBLE et AMABILE-CUEVAS, 1991 ; FONTAINE, 2001 ; LEAN et BURNS, 2001). Malgré la durée de vie courte des ROS, elles peuvent réagir avec des composés non-radicalaires et il se forme alors de nouvelles ROS qui à leur tour réagissent. Ainsi, se met en place une longue chaîne de propagation des ROS (MARTINEZ-CAYUELA, 1995).

La réponse au stress oxydatif, système de défense cellulaire, répond non seulement aux concentrations intracellulaires en ROS mais aussi aux concentrations extracellulaires (BAKER et coll., 1997). En excès, les ROS provoquent des lésions sur toutes les macromolécules. Ce stress oxydatif entraîne trois principaux dommages : l'oxydation de protéines, de l'ADN ou des lipides (TOUATI et coll., 1995 ; GRIMAUD et coll., 2001 ; CAVALCANTE et coll., 2002).

- Les protéines

Les protéines sont endommagées par les ROS mais les plus sensibles aux ROS sont celles qui ont des groupements sulfhydryles (-SH). L'oxydation des acides aminés possédant des groupes -SH entraîne une modification structurale des protéines et donc par conséquent une altération de leurs fonctions.

Les deux principaux marqueurs de l'effet des ROS sont la formation de fonctions carbonyles (attaque des résidus d'acides aminés et surtout l'histidine, l'arginine, la proline et la lysine) et la formation de groupes nitrotyrosines (due à la formation du peroxy-nitrite suite à la réaction de l'oxyde nitrique avec un superoxyde).

- Les acides nucléiques

Les ROS peuvent aussi avoir des effets délétères sur les acides nucléiques et plus particulièrement sur les bases azotées ; les bases les plus sensibles étant la thymine et la cytosine (MARTINEZ-CAYUELA, 1995). L'oxydation de l'ADN entraîne la cassure des brins d'ADN et des modifications de bases. Chacune de ces réactions est potentiellement mutagène et peut bloquer la réplication de l'ADN.

- Les lipides

Enfin, les ROS peuvent également provoquer des dommages à la membrane en oxydant les molécules de cholestérol ou les acides gras insaturés causant ainsi une peroxydation de la membrane lipidique ; ce qui entraîne une désorganisation de la membrane et par voie de conséquence une altération de sa fluidité et de sa capacité à assurer correctement ses fonctions (MARTINEZ-CAYUELA, 1995). La peroxydation des lipides se fait suite à la formation d'un radical carboné qui réagit avec de l'oxygène moléculaire pour former un radical peroxyde. Ce dernier peut enlever un atome d'hydrogène à une autre molécule de lipide permettant ainsi la propagation de la peroxydation de la chaîne lipidique (DEMBLE et AMABILE-CUEVAS, 1991 ; MARTINEZ-CAYUELA, 1995 ; LEAN et BURNS, 2001).

II.2.2 Le système de défense

Les systèmes de défense contre le stress oxydatif sont de deux types : des inhibiteurs chimiques (non-enzymatiques) et des systèmes enzymatiques. Les substances chimiques sont des substances liposolubles telles que la vitamine E ou le β -carotène et des substances hydrosolubles telles que la vitamine C ou le glutathion (G-SH). Ces molécules captent les radicaux et deviennent à leur tour radicalaire, elles sont alors soit dégradées soit régénérées. Par exemple, la vitamine E agit essentiellement au niveau membranaire au sein des lipoprotéines ; une fois qu'elle a capté un radical, elle est régénérée par la vitamine C ou le glutathion.

Le système de défense contre les ROS est divisé en deux groupes selon leur ordre et leur importance d'intervention. Il y a tout d'abord le système de défense primaire ou « défense préventive » qui sert à réduire les concentrations en ROS dans la cellule. Il est surtout dirigé par trois enzymes clés : la SOD, la Glutathion Peroxydase et la catalase (Tableau 9 et Figure 9). Il y a également la glutathion réductase, quelques autres protéines et des petites molécules non enzymatiques (glutathion, vitamine C, acide urique...) qui interviennent dans une moindre mesure.

Il y a ensuite le système de défense secondaire ou « chain breaking defense » qui a pour rôle d'empêcher la propagation des effets néfastes des ROS à des stades plus avancés. Il

est composé d'enzymes telles que les peroxydases qui réparent les peroxydations de lipides, des phospholipases, des oxydoréductases et des protéines de réparation de l'ADN (MARTINEZ-CAYUELA, 1995 ; DEMBLE, 1996).

De plus, le stress oxydatif induit des protéines, également induites par d'autres agents de stress, telles que les protéines du choc thermique ou les protéines de la réponse SOS (WALKUP et KOGOMA, 1989). Chez *E. coli*, par exemple, les protéines GroEL et GroES sont induites par un choc thermique, des dommages à l'ADN et le stress oxydatif.

Si les systèmes de défense sont débordés, il y a apparition de HO° , radical très toxique pour lequel il n'existe aucun système de détoxification efficace et qui provoque la mort cellulaire (FRIDOVICH, 1984 ; DEMBLE, 1996).

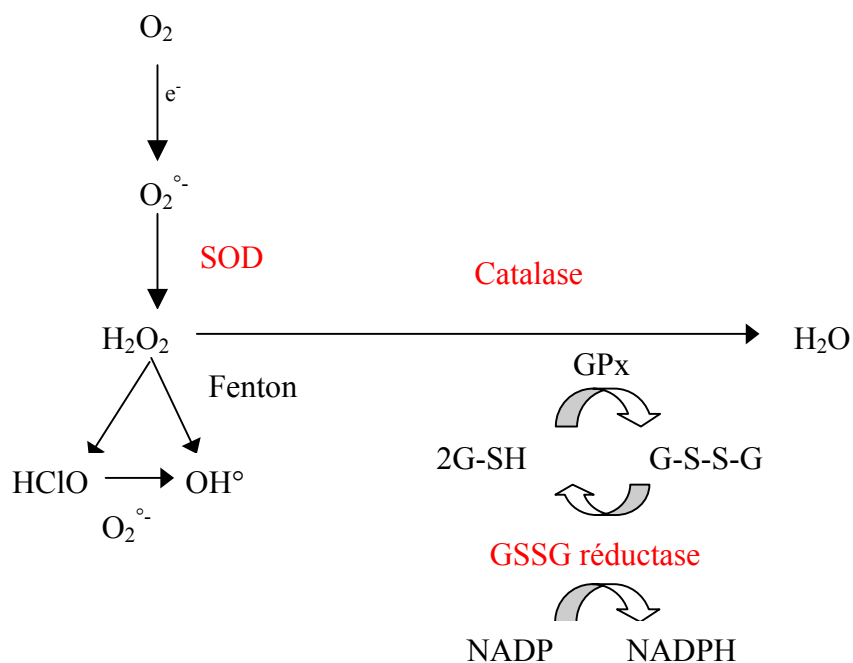


Figure 9 : Interrelations entre les principales réactions enzymatiques du système antioxydant.

Le stress oxydatif chez *E. coli* a été bien caractérisé et la réponse à ce stress se manifeste de deux façons selon l'espèce réactive de l'oxygène qui agit (peroxyde ou superoxyde). En effet, la réponse engendrée par les peroxydes et celle engendrée par les superoxydes n'activent pas les mêmes gènes. Deux régulons distincts ont été identifiés :

SoxRS et OxyR qui sont induits respectivement par : $O_2^{\circ-}$ et H_2O_2 (DEMBLE et AMABILE-CUEVAS, 1991 ; DEMBLE, 1996 ; THIBESSARD et coll., 2001 ; BAROUKI et MOREL, 2001 ; CAVALCANTE et coll., 2002).

- Réponse au stress provoqué par les superoxydes

Les superoxydes induisent la synthèse chez *E. coli* d'au moins une trentaine de protéines non induites par les peroxydes (enzymes de réparation de l'ADN, enzymes de défense primaire...) (DEMBLE et AMABILE-CUEVAS, 1991). Parmi celles-ci, douze sont placées sous la dépendance d'un régulon SoxRS comprenant deux composants commandés par deux gènes *soxR* et *soxS*. Les produits des gènes *soxR* et *soxS* sont nécessaires à l'activation de ce système de défense et font partie d'une famille d'activateurs de transcription qui stimulent les gènes de résistance au stress oxydatif et aux antibiotiques. La protéine SoxR est sensible aux superoxydes et, lorsqu'elle est activée, elle stimule la transcription d'une seconde protéine SoxS qui pourra ainsi stimuler les protéines de défense contre ces ROS.

Les SOD qui sont stimulées lors de la défense contre les superoxydes, l'une contenant du fer et l'autre du manganèse, sont produites à un niveau constitutif basique sans présence de peroxydes, mais la production de SOD à manganèse est augmentée par l'oxygénation du milieu (PELMONT, 1993).

- Réponse au stress provoqué par les peroxydes

Concernant le peroxyde, une exposition de la bactérie *E. coli* à une faible concentration (< 1mM) entraîne une accélération de la synthèse d'une trentaine de protéines, placées sous la dépendance du régulon commandé par le gène *oxyR*. Parmi les protéines ainsi induites figurent des protéines telles que les catalases, dont une est produite par le gène *katG*, la glutathion réductase et des protéines de la réponse SOS telles que DnaK et RecA (DEMBLE et AMABILE-CUEVAS, 1991 ; FARR et KOGOMA, 1991). La protéine OxyR sert de récepteur du stress provoqué par des peroxydes mais sert normalement d'activateur de transcription. En présence de peroxydes, OxyR est oxydée et c'est uniquement sous forme oxydée qu'elle agit en tant qu'activateur du régulon *oxyR* (FARR et KOGOMA, 1991).

Une cellule en phase stationnaire est moins sensible à ce stress qu'une cellule en phase exponentielle (BAKER et coll., 1997 ; THIBESSARD et coll., 2001).

III IMPLICATION DES METAUX DANS LA GENERATION DES ESPECES OXYGENEES ACTIVES

Une hypothèse de plus en plus grandissante indique que les métaux de transition (Fe, Cu, Zn, Cd, Pb, Ag...) jouent le rôle de catalyseur dans la détérioration oxydative des macromolécules biologiques et des tissus (FENG et coll., 2000). Des études récentes montrent leur capacité à catalyser la production de ROS entraînant la peroxydation des lipides, des dommages à l'ADN, la réduction des groupements sulfhydryles des protéines (STOHS et BAGCHI, 1995 ; SAWAI et coll., 1996 ; SAWAI et coll., 1998).

Des procédés de décontamination biologique sont d'ailleurs basés sur ce principe : la Société Katadyn (Suisse) commercialise depuis 50 ans un filtre en céramique contenant 0,28 % d'argent ; la Société Ionics commercialise un filtre à base de charbon actif sur lequel est imprégné 1 % d'argent. Les bactéries adsorbées sont détruites par l'action combinée de l'argent et des atomes d'oxygène adsorbés sur le métal. L'argent sert d'une part à empêcher le développement des microorganismes et d'autre part à catalyser leur oxydation destructive (DAVIES et ETRIS, 1997).

PAREDES OLIVERA et coll. (1994) ont travaillé sur ces interactions en étudiant la synthèse de H_2O_2 avec différents catalyseurs métalliques (Pd, Pt, Ag et Au). Ils ont déterminé théoriquement toute une série de réactions élémentaires amenant à la synthèse de H_2O_2 et H_2O à partir de $O_{2(gaz)}$ et $H_{2(gaz)}$. La synthèse débiterait par une adsorption de ces gaz en surface du métal, puis se produiraient des réactions de dissociation, de formation de radicaux, des réactions avec des groupements -OOH et -OH et enfin ces réactions élémentaires se termineraient par une désorption de H_2O_2 et H_2O . Expérimentalement, il a été montré que les intermédiaires -OOH et -OH sont très importants pour la formation du produit final. Selon les conditions expérimentales, les réactions favorisent soit la synthèse de H_2O_2 soit celle de H_2O . Dans le premier cas ce sont les radicaux -OOH qui sont importants et dans le second cas ce sont les radicaux -OH.

Dans ces systèmes de décontamination impliquant métaux et ROS, il y a d'une part la toxicité induite par les ROS et d'autre part celle engendrée par les métaux. Cette dernière implique, chez un organisme pluricellulaire, la neurotoxicité, l'hépatotoxicité et la

néphrotoxicité. La différence de toxicité entre les métaux de transition peut être expliquée par les différences de solubilité, de capacité d'absorbance, de transport à travers la membrane, de réactivité chimique et des complexes qu'ils forment dans un organisme (STOHS et BAGCHI, 1995).

Nous nous intéresserons plus particulièrement à l'argent (Ag), métal lourd très connu pour ses propriétés bactéricides (DAVIES et ETRIS, 1997 ; FENG et coll., 2000). Ravelin en 1869 fut le premier à rapporter l'effet antimicrobien de l'argent. Depuis il a été largement utilisé comme agent décontaminant (RUSSEL et HUGO, 1994). L'argent agit sur les protéines, avec les groupes thiols (sulfhydryles ou SH), avec les bases des acides nucléiques plutôt qu'avec les phosphates, et enfin provoque des changements de structure. En ce qui concerne ce dernier point, les changements de structure de la cellule entraînent une inhibition de la division cellulaire car l'argent endommage l'enveloppe de la cellule. Les cellules augmentent en taille et en contenu cytoplasmique (présence de granules dans la cellule contenant de l'argent) et le métal provoque des anomalies dans la membrane (THURMAN et GERBA, 1989 ; RUSSEL et HUGO, 1994 ; PEDAHZUR et coll., 1997 ; FENG et coll., 2000). L'argent provoque une condensation de l'ADN et sous forme condensée, l'ADN est dans l'incapacité de se répliquer (THURMAN et GERBA, 1989 ; FENG et coll., 2000).

Il a récemment été découvert que l'argent pourrait agir sur les microorganismes, de façon directe ou indirecte, par un seul ou plusieurs des mécanismes décrits ci-dessous :

- Destruction complète des microorganismes en milieu aqueux oxygéné par oxydation catalysée par Ag (STOHS et BAGCHI, 1995 ; DAVIES et ETRIS, 1997). Le couple Argent-Oxygène a un très fort pouvoir catalytique d'oxydation et permet la formation de ROS (STOHS et BAGCHI, 1995 ; PEDAHZUR et coll., 1995 et 1997 ; DAVIES et ETRIS, 1997 , FENG et coll., 2000).

- Rupture du transfert d'électrons chez la bactérie par Ag(I) qui a une grande affinité pour les groupes -S-H et forme -S-Ag qui inhibe le transfert d'hydrogène (DAVIES et ETRIS, 1997). Il semblerait que ces interactions entre Ag(I) et les groupes thiols jouent un rôle essentiel dans l'inactivation des bactéries. L'oxygène adsorbé en surface de l'argent, dans un milieu aqueux, réagit directement avec les groupes -S-H en surface des bactéries. Il se

forme des ponts R-S-S-R qui bloquent complètement la respiration et le transfert d'électrons (DAVIES et ETRIS, 1997 ; FENG et coll., 2000).

- Destruction des bactéries et virus par Ag(II) et Ag(III). Ag(III) agit de la même façon que Ag(I) et provoque une oxydation de l'organisme, il semblerait que Ag(III) ait des propriétés catalytiques plus importantes que Ag(I) (DAVIES et ETRIS, 1997).

PEDAHZUR et coll. (1995 et 1997) ont travaillé sur les potentialités de désinfection de l'eau potable par des ions argent et H₂O₂. Ces études ont été faites sur une souche d'*E. coli*. Ces deux agents présentent déjà de forts pouvoirs désinfectants pris séparément et dans des concentrations non nocives pour la santé. H₂O₂ est connu pour son action bactéricide et bactériostatique et est fréquemment utilisé dans les industries agroalimentaires ou pharmaceutiques. Le ministère de la santé français a autorisé l'utilisation de ce produit pour la désinfection de l'eau potable. Des pays comme la Suisse, l'Allemagne ou l'Australie ont autorisé l'utilisation d'une formulation commerciale contenant de l'argent et H₂O₂.

PEDAHZUR et coll. (1997) ont montré que l'action combinée de ces deux agents donnait des performances d'inactivation des bactéries encore plus grandes. Ils ont observé une action synergique de ces deux composés. Deux grandes hypothèses pouvant expliquer l'activité bactéricide de ce couple sont proposées : 1) un effet synergique où la présence des deux composés entraîne une plus grande activité bactéricide ou 2) un effet individuel cumulé où il y a une accumulation de dommages provoqués à la cellule, par l'un ou l'autre des composés ; l'un rendant la cellule plus susceptible à l'autre et *vice-versa*.

Les hypothèses de mécanismes proposées par ces auteurs sont les suivantes: 1) stabilisation de l'H₂O₂ par l'argent, ce qui retarde la dégradation de H₂O₂ en espèces non toxiques, 2) interférence de H₂O₂ dans l'efflux de Ag⁺ hors de la cellule (par exemple par les ATPase à cuivre), 3) interférence de Ag avec une enzyme telle que la SOD qui a pour rôle d'inhiber les ROS ou encore 4) interaction de H₂O₂ dans le processus cellulaire de détoxification dans lequel Ag⁺ est réduit en une forme moins toxique Ag⁰.

Partie 2 :

Matériels et Méthodes

I. MATERIEL

I.1 Microorganismes et conditions de culture

I.1.1 Souches de bactéries

Les souches bactériennes testées, *Escherichia coli* (*E. coli*), *Bacillus subtilis* (*B. subtilis*), *Klebsiella oxytoca* (*K. oxytoca*) et *Micrococcus luteus* (*M. luteus*) sont issues de la collection de souches de l'Ecole Nationale Supérieure d'Ingénieurs de Limoges (ENSIL) et ont été isolées à partir d'échantillons d'eaux potables ou usées.

La souche *E. coli* K12, provenant de la Collection de l'Institut Pasteur, CIP 54 117, a également été utilisée pour certaines expérimentations.

Ces bactéries sont cultivées dans de l'eau peptonée exempte d'indole (AES laboratoire, France) contenant 10 g.L⁻¹ de pastone et 5 g.L⁻¹ de chlorure de sodium.

Elles sont mises en culture à une concentration de 10⁶ cellules.mL⁻¹ à partir d'une pré-culture en début de phase stationnaire puis incubées à 37°C sous agitation (200 rpm) toute une nuit (environ 14 heures).

Lors des expérimentations, le nombre d'Unités Formant des Colonies (UFC) a été déterminé après culture sur un milieu nutritif PCA (Plate Count Agar) (Difco, USA) composé de 5 g.L⁻¹ de caséine de digestat de pancréas, 2,5 g.L⁻¹ d'extrait de levure, 1 g.L⁻¹ de dextrose et 15 g.L⁻¹ d'agar.

La souche *Legionella pneumophila* (*L. pneumophila*) est une souche de séro groupe 6 provenant de la collection du CHU de Limoges. *L. pneumophila* est cultivée sur un milieu solide spécifique pour les légionnelles : le milieu Buffered Charcoal Yeast Extract- α -ketoglutarate (BCYE) avec cystéine (Oxoid, USA). La composition de ce milieu est la suivante : 10-12 g.L⁻¹ d'extrait de levure, 1,5-2 g.L⁻¹ de charbon activé, 5-10 g.L⁻¹ de tampon ACES (2[(2amino-oxoéthyl)-amino]éthanesulfonique), 1 g.L⁻¹ d' α -cétoglutarate (sel de monopotassium), 40 mL d'hydroxyde de potassium à 1 mol.L⁻¹, 12-17 g.L⁻¹ d'agar et

950 mL d'eau distillée. Ce milieu est également supplémenté de 5 mL d'une solution de L-cystéine et de 5 mL d'une solution de pyrophosphate ferrique.

Les cultures de légionelles sont réalisées sur milieu gélosé solide BCYE puis incubées 3 à 10 jours à 37°C.

I.1.2 Souches de levures

Les deux souches de levures : *Pischia pastoris* (*P. pastoris*) et *Saccharomyces cerevisiae* (*S. cerevisiae*) proviennent de la collection de l'ENSIL.

Les levures sont cultivées, à 30°C sous agitation (200 rpm) dans 150 mL de milieu nutritif liquide Yeast Peptone Dextrose (YPD) composé de 20 g.L⁻¹ de glucose (Merck, Allemagne), 10 g.L⁻¹ d'extrait de levure (AES laboratoires, France) et 10 g.L⁻¹ de bacto-peptone (Biokar Diagnostics, France).

Le nombre de cellules aptes à former des colonies est déterminé sur un milieu solide YPD composé de 20 g.L⁻¹ de glucose (Merck, Allemagne), 10 g.L⁻¹ d'extrait de levure (AES laboratoires, France), 10 g.L⁻¹ de bacto-peptone (Biokar diagnostics, France) et 20 g.L⁻¹ de bacto-agar (Merck, Allemagne).

I.1.3 Souches de champignons

Les trois souches de champignons testées sont *Aspergillus versicolor* (*A. versicolor*) ATCC 11730, *Penicillium funiculosum* (*P. funiculosum*) ATCC 11797 et *Chaetomium globosum* (*C. globosum*) ATCC 6205.

Les souches de champignons sont cultivées à 30°C sous agitation (200 rpm) dans un milieu Sabouraud liquide (Merck, Allemagne) contenant 10 g.L⁻¹ de peptone et 40 g.L⁻¹ de glucose.

Afin de déterminer le nombre d'UFC, nous avons utilisé un milieu nutritif solide de dextrose de pomme de terre (Merck, Allemagne) contenant 4 g.L⁻¹ d'infusat de pomme de terre, 20 g.L⁻¹ de glucose et 15 g.L⁻¹ d'agar.

Toutes les souches de champignons sont cultivées 24 à 48 heures à 30°C.

Des précautions sont respectées lors des manipulations de tous les germes par l'emploi de masques et les expérimentations sont réalisées sous hotte à flux laminaire.

I.2 Typologie des FCA

Les différentes typologies des différentes FCA utilisées sont recensées dans le Tableau 10, les dénominations utilisées ont été choisies de façon arbitraire et ne correspondent pas à celles employées par les fabricants. Les FCA00 et FCA04 sont non imprégnées, les cinq autres FCA sont imprégnées chimiquement. FCA01 et FCA06 sont imprégnées avec une même quantité d'argent, FCA03 contient du cuivre, FCA02 est imprégnée des deux métaux cités précédemment et enfin FCA05 est imprégné d'un composé « biocide » dont la composition n'a pas été communiquée par le fabricant. FCA00 et FCA01 ne diffèrent que par l'imprégnation ou non à l'argent, la trame du tissu est la même. Enfin tous les médias se présentent sous forme de tissu sauf FCA06 qui est conditionnée sous forme de fibres individuelles d'une longueur moyenne de 10 mm.

Tableau 10 : Quelques caractéristiques des différentes FCA.

Dénomination	Composé imprégné	Surface spécifique (m ² .g ⁻¹)	Fournisseur
FCA00	non imprégné	1 200	CCI ¹
FCA01	argent (0,05 % wt)	1 200	CCI ¹
FCA02	argent (0,05 % wt) cuivre (12,5 % wt)	1 200	CCI ¹
FCA03	cuivre (12 % wt)	1 200	CCI ¹
FCA04	non imprégné	800	Messier-Bugatti ²
FCA05	biocide (inconnu)	1 200	CCI ¹
FCA06	argent (0,05 % wt)	980	Techsilab ³

¹ CCI : Charcoal Cloth International (Houghton-le-Spring, Royaume-Uni)

² Messier-Bugatti (Villeurbanne, France)

³ Techsilab (Limoges, France)

II. TESTS D'ACTIVITE ANTIMICROBIENNE

II.1 Activité antimicrobienne avec contact entre les cellules et le media

Les activités germicides des FCA ont été évaluées à partir d'un pilote expérimental conçu et développé dans notre laboratoire (Figure 10). Le pilote est composé d'un réacteur statique (R1), un réacteur dynamique (R2) et d'une pompe péristaltique (P1).

R2 contient la suspension de cellules et est continuellement sous agitation. Deux disques de FCA00, FCA01, FCA02, FCA03, FCA04 ou FCA05 (47 mm de diamètre et environ 0,65 mm d'épaisseur, ce qui représente un poids sec de 0,5 g pour les deux disques), 2,5 g de FCA06 sèche (sous la forme d'un cylindre de 47 mm de diamètre et 16 mm de hauteur) ou une membrane filtre en nitrate de cellulose (seuil de coupure de 0,2 μm), sont placés dans R1 entre deux grilles en acier inoxydable. Le débit du liquide (eau distillée stérile ou suspension cellulaire) est régulé de façon ascendante à 70 $\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$ à l'aide de P1. Considérant les dimensions des échantillons de FCA et le débit appliqué dans le circuit, le temps de contact entre le liquide et les médias FCA00 à FCA05 est d'environ 2 secondes. Ce temps est d'environ 24 secondes lorsque FCA06 est utilisé.

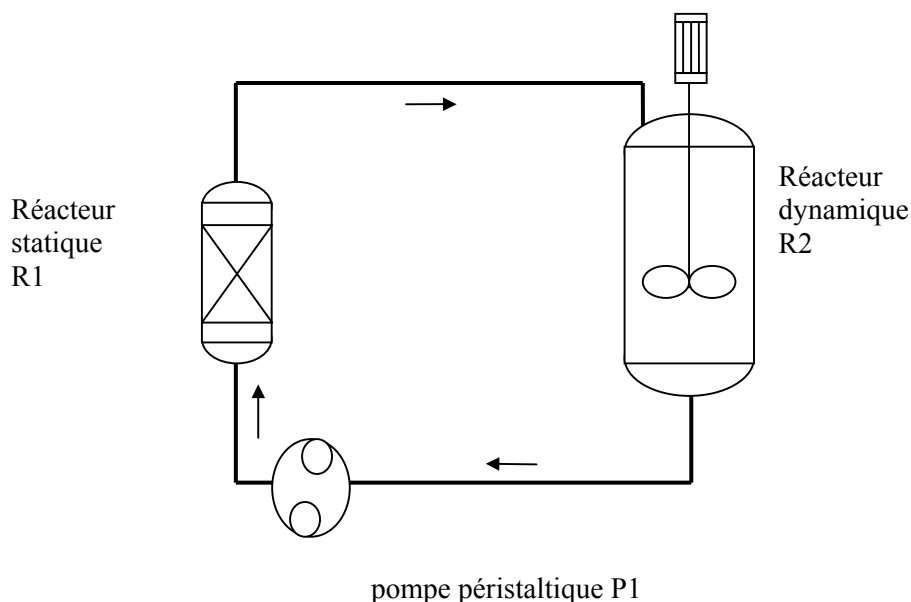


Figure 10 : Dispositif expérimental d'évaluation de l'activité antimicrobienne des FCA.

L'activité bactéricide de tous les médias (Tableau 10) a été testée sur *E. coli* et l'activité antimicrobienne de FCA01 a été testée sur toutes les souches de bactéries, levures et champignons citées partie 2, paragraphe I.1.1.

Les suspensions cellulaires sont réalisées dans de l'eau distillée stérile et ajustées à des concentrations initiales de 10^5 à 10^6 cellules.mL⁻¹ pour les bactéries, entre 10^3 et 10^5 pour les levures et environ 10^5 pour les souches de champignons. Au départ, 500 mL de ces suspensions sont insérées dans R2, puis passent dans R1 et avant d'être réinjectées dans R1. Le système fonctionne ainsi en boucle fermée pendant la durée totale de la manipulation. Des prélèvements de 2 mL sont effectués dans R2 après 0, 4, 8, 16, 32 et 64 minutes de circulation et la revivification des cellules est déterminé par dénombrement d'UFC sur milieux solides appropriés à chaque type microbien.

L'activité bactéricide de FCA01 a été évaluée dans plusieurs conditions :

- en condition aérée comme décrite ci-dessus,
- en condition d'anoxie, obtenue grâce à l'ajout d'un bullage continu d'azote dans la suspension de départ, ce qui implique que le réacteur R2 est fermé de façon hermétique,
- en condition aérée pendant quatre jours en continu en renouvelant la suspension bactérienne d'*E. coli* toutes les 24 heures. Des prélèvements de 2 mL ont été faits chaque jour dans R2 après des temps de circulation de 2, 4, 19 et 24 heures consécutivement au renouvellement de la suspension bactérienne.

Pour chacune de ces conditions l'évaluation de l'activité décontaminante de FCA01 est basée sur la capacité des microorganismes à former des UFC sur milieu solide.

II.2 Activité antimicrobienne des substances germicides générées par le media

II.2.1 Activité antimicrobienne d'une eau ayant circulé à travers une FCA(Ag)

Les propriétés germicides d'une eau distillée ayant circulé sur FCA01 ou FCA06 ont été étudiées vis-à-vis des souches d'*E. coli* et *E. coli* K12. Le principe consiste à évaluer la capacité des FCA à générer des substances germicides dans de l'eau distillée stérile. Pour cela le dispositif (Figure 10) est utilisé en boucle fermée avec, deux couches de FCA01 ou 2,5 g de FCA06 sèche placés dans R1. Le volume d'eau distillée stérile inséré dans R2, le temps de circulation en circuit fermé, de même que le temps après lequel les bactéries *E. coli* sont mises en suspension dans R2 varient en fonction des besoins expérimentaux. Les différentes conditions expérimentales expertisées sont décrites Tableau 11. La principale différence avec la manipulation précédente est que les cellules microbiennes ne sont jamais en contact avec les FCA testées. Nous utiliserons de façon arbitraire, pour l'eau distillée stérile qui a sur FCA01 ou FCA06 avant sa mise en contact avec les microorganismes, la terminologie suivante : eau « traitée » par FCA01, eau « traitée » par FCA06 ou eau « traitée » par FCA(Ag) si on se réfère aux deux types de FCA.

Tableau 11 : Conditions expérimentales pour l'étude de l'activité germicide d'eau « traitée » par FCA(Ag).

Condition	FCA utilisée	Quantité FCA	Volume dans R2	Temps de circulation de l'eau (minutes)	Temps correspondant à la mise en suspension des bactéries* (minutes)
1	FCA01	0,5 g de FCA sèche	500 mL	64	0
2	FCA01	0,5 g de FCA sèche	500 mL	64	32
3	FCA06	2,5 g de FCA sèche	250 mL	15	0
4	FCA06	2,5 g de FCA sèche	250 mL	15	32
5	FCA06	2,5 g de FCA sèche	250 mL	15	64

* Temps après lequel les bactéries sont mises en suspension dans R2 par rapport à l'arrêt de la circulation de l'eau sur le dispositif en circuit fermé.

Une fois que les bactéries sont mises en suspension dans R2, à la concentration d'environ 10^6 cellules.mL⁻¹, des aliquots de 2 mL sont prélevés après 0, 8, 16, 32 et 64 minutes de temps de contact entre l'eau « traitée » et les cellules pour les conditions 1 et 2 et

après 0, 8, 16 et 32 minutes pour les conditions 3 à 5. Le nombre d'UFC est déterminé pour chaque prélèvement.

II.2.2 Activité antimicrobienne d'une eau « traitée » additionnée ou non d'agents inhibiteurs des ROS et/ou d'un neutralisant des ions Ag^+

Afin de pouvoir effectuer une identification des substances germicides générées ou libérées dans le milieu et d'essayer de déterminer leur implication respective dans le mécanisme de germicidie, divers agents inhibiteurs de ROS ou neutralisant des ions Ag^+ ont été utilisés, à savoir :

- la catalase d'*Aspergillus niger* (5270 unités.mg⁻¹ de protéines) (Sigma Chemicals, USA), inhibiteur de l'action des peroxydes
- le benzoate de sodium (Fisher Chemicals, Royaume-Uni), inhibiteur de l'action des superoxydes
- la SOD (200 000 unités.g⁻¹) (IDBio, France), inhibiteur de l'action des superoxydes
- le thioglycolate de sodium (Sigma-Aldrich, Royaume-Uni) agent neutralisant des ions Ag^+

Ils sont immédiatement additionnés dans une eau préalablement « traitée » par FCA06 pendant 15 minutes et ce juste avant l'ensemencement d'*E. coli* à la concentration initiale de 10⁶ cellules.mL⁻¹.

La concentration finale des deux enzymes, catalase et SOD, a été ajustée de façon à obtenir 30 unités enzymatiques.mL⁻¹, le thioglycolate de sodium a été ajouté à 0,1 % w/v et le benzoate de sodium à 1 % w/v. Des prélèvements de 2 mL de la suspension bactérienne, additionnée ou non de ces agents, sont effectués après 0, 8, 16 et 32 minutes de contact entre l'eau « traitée » par FCA06 pour ensemencement sur milieu solide afin de dénombrer le nombre d'UFC.

II.3 Analyse des effets antimicrobiens de l'argent sur les bactéries

A partir d'une solution mère de nitrate d'argent à 1 g.L^{-1} en Ag^+ , plusieurs dilutions sont préparées dans de l'eau distillée stérile afin de réaliser une gamme de concentrations qui soit comprise entre 450 et 10 000 ppb.

Les différentes concentrations de la gamme en Ag^+ sont contrôlées par un dosage en spectrométrie d'absorption atomique de flamme selon la norme AFNOR FD T 90-112. Cette norme est applicable lorsque les concentrations en argent sont supérieures à 50 ppb.

Pour chaque concentration en Ag^+ testée, les bactéries *E. coli* sont alorsensemencées à la concentration de 10^6 cellules.mL⁻¹, sous agitation, et des prélèvements de 2 mL sont réalisés après 0, 5, 10, 15, 20, 30, 40, 50 et 60 minutes de contact entre les différentes concentrations en argent et les cellules. Le nombre d'UFC est déterminé pour chaque prélèvement.

II.4 Analyse statistique

La spécificité des résultats des tests de bactéricidie réalisés (II.1) avec certaines FCA a été évaluée par une analyse statistique. Le but est de comparer les sensibilités des bactéries à l'action des différentes FCA.

Le test de Kruskal-Wallis est un test de variance non paramétrique, qui permet d'analyser les différences observées entre les activités bactéricides de FCA01, FCA02 et FCA03, afin de déterminer si elles sont significatives ou non. Ce test a été choisi en fonction du nombre de réplique réalisée pour chaque essai et il compare les valeurs moyennes de plusieurs conditions. Dans cette étude les pentes sont comparées à l'origine par paire, elles sont calculées sur les quatre premiers points (correspondant à la partie linéaire) des courbes de décroissance de la concentration bactérienne.

III. TECHNIQUES D'ANALYSES

III.1 Analyses biologiques

III.1.1 Détermination du nombre d'Unités Formant des Colonies (UFC) par dénombrement sur milieux nutritifs solides

Le nombre d'UFC est déterminé par la technique des dilutions-étalements. Pour chaque prélèvement de 2 mL réalisé, une série de dilutions décimales est effectuée et chaque dilution est étalée en double sur milieu nutritif solide approprié. Les milieux sont placés à l'étuve aux températures adéquates selon le type microbien employé (37°C pour les bactéries et 30°C pour les levures et les champignons) pendant 24 heures pour les bactéries et 48 heures pour les levures et les champignons. Les résultats sont exprimés sous la forme de $f(t) = \log(1+x)$, où x représente le nombre d'UFC.

III.1.2 Analyses de l'intégrité membranaire par CytoMétrie en Flux (CMF)

La CMF est une technique d'analyse et de tri de cellules isolées entraînées par un flux liquide. Les cellules en suspension défilent dans une gaine liquide devant un faisceau laser une à une. Les cellules émettent alors des informations lumineuses séparées par un réseau optique et dirigées vers des photomultiplicateurs qui les amplifient et les transforment en signaux électroniques. Les résultats de l'analyse apparaissent sous forme d'histogramme (intensité relative d'un signal en fonction du nombre d'évènements) ou de cytogrammes (corrélation de paramètres deux à deux) (Figure 11).

Différents paramètres peuvent être pris en compte simultanément. Il s'agit d'une part des paramètres de diffusion de la lumière laser par les cellules [dans l'axe Forward Scatter (FSC) ou à angle droit Side Scatter (SSC)] qui sont fonction des caractéristiques morphologiques de la souche analysée, et d'autre part, de paramètres de fluorescence *via* l'utilisation de fluorochromes spécifiques d'une structure ou d'une fonction cellulaire. Les signaux lumineux émis par les cellules (fluorescence ou diffusion) et traités sont quantifiés

sous forme d'unités arbitraires et proportionnelles à l'activité de la fonction étudiée ou de l'importance du paramètre structural étudié.

L'appareil utilisé est un analyseur-trieur FACS-Vantage (Becton-Dickinson, USA). Deux fluorochromes ont été utilisés pour les diverses analyses réalisées par CMF.

- L'Iodure de Propidium (IP), fluorochrome qui se fixe sur les acides nucléiques des cellules dont les membranes sont endommagées, a été utilisé comme marqueur de la létalité bactérienne. Il est excité à l'aide d'un laser Argon (raie 488 nm) d'une puissance de 50 mV. La fluorescence rouge, émise par les bactéries qui ont intégré l'IP, est recueillie à l'aide d'un filtre passe-haut de 610 nm, et est représentée par FL3 sur les cytogrammes ou les histogrammes.

- La « Fluorescein IsoThioCyanate » (FITC), fluorochrome, dans notre cas couplé à un anticorps, qui permet de différencier les bactéries des autres événements. L'intensité de fluorescence sera directement reliée au nombre de bactéries immuno-marquées. Il est excité à l'aide d'un laser Argon (488 nm) et la fluorescence (verte) est recueillie à l'aide d'un filtre passe-haut de 530 nm, elle est notée FL1 sur les cytogrammes ou les histogrammes.

Avant analyse de la fluorescence des cellules, une acquisition conditionnelle est réalisée de façon systématique sur un cytogramme FSC/SSC pour éliminer de l'analyse les débris et les agrégats cellulaires. Chaque test est réalisé sur un minimum de 10 000 cellules et la vitesse d'analyse est de 1 000 événements par seconde.

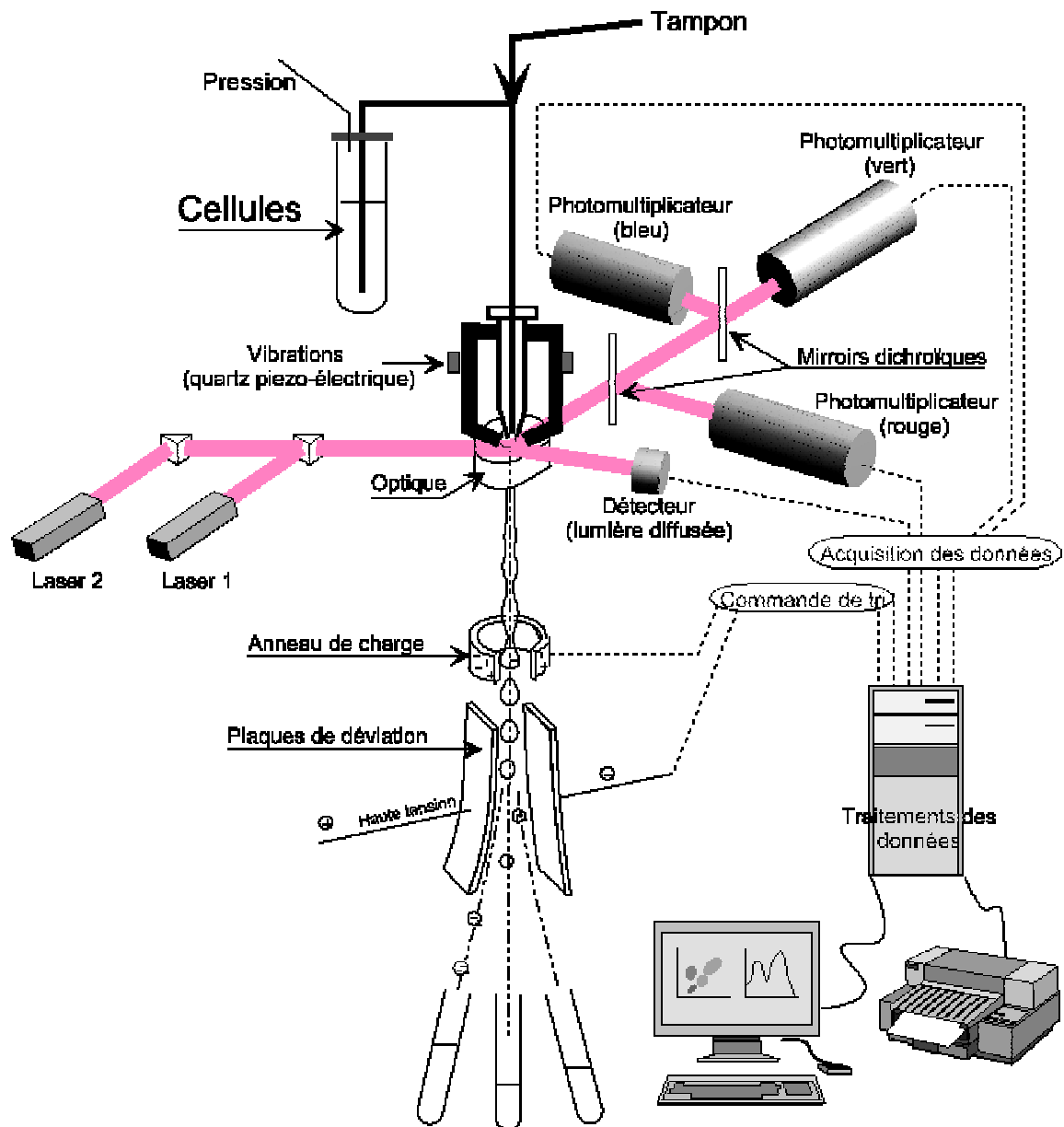


Figure 11 : Schéma de principe de l'analyse par cytométrie en flux.

III 1.2.1 Analyse de l'intégrité membranaire de bactéries en contact avec l'eau « traitée » par FCA06

La technique de cytométrie en flux *via* l'utilisation de l'IP permet de mettre en évidence la perte d'intégrité membranaire des bactéries. L'IP (Molecular probes, USA) est préparé sous forme d'une solution « stock » à $0,5 \text{ mg.mL}^{-1}$ dans de l'eau distillée.

De l'eau distillée stérile circule pendant 15 minutes dans le dispositif expérimental pourvu de FCA06 (Tableau 11, condition expérimentale 4). Les bactéries *E. coli* K12 sontensemencées à une concentration initiale de 10^6 cellules.mL⁻¹ dans cette eau « traitée ». 1 mL de suspension est prélevé, après 0, 4, 8, 16 et 32 minutes de contact entre les cellules et l'eau « traitée » puis l'IP est additionné extemporanément à la concentration finale de 0,025 mg.mL⁻¹ avant l'analyse par CMF. Ce test a été utilisé pour différentes conditions d'expérimentations : sur une suspension témoin (dilution des bactéries dans de l'eau « non traitée ») et sur une suspension test réalisée avec l'eau « traitée » par FCA06 additionnée ou non des différents inhibiteurs cités précédemment (catalase, SOD et thioglycolate de sodium).

III.1.2.2 Analyse de l'intégrité membranaire de bactéries aérosolisées

Les bioaérosols réalisés avec la souche *E. coli* K12 ont également été analysés par CMF. Les prélèvements d'air, sont réalisés à l'aide d'un préleveur MD8 Airscan (Sartorius, France) en sortie du dispositif expérimental utilisé pour les essais de décontamination de l'air (Partie 2 - IV.2). Les bactéries contenues dans les échantillons d'air prélevés sont collectées en sortie du banc à air sur des membranes en gélatine (Sartorius, France) de porosité 0,5 µm. Les gélatines sont ensuite dissoutes dans 50 mL d'eau distillée stérile afin que les bactéries soient mises en suspension. Cette eau est thermostatée à 37°C afin de faciliter la dissolution des membranes.

Afin de repérer les bactéries des agrégats de gélatine non dissous, un immuno-marquage, spécifique d'*E. coli* K12, a été utilisé pour les analyses en CMF. Quatre aliquots de la suspension (composée de gélatine et de bactéries) sont prélevés et subissent chacun un protocole de marquage spécifique (Tableau 12). Le tampon Phosphate Buffered Saline (PBS), utilisé lors de l'étape de lavage, est composé de 80 g.L⁻¹ de NaCl, 2 g.L⁻¹ de KCl, 11,5 g.L⁻¹ de Na₂HPO₄ et 2 g.L⁻¹ de KH₂PO₄, ajusté à pH 7. Lors de l'utilisation ce tampon est dilué 10 fois dans de l'eau distillée stérile.

L'anticorps primaire (AcI) (Dako, Danemark) est un Ac polyclonal spécifique anti-*E. coli* K12, produit chez le lapin, et non fluorescent.

L'anticorps secondaire (AcII), fraction Fab' d'immunoglobuline anti-lapin marquée au FITC (Dako, Danemark) et produit chez le porc. L'AcII n'est qu'une partie tronquée de l'immunoglobuline afin de palier aux fixations non spécifiques.

Le sérum est un mélange d'immunoglobulines de lapin non marquées qui sert à différencier la fluorescence spécifique des anticorps d'intérêt de la fluorescence non-spécifique (Dako, Danemark).

Le premier marquage (cellules seules) permet de vérifier que les cellules ne sont pas autofluorescentes. Le second marquage permet de vérifier que les AcII ne se fixent pas aux cellules *E. coli* K12 engendrant ainsi une fluorescence non spécifique. Le troisième marquage permet d'évaluer la réelle fluorescence non spécifique, cette fluorescence correspond aux fixations non spécifiques des immunoglobulines à *E. coli* K12, c'est-à-dire celles qui se font par la partie non spécifique de l'immunoglobuline.

Les différents échantillons utilisés lors du protocole d'immuno-marquage sont dans certains cas additionnés d'IP.

Tableau 12 : Protocole d'immuno-marquage pour analyse en CMF.

1 sans marquage (cellules seules)	1 ml de suspension	+ 10µl d'eau distillée	Incubation 30 min à 20°C suivie de 2 lavages avec du tampon PBS	+ 10µl d'eau distillée	Incubation 30 min à 20°C suivie de 2 lavages avec du tampon PBS	⇒ détection de l'autofluorescence des cellules
2 cellules et AcII	1 ml de suspension	+ 10µl d'eau distillée		+ 10µl de AcII		⇒ détection de fluorescences non spécifiques des cellules
3 sérum et AcII	1 ml de suspension	+ 10µl de sérum		+ 10µl de AcII		⇒ détection de la fluorescence spécifique des cellules
4 ESSAI AcI et AcII	1 ml de suspension	+ 10µl de AcI		+ 10µl de AcII		

III.1.3 Etude du contenu en ATP

L'évaluation du contenu en ATP des bactéries a été réalisée sur une suspension d'*E. coli* qui a circulé, ou non, au travers de FCA01. La détermination de la quantité en ATP se fait par bioluminescence à l'aide de la méthode luciférine-luciférase selon les instructions

du fabricant (Perstop Analytical, France) avec le kit NRB/lumit-PM contenant un tampon de lyse cellulaire et d'extraction d'ATP et le complexe enzyme-substrat. La bioluminescence est mesurée grâce à un Lumac Biocounter M2500 (Perstop Analytical, France). L'intensité de luminescence est proportionnelle à la teneur en ATP disponible de l'échantillon et est convertie par l'appareil en « Relative Light Units » (ou RLU). La teneur totale en ATP est déterminée après les étapes de lyse des cellules et d'extraction de l'ATP. La teneur en ATP libre initial est mesurée selon le même protocole mais sans ajout du tampon de lyse et d'extraction. La quantité en ATP intracellulaire est calculée par la différence entre la quantité totale en ATP et la quantité d'ATP libre.

Deux échantillons de 0,1 mL sont prélevés dans R2 après des temps de circulation de 0, 4, 8, 16, 32 et 64 minutes et sont utilisés pour mesurer respectivement la quantité en ATP totale et celle en ATP libre initial.

III.1.4 Etude de l'expression génétique par Reverse Transcriptase-Polymerase Chain Reaction (RT-PCR)

Une suspension de bactéries *E. coli* K12 a été mise en contact pendant 4 minutes avec 250 mL d'eau « traitée » par FCA06 pendant 15 minutes. La totalité de la suspension (« traitée »), de même qu'une suspension témoin (« non traitée ») à 2.10^7 cellules.mL⁻¹, ont ensuite été centrifugées et les ARNm ont été extraits avec le kit RNeasy maxi kit (Qiagen, France). Après élution dans 1,6 mL d'eau RNase-free, la quantité d'Acide RiboNucléique (ARN) est estimée par mesure de la DO à 260 nm. La préparation est contrôlée qualitativement par électrophorèse sur gel d'agarose 1 % *via* le rapport DO à 260 nm sur DO à 280 nm (ce rapport doit être compris entre 1,8 et 2). Les ARN sont ensuite conservés à -80°C.

Les ARN ainsi purifiés servent de matrice pour la reverse transcription qui est réalisée avec des amorces hexamères aléatoires et la reverse transcriptase Superscript II (Superscript™ II, Invitrogen, USA). Les ADNc obtenus sont conservés à -20°C.

Une RT-PCR semi-quantitative est réalisée, en triplicate, à l'aide des amorces de *dnaK*, *recA*, *lexA*, *mopA*, *katG* et *sodA* et de deux gènes calibrateurs, *ARNr16S* et *ARNr23S* (pour lesquels l'expression n'est pas modifiée quelle que soit la condition expérimentale imposée) grâce à un appareil GeneAmp®5700 Sequence Detection System (Perkin Elmer, Etats-Unis). La détermination de la séquence des oligonucléotides est déterminée au préalable grâce au logiciel Primer Express (Perkin Elmer, Etats-Unis) (Tableau 13) et leur spécificité vis à vis du gène d'intérêt est vérifiée par alignement informatique.

Avant de réaliser la RT-PCR, des tests de validation des amorces et d'efficacité de la PCR sont nécessaires. Tout d'abord, une validation expérimentale des amorces des gènes employés a été réalisée. La concentration optimale en amorces est déterminée dans un premier temps. Trois concentrations en oligonucléotides (50, 300 et 900 nM) sont testées afin de déterminer la concentration permettant d'obtenir le meilleur signal de fluorescence. Le mélange réactionnel est composé de 5 µL d'ADN à 2,5 ng.mL⁻¹, de 12,5 µL de Mix SYBR Green et de 2 µL d'amorces sens et antisens à 0,625 µM (pour une concentration finale de 50 nM) ou de 1 et 3µL d'amorces sens et antisens à 7,5 µM pour une concentration finale de 300 et 900 nM respectivement. Le volume est complété à 25 µL par addition d'eau RNase-free.

Puis, l'efficacité de la PCR est testée. Cette étape consiste à vérifier la relation entre le nombre de cycles (Ct) nécessaire pour que le signal de fluorescence atteigne une valeur seuil et le logarithme de la concentration en ADN matrice. Cinq dilutions successives, au ¼, de l'ADN matrice sont réalisées. Le mélange réactionnel consiste alors en 12,5 µL de Mix SYBR Green, 3µL d'amorces sens et antisens à 7,5 µM (concentration finale de 900nM), 1,5 µL d'eau RNase-free et 5 µL d'ADNc test aux concentrations de 2,5, 0,625, 0,156, 0,040 et 0,010 ng.mL⁻¹. Pour une efficacité de la PCR à 100 %, la pente de la droite Ct en fonction du log₁₀ de la concentration en ADN matrice doit être égale à -3,32.

La RT-PCR est réalisée dans 25 µL avec 0,5 µL d'ADNc, 12,5 µL de SYBR® Green PCR Master Mix (Applied Biosystem, Royaume-Uni) et 300 nM de chaque amorce. L'amplification est réalisée selon le programme suivant : préparation de la matrice pendant 10 minutes à 95 °C, suivie de la PCR composée d'une série de 40 cycles de dénaturation de 15 secondes à 95 °C et d'hybridation/élongation de 1 minute à 65 °C. Les changements de fluorescence du SYBR® Green dans chaque cycle sont contrôlés par le logiciel ABI 5700, et

la valeur seuil du nombre de cycles (C_T) pour chaque réaction a été calculée. La quantité relative des produits PCR générés à partir de chaque couple d'amorces a été déterminée à partir de la valeur C_T . Les gènes calibrateurs *ARNr 16S* et *ARNr 23S* ont été employés pour la normalisation de la quantité d'ARN utilisée. La valeur de C_T est déterminée pour chacun des gènes (cibles et calibrateurs). La différence entre le C_T d'un gène cible en condition « non traitée » est soustrait du C_T de ce même gène en condition « traitée », nous obtenons ainsi une valeur $\Delta_1 C_T$. Ce calcul est également réalisé pour les gènes calibrateurs, nous obtenons ainsi une valeur $\Delta_2 C_T$. La valeur quantitative relative est exprimée en tant que $2^{-\Delta_1 C_T} / 2^{-\Delta_2 C_T}$.

Tableau 13 : Quelques caractéristiques des oligonucléotides utilisés. Le numéro d'accèsion sur les banques de données est le même pour tous les gènes : NC 000913 – GI : 16127994.

Gène cible	Séquence (5'-3')	Position
<i>ARNr 16S</i>	TTGACGTTACCCGCAGAAGAA	4164716-4164736
	ACGCTTGCACCCTCCGTAT	4164770-4164788
<i>ARNr 23S</i>	GGCTGATACCGCCCAAGAG	4168673-4168691
	CAGGATGTGATGAGCCGACAT	4168722-4168842
<i>mopA</i>	CAGTTCGACCGTGGCTACCT	4369182-4369201
	AGGATGAACGGGCTTTCCA	4369246-4369264
<i>dnaK</i>	CACCACGCCTTCTATCATTGC	12264-12284
	GACCAATCAGGCGTTTAATCG	12365-12385
<i>recA</i>	CTTGCGGCACGTATGATGAG	2821275-2821294
	CGTGTTGGACTGCTTCAGGTT	2821229-2821249
<i>lexA</i>	AAACGCGGCTGAAGAACATC	4254813-4254832
	ATGCGCCGAAACAATTC	4254862-4254880
<i>sodA</i>	TGGTGCTGAAAGGCGATAAAC	4098785-4098805
	CCGGAAGCGCCAGAAATAG	4098854-4098872
<i>katG</i>	CCGGTCCGACATCAAATGTAG	4132238-4132258
	CGCCCAACCTAAACCTTGTTT	4132288-4132308

III.2 Analyses physiques

III.2.1 Analyse par Microscopie Electronique à Balayage (MEB)

La détermination de la composition élémentaire chimique des tissus FCA01 et FCA06 a été réalisée grâce au MEB avant et après utilisation.

Un canon à électrons produit, par l'intermédiaire d'un Wehnelt (potentiel négatif), un faisceau électronique, affiné par deux condenseurs, qui vient diffracter sur l'échantillon. Le MEB est assisté d'une microsonde électronique (EDAX), (cas des analyses effectuées avec l'appareil de la faculté des Sciences de l'Université de Limoges) ou d'une microsonde EDS (cas des analyses effectuées avec l'appareil de l'Ecole des Mines de Saint-Étienne) qui permet de caractériser la composition de l'échantillon analysé par diffraction X.

III.2.2 Analyse par X-Ray Photoelectron Spectroscopy (XPS)

Les spectroscopies à électrons, dont fait partie XPS, sont utilisées pour l'analyse élémentaire de la surface des matériaux quels qu'ils soient. La profondeur analysée est de 80Å ce qui correspond à quelques couches atomiques, et la limite de détection est de l'ordre du pourcent atomique. Le domaine d'application concerne les analyses qualitatives et quantitatives des surfaces des matériaux ainsi que la détermination de leurs formes chimiques.

La spectroscopie XPS est basée sur la photo-émission. Le principe consiste à exciter le matériau par un faisceau monochromatique de rayons X et les atomes de surface émettent des photoélectrons dont l'énergie cinétique est reliée à l'énergie de liaison avant éjection (Figure 12).

Comme l'énergie de liaison varie avec la nature, l'environnement chimique et le degré d'oxydation de l'atome émetteur, l'analyse spectrale de l'émission photoélectronique constitue une analyse élémentaire décrivant la forme chimique des atomes de surface.

XPS est une méthode d'analyse quantitative permettant de donner les quantités des atomes (C, O, N...) en surface et également une méthode d'analyse chimique permettant de déterminer la nature des liaisons chimiques relatives à un atome donné. Ainsi, FCA01 va être

analysé afin de déterminer la nature de leurs fonctions de surface, ceci avant et après utilisation de FCA01 dans le réacteur R1 du dispositif expérimental (Figure 10). Les analyses sont focalisées sur trois atomes : C, O et N.

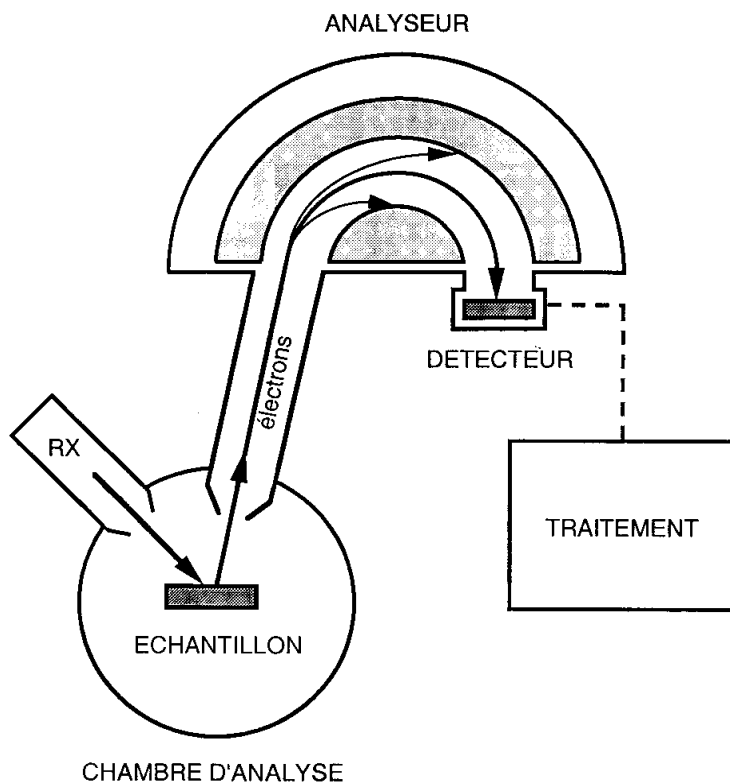


Figure 12 : Schéma de principe du spectrophotomètre.

III.2.3 Analyse par Résonance Paramagnétique de l'Electron (RPE)

Cette technique permet de détecter directement la présence des ROS. En raison de leurs durées de demi-vie courtes, il est très difficile de pouvoir faire une mesure directe de la présence des ROS. Les analyses par RPE doivent donc utiliser des piègeurs de radicaux.

La RPE est une méthode spectroscopique qui depuis sa découverte (1925) s'est révélée être un outil intéressant pour l'étude des systèmes biologiques, chimiques ou physiques. Elle permet de détecter et d'étudier des substances paramagnétiques, c'est à dire des substances

possédant des électrons non appariés. Les radicaux libres font partie des substances détectables par RPE.

Les analyses par RPE sont réalisées extemporanément au fur et à mesure de la circulation de l'eau distillée stérile au travers de FCA01, en boucle fermée pendant une heure. Des analyses identiques sont également réalisées sur cette même fibre de carbone préalablement réduite sous forme de poudre avant sa dispersion en milieu aqueux.

500 mL d'eau distillée stérile sont mis à circuler sur le dispositif (Figure 10 et condition 1 Tableau 11), pourvu de FCA01 pendant 64 minutes. Des prélèvements sont effectués à 0, 1, 2, 4, 8, 16, 32 et 64 minutes puis analysés par RPE.

Le radical OH° potentiellement généré ou $\text{O}_2^{\circ-}$ sont analysables grâce à un piègeur : le 5,5-DiMéthyl-1-Pyrroline N-Oxyde (DMPO) (Sigma Chemicals, USA). Ce piègeur est ajouté à l'eau distillée stérile au début de la manipulation à une concentration de 17 mmol.L^{-1} de sorte que ces espèces potentiellement créées soient capturées au fur et à mesure de leurs générations, ou bien dans chaque prélèvement effectué temporellement de façon à stabiliser les espèces générées présentes dans les échantillons.

III.2.4 Dosage d'Argent par spectrométrie d'absorption atomique dans la flamme

La concentration en argent libéré en solution après passage de l'eau sur les médias FCA01 et FCA06 a été déterminée dans R2 au cours du temps.

Les dosages ont été faits séquentiellement sur de l'eau distillée circulant, en boucle fermée, pendant une heure sur le dispositif pourvu de FCA01 (0,5 g de FCA sèche) ou FCA06 (2,5 g de FCA sèche). Les prélèvements d'échantillons (20 mL) sont réalisés aux temps : 4, 8, 16, 32, 45 et 64 minutes avec FCA01. Avec FCA06, ils sont réalisés après 0, 8, 16 et 32 minutes de circulation en boucle. Tous les prélèvements sont additionnés d'acide nitrique à 68 % (v/v) afin de prévenir les phénomènes éventuels de précipitation des composés métalliques relargués.

Les échantillons sont alors analysés par spectrométrie d'absorption atomique dans la flamme selon la norme AFNOR FD T 90-119, norme applicable aux concentrations en argent comprises entre 1 et 50 $\mu\text{g.L}^{-1}$, ou selon la norme AFNOR FD T 90-112 applicable aux concentrations comprises entre 0,05 et 4 mg.L^{-1} . L'échantillon est placé dans le four d'un spectromètre d'absorption atomique équipé d'une source d'atomisation électrothermique. La mesure de l'absorbance se fait à la longueur spécifique de l'argent, soit 328,1 nm.

IV DECONTAMINATION DE L'AIR

IV.1 Souches aérosolisées et conditions de culture

Les souches utilisées pour la génération des bioaérosols sont *E. coli* et *E. coli* K12. Les conditions de culture de ces bactéries sont celles décrites Partie 2 - I.1.1.

Le nombre d'UFC a été déterminé sur un milieu à base de farine de soja (Merck, Allemagne) composé de 15 g.L^{-1} de peptone de caséine, 5 g.L^{-1} de peptone de farine de soja, 5 g.L^{-1} de chlorure de sodium et 15 g.L^{-1} d'agar.

IV.2 Pilote expérimental

Le pilote utilisé pour les essais de décontamination de l'air (Figure 13 et Figure 14) a été mis au point dans notre laboratoire, le principe s'appuyant sur un brevet déposé par la société Sofrance.

Le principe de décontamination de l'air est basé sur la nébulisation d'une eau « traitée » (Figure 14) dans une chambre de mélange dans laquelle un bioaérosol a été au préalable généré et stabilisé. Des échantillons d'air sont prélevés en sortie de la chambre de mélange à l'aide d'un préleveur automatique (Sartorius, France) en vue de déterminer la concentration bactérienne.

Un synoptique du pilote expérimental est présenté Figure 15 et la liste des différents équipements, instruments et composants est reprise Tableau 14.

La suspension bactérienne contenue dans T50 et l'eau « traitée » contenue dans T70 sont nébulisées indépendamment par deux nébuliseurs M20 et M30 grâce à de l'Air

Comprimé (AC). L'alimentation de M20 et M30 se fait par la même pompe péristaltique P40A-P40B. Les deux aérosols se mélangent dans le réacteur hermétique T10. Le prélèvement d'échantillon est effectué en S90.

L'eau « traitée » est générée dans le circuit fermé composé de T60, réacteur statique renfermant la FCA ; T70, réacteur dynamique contenant de l'eau distillée stérile et P80 pompe régulant le débit de liquide dans ce circuit qui est l'équivalent de celui présenté Figure 10.

Le flux d'AC est contrôlé par un débitmètre régulateur massique (Brooks, Hollande) et la température et le pourcentage d'HR sont contrôlés par un thermohygromètre (Dostmann, Allemagne) contenant une sonde unique. La précision de la sonde du thermohygromètre est de 0,1°C de -100°C à 200°C pour la température et de 1 % pour l'HR.

T10 est modulable, les différentes configurations sont récapitulées en Annexe 5, avec en fonction des différents volumes et débits d'AC, les temps de séjour correspondant.

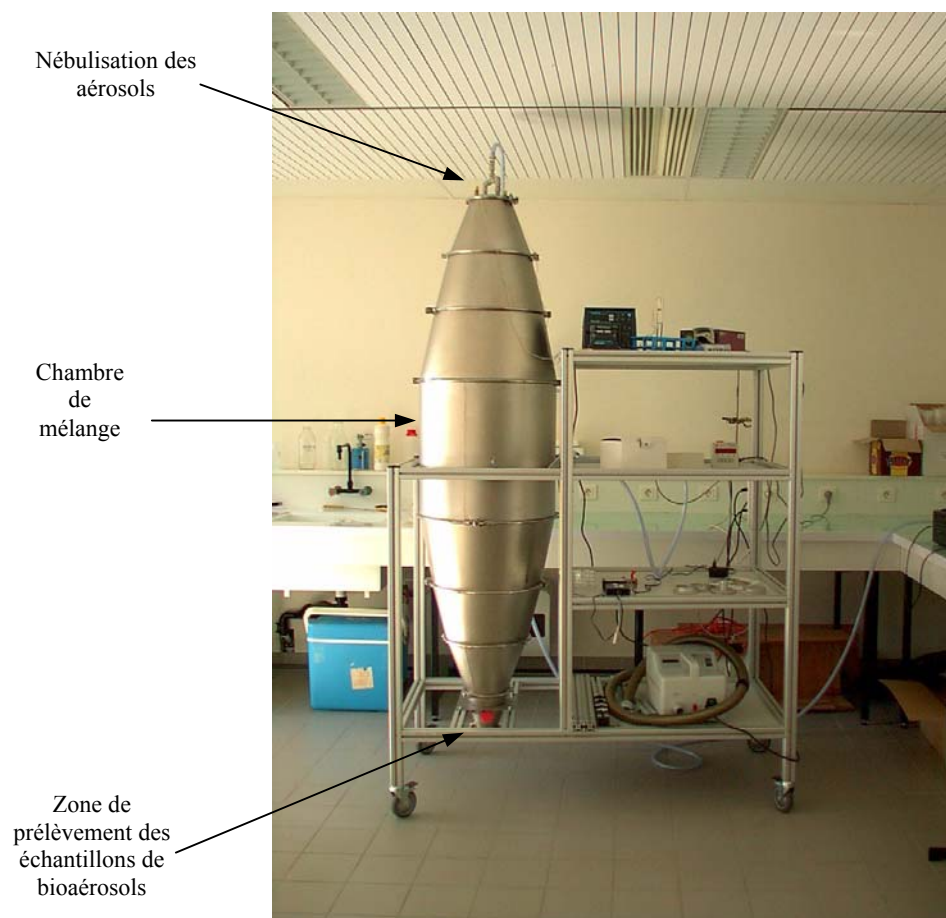


Figure 13 : Photo du dispositif expérimental de décontamination de l'air.

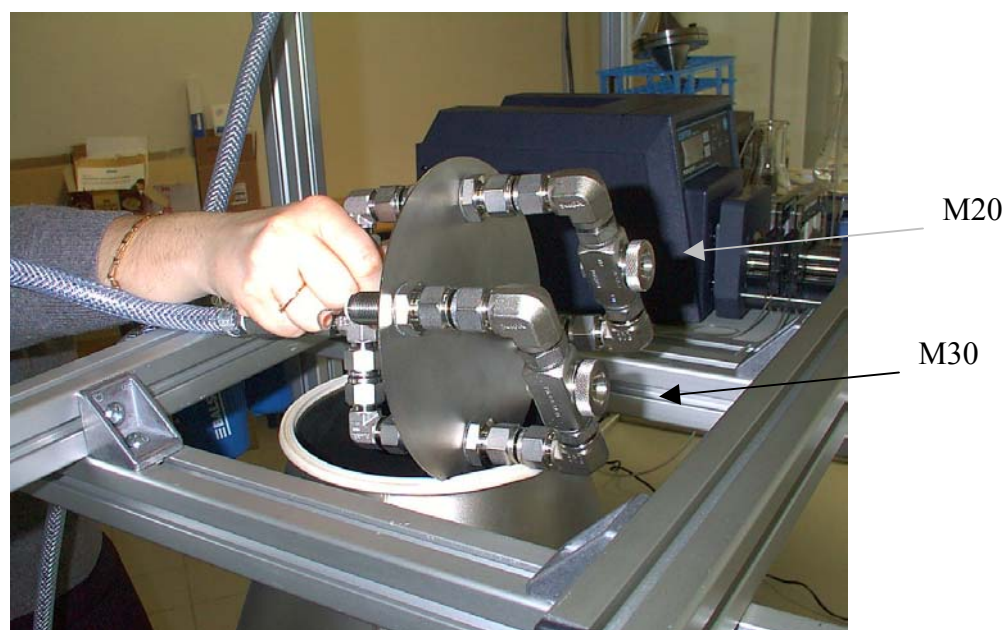


Figure 14 : Photo du système de génération des aérosols par deux nébuliseurs (M20 et M30).

Tableau 14 : Nomenclature des équipements.

Repères	Description	Caractéristiques
AC	source d'AC	pression initiale de 3 bars
T 10	réacteur dynamique, chambre de mélange	inox, de diamètre de 80 à 500 mm, volume variable selon le temps de séjour désiré
M 20	atomiseur pour la suspension bactérienne	inox, pulvérisation à l'AC, débit d'eau de 0 à 5 L.min ⁻¹
M 30	atomiseur pour l'eau « traitée »	inox, pulvérisation à l'AC, débit d'eau de 0 à 5 L.min ⁻¹
P40A – P40B	pompe péristaltique	multi-cassettes, régulation à de très faibles débits : 0,007-126 mL.min ⁻¹
T 50	réacteur dynamique	Pyrex, contient la suspension bactérienne
T 60	réacteur statique	inox, diamètre 47 mm, contient la fibre de carbone activé
T 70	réacteur dynamique	Pyrex, 500 mL, contient l'eau « traitée »
P 80	pompe péristaltique	réglage à un débit de 70 mL.min ⁻¹
S 90	filtre, pour le prélèvement	gélatine hydrosoluble, diamètre 80 mm
FIC 11/CV 11	débitmètre massique régulant le débit d'AC	réglage des débits d'AC de 0 à 50 L.min ⁻¹
AI 13	thermohygromètre contrôlant le pourcentage d'HR et la température dans T10	équipé d'une sonde unique humidité/température

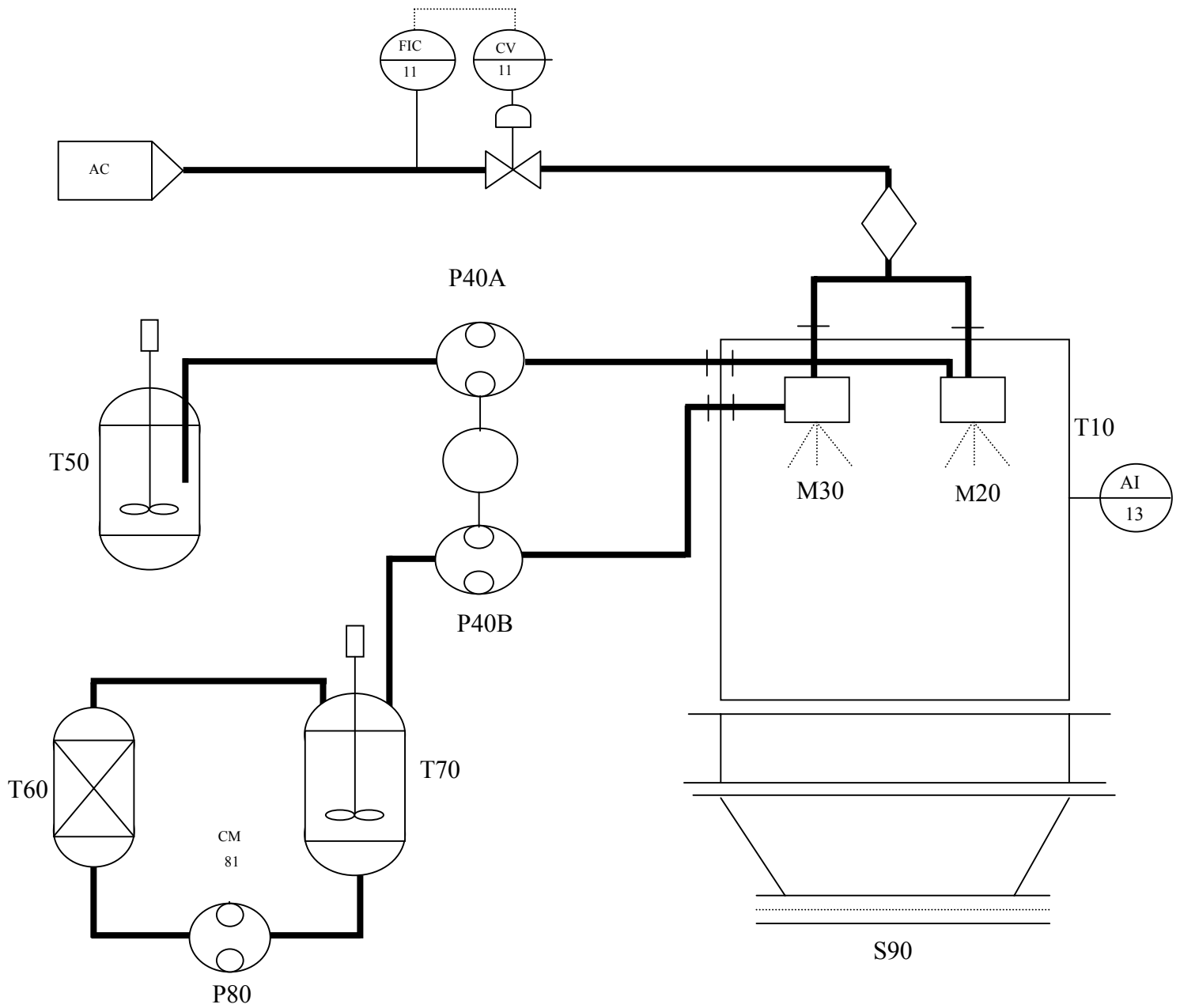


Figure 15 : Synoptique du dispositif expérimental pour la décontamination de l'air.

IV.3 Méthodes

Avant et après chaque manipulation, la surface intérieure de la chambre de mélange est nettoyée à l'éthanol puis séchée au papier Joseph.

Lors de la mise en route du banc d'essai, M20 et M30 nébulisent de l'eau distillée stérile. Le débit de l'AC est fixé à 33,33 ou 50 L.min⁻¹ (afin d'être en isocinétie avec le préleveur d'échantillons d'air) et le débit du liquide arrivant en M20 est fixé en permanence à 0,09 mL.min⁻¹. Au niveau de M30 le débit sera ajusté à 0,09 - 0,18 ou 0,27 mL.min⁻¹ selon les expérimentations. Cette phase dure jusqu'à la stabilisation de l'HR à la valeur désirée.

La configuration de la chambre de mélange est faite selon la conformation 4 (Annexe 5), le volume est d'environ 235 L et le temps de séjour est de 4 min 42 sec pour un débit d'AC de 50 L.min⁻¹ ou de 7 min 03 sec pour un débit d'AC de 33,33 L.min⁻¹.

Remarque : Toutes les justifications quant aux choix des débits d'AC et de liquide (eau distillée stérile ou suspension bactérienne), du temps de séjour dans T10, de la souche bactérienne et des paramètres de collecte du bioaérosol seront détaillées partie 3, chapitre 2.

Lorsque ces paramètres sont stables, l'eau distillée stérile nébulisée par M20 est remplacée par la suspension bactérienne d'*E. coli* ajustée entre 10² et 10⁴ cellules.mL⁻¹ selon les expérimentations. Cette phase correspond à la phase de stabilisation en concentration du bioaérosol. Dans un premier temps, le suivi de la concentration en bioaérosol a été réalisé selon les deux temps de séjour cités précédemment.

Dans un second temps, l'eau distillée stérile nébulisée en M30 est remplacée par de l'eau oxygénée ou l'eau « traitée » générée dans le circuit parallèle (T60-T70-P80) pourvu de FCA06.

Des prélèvements par filtration sont effectués en S90 grâce au préleveur MD8 Airscan (Sartorius, France), en isocinétie avec le débit d'AC appliqué dans le banc expérimental, sur des membranes en gélatine au seuil de rétention de 0,5 µm (Sartorius, France). Les prises d'échantillons se font pendant 1 minute, tous les ¼ d'heure à partir du moment où les bactéries sont aérosolisées.

Les gélatines sont déposées stérilement sur milieu nutritif solide PCA. Les cultures sont mises à incuber 24 heures à 37°C puis les UFC sont dénombrées. Chaque manipulation est répétée 3 fois.

Remarque : Les résultats sont exprimés sous la forme $f(t) = \% \text{ létalité}$ ou sous la forme $f(t) = \log(1+X)$ où X représente le nombre d'UFC.mL⁻¹. Sur les graphiques, seuls les points correspondant au test sont représentés, les points relatifs à la phase de stabilisation ne sont pas représentés.

Partie 3 :

Résultats et Discussion

Chapitre 1 :
L'activité antimicrobienne des FCA

La présentation des résultats est divisée en deux chapitres.

Dans le premier, plus spécialement consacré aux travaux effectués en phase aqueuse, les caractéristiques et les propriétés germicides des FCA sont tout d'abord détaillées ; les différentes investigations menées afin de comprendre les mécanismes mis en jeu dans le pouvoir antimicrobien sont ensuite abordées. Cette partie des travaux a fait l'objet de deux publications (Annexes 1 et 2).

Le second chapitre est consacré à la mise en place et à l'application du procédé de décontamination à base de FCA sur un air artificiellement contaminé.

I MISE EN EVIDENCE DES EFFETS ANTIMICROBIENS

I.1 Activité antimicrobienne des FCA

I.1.1 Activité bactéricide de FCA imprégnées ou brutes

Les propriétés antimicrobiennes des FCA imprégnées de métaux sont généralement étudiées à partir de deux tests réalisés dans des conditions statiques. Le premier est dit « Halo test » qui peut être assimilé à un test du type « antibiogramme ». Il consiste en une évaluation d'une zone d'inhibition autour d'un échantillon de FCA déposé sur un milieu gélosé nutritifensemencé de bactéries. Le second est le « test effusion ». L'activité bactéricide et la quantité de métal libéré du média imprégné sont déterminées après trempage de l'échantillon de FCA dans une suspension bactérienne pendant un temps donné (OYA et coll., 1993a ; OYA et coll., 1993b ; OYA et coll., 1993c ; OYA et coll., 1994 ; OYA et coll., 1996 ; WANG et coll., 1998 ; LI C.Y. et coll., 1998 ; WAN et coll., 1999 ; TAMAI et coll., 2001).

La bibliographie ne rapporte pas de tests réalisés en conditions dynamiques ; c'est pour cette raison que nous avons mis au point un pilote expérimental et un protocole d'étude afin d'analyser l'activité antimicrobienne des FCA dans ces conditions.

I.1.1.1 Contrôles

Le pilote expérimental utilisé pour l'évaluation de l'activité bactéricide de diverses FCA est décrit Partie 2 -Figure 10. Avant de mettre en œuvre ce dispositif avec les fibres de carbone activé, un contrôle et une manipulation témoin ont été réalisés.

Au préalable, nous avons vérifié que les matériaux constitutifs du dispositif (tuyaux, cellule en inox, grilles de support des médias) n'avaient aucun effet inhibiteur sur la revivification des cellules microbiennes et ne présentaient pas de propriétés d'adsorption des cellules. Les résultats (Figure 16) montrent que le dispositif, dans son intégralité, est sans incidence sur la revivification des cellules, la concentration reste constante tout au long de l'expérience.

Ensuite, un profil de référence a été réalisé avec une membrane en nitrate de cellulose au seuil de coupure de 0,2 μm . Le but est de déterminer la décroissance de la concentration cellulaire (avec la souche *E. coli*) dans des conditions de filtration. La membrane en nitrate de cellulose est placée dans R1 et la suspension bactérienne, ajustée à approximativement 10^6 cellules.mL⁻¹, est placée dans R2. Une décroissance quasi-constante de la concentration en *E. coli* est observée au cours du temps (Figure 16). La diminution est de 5 unités log après 64 minutes de circulation ; des bactéries sont toujours présentes en solution après le temps de circulation imposé, ce qui signifie qu'elles ne sont pas toutes passées par R2. Dans un système parfaitement agité, on considère que toutes les molécules présentes dans le réacteur ont une probabilité de « sortie » qui est fonction du volume de la suspension (V) et du débit (Q). Au bout d'un temps égal à 3 temps de séjour (V/Q) il reste théoriquement 5 % des molécules initialement présentes, il faut monter au minimum à 5 temps de séjour pour que cette fraction soit inférieure à 1 % (VILLERMAUD, 1993). En considérant R2 comme un réacteur parfaitement agité, que la « sortie » équivaut à un passage par R1 et en prenant en compte le volume et le débit utilisés (500 mL et 70 mL.min⁻¹), il faut théoriquement environ 36 minutes pour éliminer toutes les cellules de la suspension. Nous remarquons expérimentalement que ce temps n'est pas suffisant pour que la totalité des cellules de R2 soit éliminée, il faut au moins une heure pour atteindre cet objectif (Figure 16).

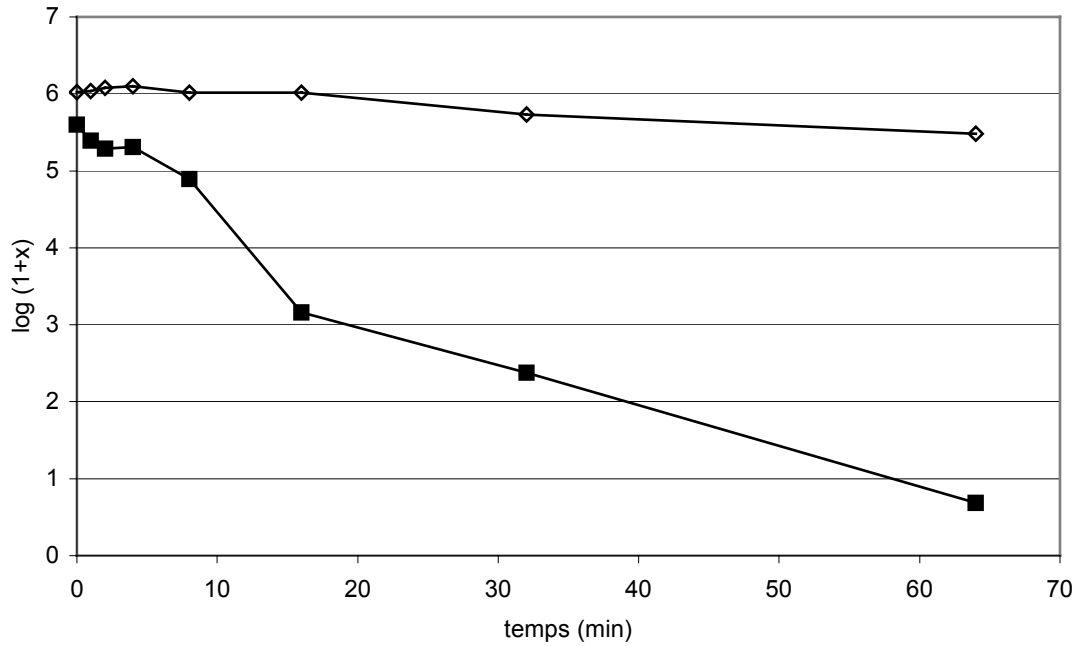


Figure 16 : Evolution de la concentration bactérienne d'*E. coli* au cours du temps après passage par le dispositif dépourvu de média (◇) ou pourvu d'une membrane en nitrate de cellulose au seuil de coupure 0,2 µm (■).

X représente le nombre d'UFC.mL⁻¹ et chaque courbe est le résultat d'une moyenne d'au moins 3 expérimentations.

1.1.1.2 Les FCA testées

Les potentialités de décontamination de différentes FCA (FCA00 à FCA06) ont été ensuite évaluées grâce au même pilote expérimental. Les conditions d'expérience sont les mêmes que celles appliquées pour la détermination du profil de filtration. Les temps de contact entre les cellules microbiennes et le média sont de 2 secondes pour les FCA00 à FCA05 et de 24 secondes pour la FCA06.

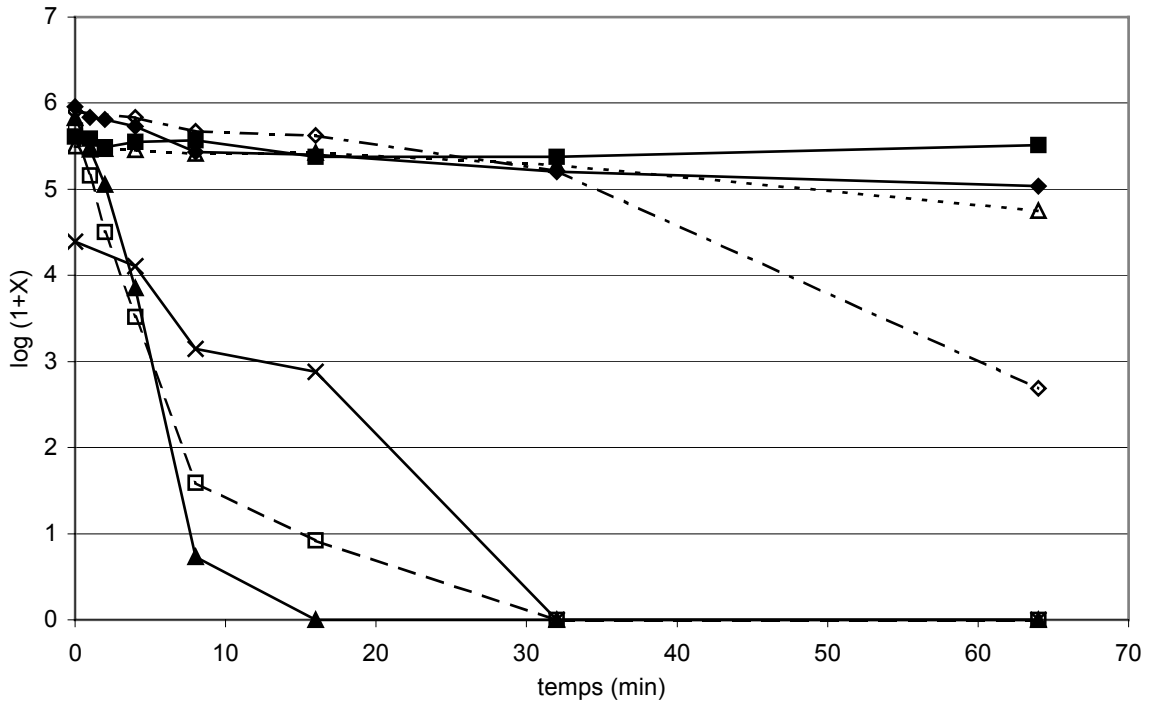


Figure 17 : Activité bactéricide de FCA00 (◇), FCA01 (□), FCA02 (▲), FCA03 (Δ), FCA04 (◆), FCA05 (■) et FCA06 (×) vis-à-vis d'*E. coli*. X représente le nombre d'UFC.mL⁻¹ et chaque courbe est le résultat d'une moyenne d'au moins 3 expérimentations.

D'une manière générale, les résultats prouvent que les FCA sont aptes à décontaminer une suspension bactérienne (Figure 17). FCA05 est l'exception car la concentration bactérienne reste constante tout au long de la manipulation. La capacité de décontamination dépend des médias employés. En effet, les activités bactéricides de FCA03 et FCA04 sont faibles puisque la décroissance observée est de 1 unité log. FCA01, FCA02 et FCA06 montrent de fortes capacités bactéricides et engendrent une élimination totale des bactéries de la suspension, soit environ 6 unités log. FCA01 et FCA06 permettent une décontamination totale après 32 minutes de circulation et FCA02 après seulement 16 minutes. Les deux médias imprégnés de 0,05 % d'argent (FCA01 et FCA06) montrent des capacités bactéricides similaires avec cependant des temps de contact différents puisque le temps de contact pour FCA06 est environ 10 fois plus long que pour FCA01. L'abattement observé pour FCA00 atteint 3,2 unités log après 64 minutes ce qui indique des propriétés bactéricides intermédiaires pour ce média. Un classement des activités bactéricides des FCA peut être établi suite à ces résultats, du média le plus bactéricide au moins bactéricide : FCA02, FCA01 et FCA06, FCA00, FCA03 et FCA04, FCA05.

La comparaison des profils obtenus avec les différentes fibres nous permet de tirer quelques conclusions. Tout d'abord, la fibre elle-même, c'est-à-dire non imprégnée, peut avoir des propriétés bactéricides (cas de FCA00). Cette activité est probablement liée aux propriétés catalytiques des fibres de carbone activé. Mais il est à noter que le précurseur et le procédé de fabrication du média ont leur importance puisque FCA04 (non imprégnée) n'est pas bactéricide. FCA00 et FCA04 ne sont pas fournis par le même fabricant (Tableau 10), les précurseurs utilisés et le mode de fabrication sont des facteurs très importants pour les propriétés catalytiques et d'adsorption des médias (CHERET, 1996 ; NIMALI, 1996 ; OSMOND, 2000), or ce sont des données qui ne sont pas en notre possession (confidentialité des procédés de fabrication), nous ne pourrions donc pas préjuger quant à l'élément déterminant à l'obtention de l'activité bactéricide entre FCA00 et FCA04.

Ensuite, la comparaison des effets décontaminants de FCA00, FCA01, FCA02 et FCA03 permet de dire que la nature du composé imprégné ainsi que sa teneur sont importantes. Ces quatre tissus sont fournis par la même société (CCI), FCA00 est non imprégnée, FCA01 est imprégnée de 0,05 % d'argent, FCA03 de 12 % de cuivre et FCA02 est imprégnée de ces deux métaux dans des proportions équivalentes (0,05 % d'argent et 12,5 % de cuivre).

Les capacités de décontamination de FCA01 et FCA02 sont proches, une analyse statistique permet de comparer les capacités de décontamination et permet donc d'évaluer l'importance de l'imprégnation au cuivre. L'imprégnation de cuivre n'améliore en rien les propriétés bactéricides puisque les activités de FCA01 et FCA02 sont statistiquement identiques (test de Kruskal-Wallis, $n=11$, $p>0,4$). L'imprégnation en cuivre peut même être néfaste à l'activité de la FCA. FCA00 et FCA03 proviennent du même fournisseur ; par conséquent une activité minimale similaire à celle observée pour FCA00 aurait pu être attendue alors qu'en réalité FCA03 est quasi-inactive.

Enfin, les meilleurs résultats de décontamination sont obtenus avec les fibres imprégnées d'argent (FCA01, FCA02 et FCA06) ce qui indique très clairement que l'imprégnation à l'argent permet d'obtenir une activité bactéricide importante.

Concernant les phénomènes mis en jeu lors de la décontamination de la suspension bactérienne par le dispositif pourvu d'une FCA, il apparaît clairement que la filtration ne peut pas expliquer les résultats observés. En effet, la décroissance de la concentration bactérienne

est plus rapide pour certaines FCA (FCA01, FCA02 et FCA06) que pour le témoin de filtration. L'insertion des cellules dans les pores de la fibre de carbone est peu probable car la taille des pores est de l'ordre du nanomètre et la taille d'une bactérie est de l'ordre du micromètre. La bactérie a ainsi peu de chance d'être piégée. Si un phénomène d'adsorption significatif des bactéries à la surface des FCA existait, tous les tissus généreraient une diminution nette du nombre de cellules or un tissu comme FCA05 n'engendre aucune diminution de la charge bactérienne. Enfin, le temps de contact entre les FCA01 et FCA02 et les bactéries (environ 2 secondes) ne semble pas capable de générer un tel effet bactéricide. GEORGE et DAVIES (1988) obtiennent une diminution de 2 unités log après 30 minutes de contact, sans circulation, entre 0,8 g de FCA et une suspension bactérienne ajustée à une concentration de 10^7 cellules.mL⁻¹. Les deux disques de FCA, placés dans le réacteur statique, correspondent à un poids de FCA de 0,5 g et une décroissance totale de 6 unités log est obtenue après 16 ou 32 minutes de circulation sur les échantillons de FCA02 et FCA01. Les conditions expérimentales sont certes différentes mais moins propices à un phénomène d'adsorption que celles réalisées par GEORGE et DAVIES.

De plus, le fait que les bactéries soient incapables de se revivifier avant même qu'elles soient rentrer en contact avec les FCA suggère la libération de substances germicides dans la suspension au cours de la circulation. Ces substances pourraient être des composés initialement fixés sur la fibre qui seraient par la suite relargués (cela peut être le cas des métaux imprégnés) ou des substances qui seraient générées au niveau de la fibre puis libérées dans la suspension.

Lors des tests réalisés précédemment, les cellules ont perdu leur capacité à reformer des colonies sur milieux nutritifs. Cette perte de capacité peut être due à un effet bactéricide, c'est-à-dire un état de létalité, ou à un effet bactériostatique, c'est-à-dire un état d'inhibition de leur croissance qui fait qu'elles sont alors viables mais non cultivables. Afin de confronter les résultats obtenus avec les techniques de revivification et de confirmer que les cellules sont inaptes à se revivifier, l'état physiologique de la population cellulaire a été évalué par dosage d'ATP intracellulaire.

Le test est réalisé sur une suspension d'*E. coli* qui a circulé 64 minutes sur le dispositif pourvu de FCA01. Un témoin est réalisé parallèlement avec une suspension de cette même

souche dans l'eau distillée (sans circulation puisque le contrôle présenté (Figure 16) montre que la circulation n'a pas d'effet néfaste sur les bactéries).

La quantité d'ATP intracellulaire du témoin ne varie pas au cours des 64 minutes ce qui témoigne que l'intégrité membranaire des bactéries est intacte dans la suspension tout au long de la manipulation (Figure 18). Au contraire, celle de l'essai chute fortement en début de manipulation pour devenir nulle après 16 minutes de circulation. Ce résultat montre que les bactéries après circulation dans le dispositif pourvu de FCA01 perdent leur intégrité membranaire rapidement, ce qui indique que l'inaptitude des bactéries à se revivifier sur milieu solide est bien due à un effet bactéricide de FCA01 et non pas à un effet bactériostatique.

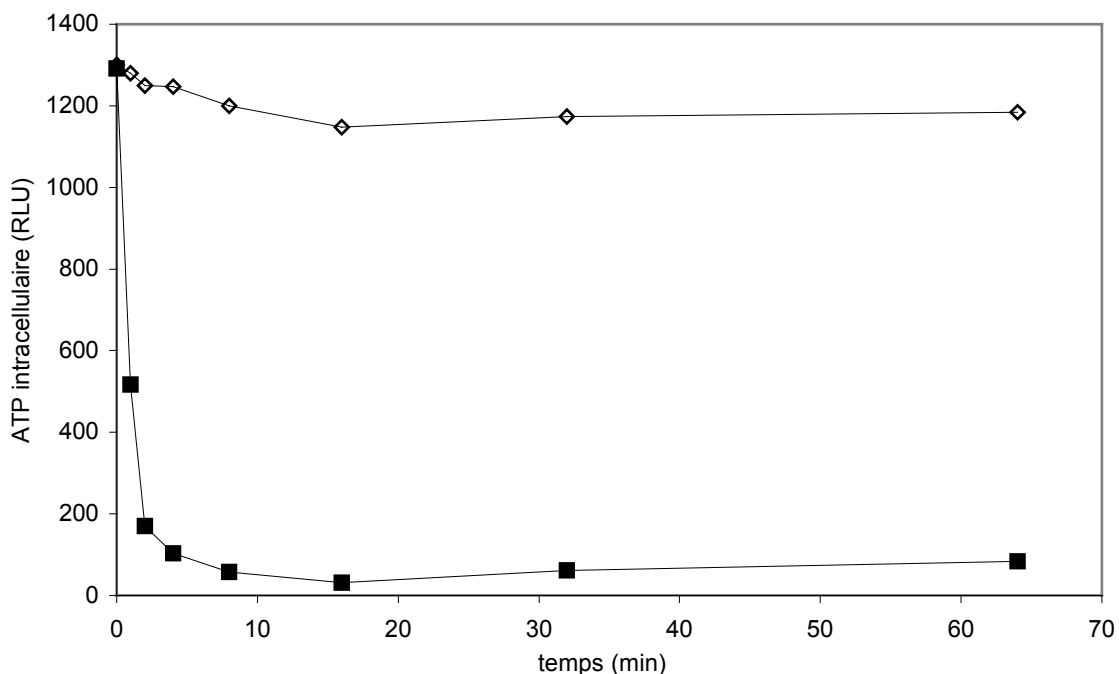


Figure 18 : Evaluation de la quantité d'ATP intracellulaire au cours du temps d'une suspension d'*E. coli* circulant (■) ou non (◇) sur le dispositif pourvu de FCA01.

La courbe relative à la suspension mise en circulation (■) résulte d'une expérimentation.

1.1.2 Activité de FCA01 contre plusieurs types de microorganismes

FCA01 a été par la suite sélectionnée en raison de son fort pouvoir antibactérien démontré précédemment vis-à-vis d'*E. coli* (de façon préférentielle à FCA02 car les activités bactéricides sont statistiquement identiques, nous avons donc choisi la FCA imprégnée d'un

seul métal). FCA06 montrait les mêmes propriétés bactéricides mais avec un temps de contact 10 fois supérieur.

Comme il a été montré Figure 17, FCA01 permet l'élimination totale des bactéries *E. coli*, bacille à Gram négatif, après seulement 32 minutes de circulation dans le dispositif. Le même test a été effectué avec d'autres souches de microorganismes afin de déterminer le spectre d'action antimicrobienne de FCA01.

I.1.2.1 Bactéries

Dans un premier temps l'efficacité bactéricide de FCA01 est testée, en plus de la souche d'*E. coli*, sur quatre autres souches bactériennes. Elles ont été choisies en raison de la diversité de leurs caractéristiques biochimiques et physiologiques.

- *M. luteus* est un cocci à Gram positif présente dans l'air.
- *B. subtilis* est un bacille à Gram positif qui a la particularité de sporuler lorsque les conditions extérieures sont défavorables.
- *K. oxytoca*, une entérobactérie, bacille à Gram négatif qui peut être responsable d'infections chez l'Homme. Cette souche a la particularité d'être multirésistante (communication personnelle Philippe CHAZAL) à certains métaux lourds dont l'argent.
- *L. pneumophila*, bacille à Gram négatif, pouvant être pathogène quand elle est transmise sous forme de micro-gouttelettes contaminées aérosolisées. Elle peut être trouvée dans des circuits d'eau chaude sanitaire ou dans des systèmes de climatisation.

Les résultats (Figure 19) montrent que toutes ces souches bactériennes sont sensibles à l'activité bactéricide de FCA01. En effet, quelle que soit la souche, une décroissance de la concentration cellulaire est observée. Les sensibilités sont cependant différentes. Une élimination totale de la suspension d'*E. coli* est obtenue après 32 minutes de circulation soit environ 6 unités log. Les quatre autres souches semblent moins sensibles puisque les décroissances des concentrations pour *M. luteus*, *K. oxytoca*, *B. subtilis* et *L. pneumophila* sont respectivement de 1,14 – 2,27 – 3,06 et 6 unités log. En ce qui concerne la

décontamination de *L. pneumophila*, la décroissance en terme de diminution d'unités log est identique à celle d'*E. coli* avec cependant une concentration de départ plus élevée (environ 10^7 cellules.mL⁻¹); ceci peut expliquer que la décontamination obtenue ne soit pas totale après 64 minutes de circulation. De plus l'activité bactéricide de FCA01 peut être entravée par la capacité de *L. pneumophila* à filamenter et, sous forme d'agrégats en milieu aqueux, les légionnelles sont mieux protégées (KIM et coll., 2002). En ce qui concerne *M. luteus* et *B. subtilis*, la différence de sensibilité pourrait être expliquée par le fait que ce sont des bactéries à Gram positif. De part leur composition biochimique membranaire, elles peuvent être plus résistantes que les bactéries à Gram négatif au traitement décontaminant appliqué dans ce cas. Enfin, *K. oxytoca* est la souche la moins sensible à l'activité bactéricide de FCA01. Sa moindre sensibilité pourrait être expliquée par son caractère multirésistant.

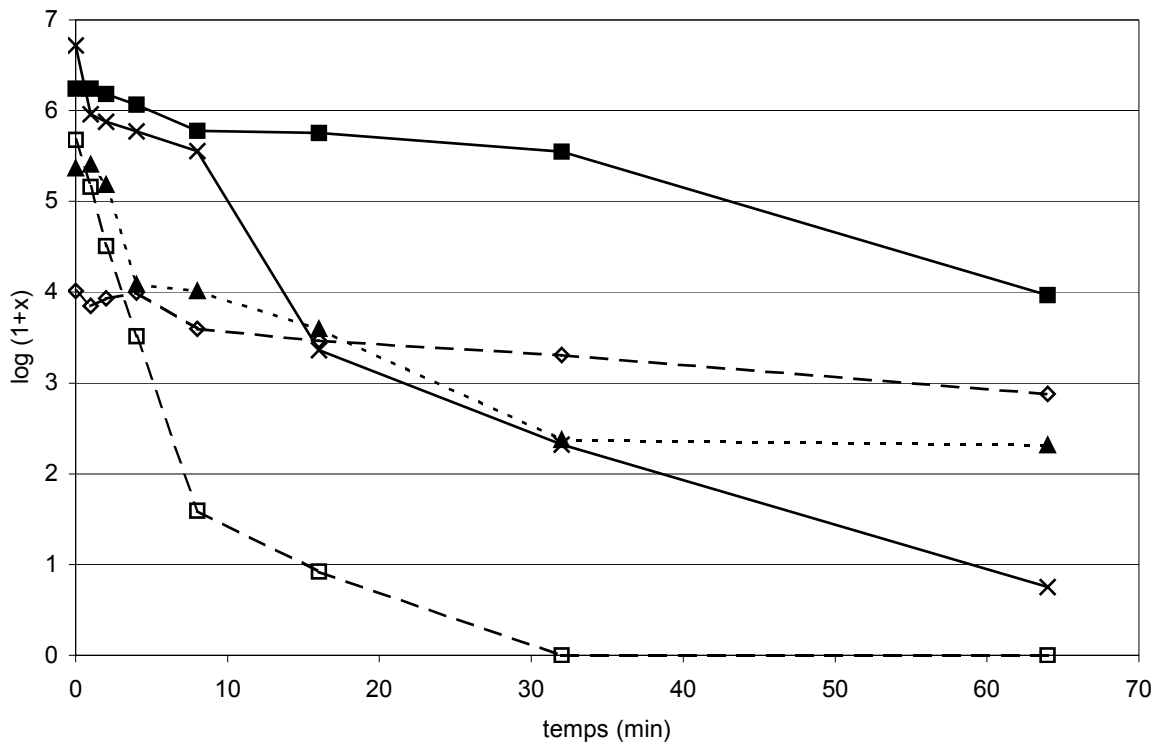


Figure 19 : Activité bactéricide de FCA01 vis-à-vis d'*E. coli* (□), *M. luteus* (◇), *K. oxytoca* (■), *B. subtilis* (▲) et *L. pneumophila* (×). X représente le nombre d'UFC.mL⁻¹ et chaque courbe est le résultat d'au moins 3 expérimentations.

I.1.2.2 Levures

L'efficacité antimicrobienne de FCA01 a ensuite été testée vis-à-vis de deux souches de levures : *S. cerevisiae* et *P. pastoris*. Ce sont des microorganismes de diamètre plus gros que les bactéries (5 à 8 μm) et totalement différents du point de vue des caractéristiques biochimiques et physicochimiques.

Pour *S. cerevisiae*, deux concentrations ont été testées : 10^3 et 10^5 cellules.mL⁻¹. En ce qui concerne *P. pastoris*, la décontamination de trois suspensions dont la concentration variait de 10^3 à 10^5 levures.mL⁻¹ a été évaluée. Nous avons tenté de voir si l'effet décontaminant est dépendant de la concentration en cellules.

La capacité décontaminante de FCA01 vis-à-vis de *S. cerevisiae* n'est pas observable pour toutes les concentrations utilisées (Figure 20). La concentration en levures reste constante lorsque celle-ci est ajustée à 10^5 cellules.mL⁻¹, alors que lorsqu'elle est ajustée à 10^3 cellules.mL⁻¹, une décontamination totale est obtenue après 32 minutes.

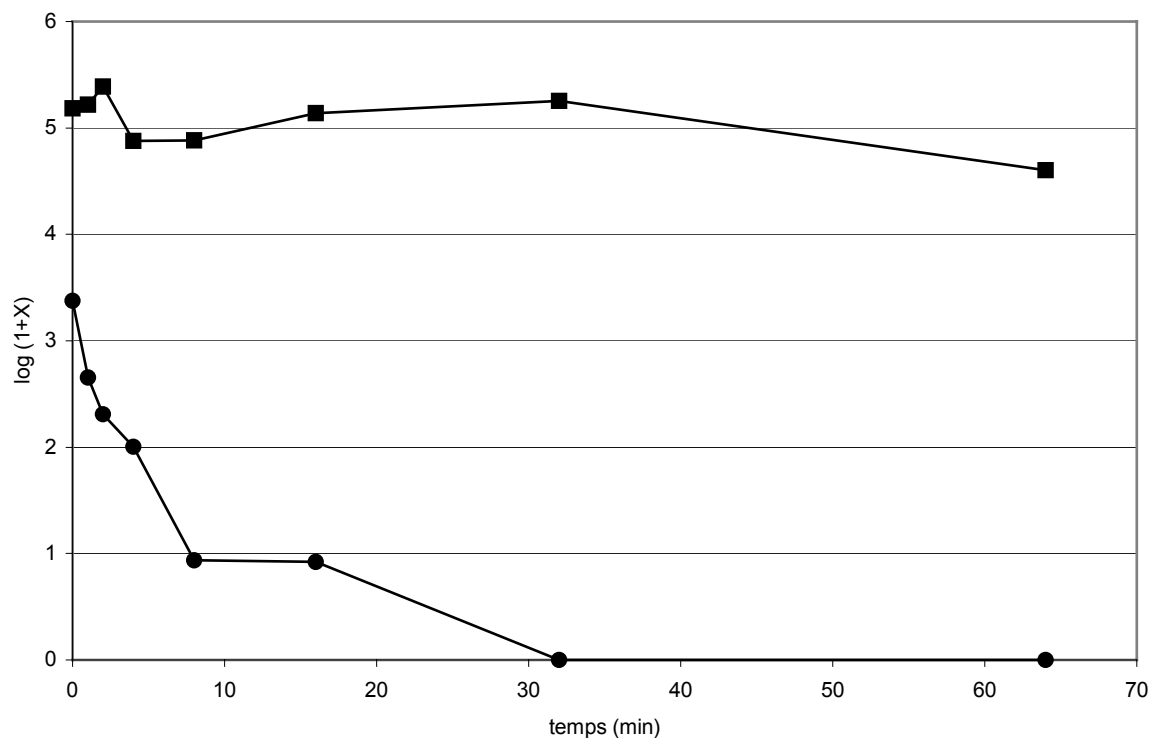


Figure 20 : Activité germicide de FCA01 vis-à-vis de *S. cerevisiae*, sur une suspension ajustée à 10^3 (●) ou 10^5 (■) UFC.mL⁻¹. X représente le nombre d'UFC.mL⁻¹ et chaque courbe est le résultat d'une moyenne d'au moins 3 expérimentations.

Les observations sont les mêmes en ce qui concerne les tests d'activité germicide de FCA01 vis-à-vis de *P. pastoris* (Figure 21). Avec une concentration de départ de 10^5 levures.mL⁻¹ aucune décroissance n'est observée, lorsque celle-ci est diminuée à 10^4 levures.mL⁻¹ l'élimination est quasi-totale après 64 minutes (3,8 unités log) et enfin, à 10^3 cellules.mL⁻¹ une élimination totale de *P. pastoris* après 64 minutes de circulation est observée. Les vitesses de décroissance de ces deux dernières manipulations sont semblables, nous pouvons émettre l'hypothèse qu'avec un temps de circulation plus long nous aurions observé une totale décontamination avec 10^4 levures.mL⁻¹.

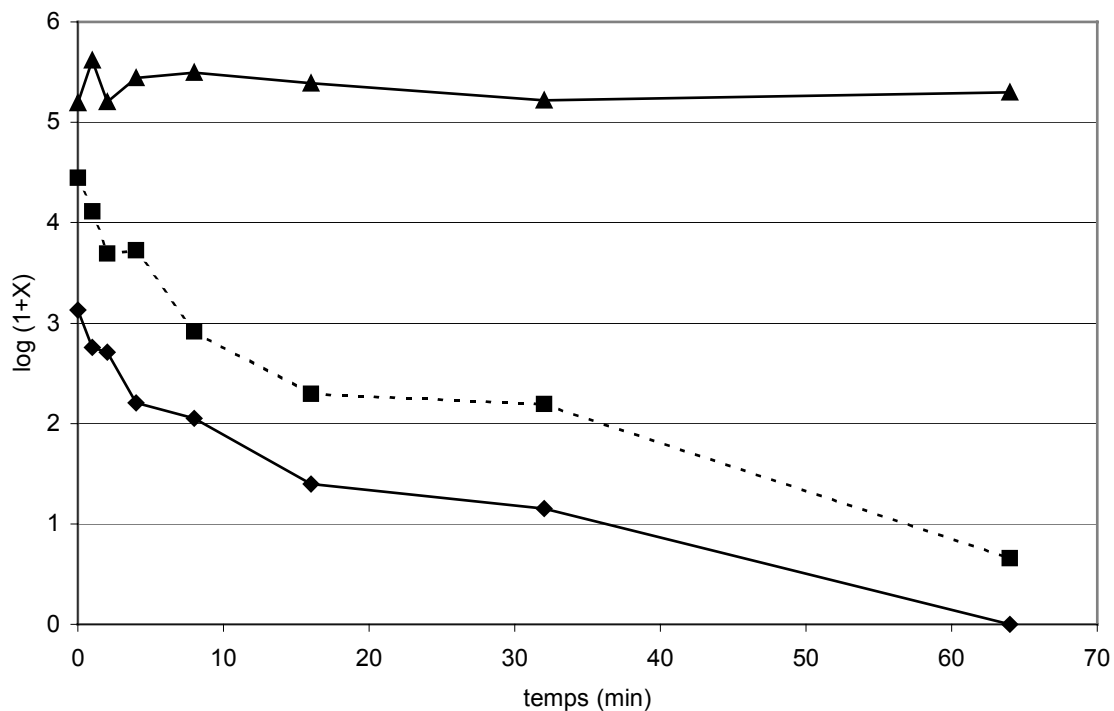


Figure 21 : Activité germicide de FCA01 vis-à-vis de *P. pastoris*, sur une suspension ajustée à 10^3 (◆), 10^4 (■) ou 10^5 (▲) UFC.mL⁻¹. X représente le nombre d'UFC.mL⁻¹ et chaque courbe est le résultat d'une moyenne de deux expérimentations.

Que ce soit vis-à-vis de *S. cerevisiae* ou vis-à-vis de *P. pastoris* l'activité germicide de FCA01 est dépendante de la concentration initiale en cellules de la suspension. Il existe par conséquent une concentration seuil au-dessus de laquelle, dans les conditions expérimentales utilisées, FCA01 n'a pas d'effet ou un effet germicide partiel.

1.1.2.3 Champignons

Les derniers types cellulaires étudiés sont des souches de champignons. Ce sont des champignons microscopiques qui ont la capacité de former des spores facilement mis en suspension dans l'air. Les capacités germicides de FCA01 ont été testées sur trois souches de champignons : *C. globosum*, *A. versicolor* et *P. funiculosum*. Leur choix est dicté par le fait qu'elles intègrent la norme européenne pour tous les tests de susceptibilité des matériaux aux champignons (norme EUROCAE ED-14D/RTCA DO-160D-section 13, 1998). Les tests de germicidie sont réalisés sur des suspensions ajustées à 10^5 cellules.mL⁻¹ ; les temps de circulation ont été rallongés à 128 minutes. Les résultats (Figure 22) montrent que comme pour les bactéries et les levures, la sensibilité des champignons à l'action de FCA01 dépend de la souche étudiée. Les résultats montrent une décroissance en cellules quelle que soit la souche de moisissure testée. Les diminutions en concentration sont respectivement de 2,5 – 1,4 et 2 unités log respectivement pour les souches d'*A. versicolor*, *P. funiculosum* et *C. globosum* après 128 minutes de circulation. Un test (résultat non présenté) a été réalisé avec la souche de *C. globosum* ajustée à 10^3 cellules.mL⁻¹ pour lequel la vitesse de décroissance est beaucoup plus rapide. Il semblerait là aussi que l'efficacité fongicide soit également dépendante de la concentration en cellules.

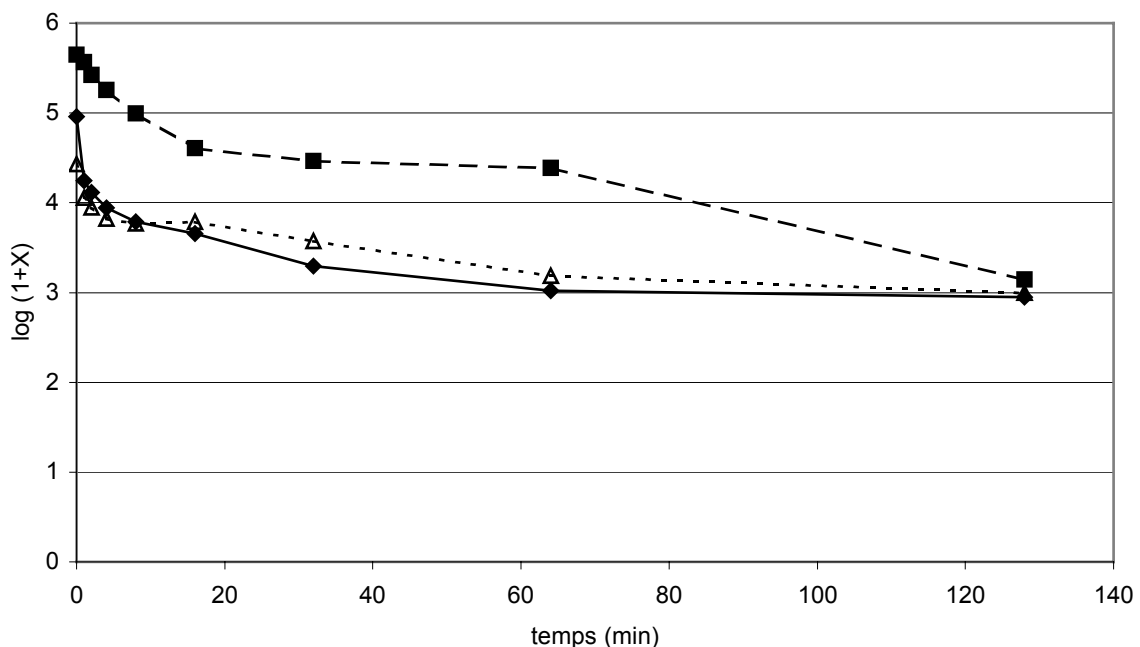


Figure 22 : Activité fongicide de FCA01 vis-à-vis de *C. globosum* (◆), *A. versicolor* (■) et *P. funiculosum* (Δ).

X représente le nombre d'UFC.mL⁻¹ et chaque courbe est le résultat d'une moyenne d'au moins 3 expérimentations.

I.1.2.4 Conclusion

FCA01 a un large spectre d'action antimicrobienne. En effet, les cinq souches de bactéries, deux souches de levures et trois souches de champignons sont sensibles à son activité antimicrobienne. Nous pouvons de plus conclure, pour les levures, que l'efficacité est dépendante de la concentration initiale de la suspension en microorganismes et du temps d'action. Il faut cependant préciser qu'en ce qui concerne tous les tests, les concentrations en cellules utilisées sont supérieures à celles qui sont mesurées en environnement naturel ce qui pourrait laisser présager d'une meilleure efficacité pour des applications en conditions réelles.

Les propriétés de décontamination de FCA(Ag) ou de matériaux similaires tels que de la zéolite imprégnée d'argent ou de poudres d'oxydes métalliques, ont toujours été montré contre deux principales souches de bactéries, *E. coli* et *S. aureus* (INOUE et KANZAKI, 1997 ; SAWAI et coll., 1995 ; LI C.Y. et coll., 1998 ; OYA et coll., 1993a ; OYA et coll., 1993b ; OYA et coll., 1993c ; OYA et coll., 1994 ; TAMAI et coll., 2001) et dans quelques cas contre *B. subtilis* (SAWAI et coll., 1995 ; TAMAI et coll., 2001). Les propriétés germicides de tels médias n'ont pas été évaluées contre d'autres types cellulaires tels que des levures ou des champignons. Ces expérimentations nous ont permis de mettre en évidence un spectre d'action germicide beaucoup plus large avec les FCA imprégnées de métaux (en particulier à l'argent) qu'avec d'autres supports similaires.

I.1.3 Evolution temporelle de l'activité germicide

L'évolution temporelle de l'activité germicide de FCA01 a été observée de deux façons, après un vieillissement naturel de FCA01 au contact de l'air, et après un vieillissement « forcé » où un échantillon de FCA01 est utilisé continuellement pendant plusieurs jours.

I.1.3.1 Vieillissement naturel

Les résultats présentés ci-dessous ont été observés de façon temporelle au fur et à mesure de l'avance des expérimentations effectuées avec FCA01. Ils correspondent à des décroissances bactériennes obtenues après un vieillissement naturel de FCA01, stockée sans précaution particulière dans le laboratoire. Les études effectuées avec les FCA ont été réalisées avec un même lot de tissu fourni par le fabricant, sur un laps de temps assez long

(supérieur à 18 mois). Les tests sont réalisés en circuit fermé selon les mêmes conditions expérimentales que celles suivies précédemment (Partie 2 - II.1).

Au cours du temps, une baisse progressive de l'activité bactéricide de FCA01 a été observée (Figure 23). Au début des expérimentations, en février 2000, pris comme période initiale de référence, une décontamination totale était obtenue après 32 minutes de circulation ; les propriétés de décontamination sont identiques 4 mois après. Neuf mois plus tard, la diminution de la concentration en bactéries n'est plus que de 3 unités log après 64 minutes de circulation, et 21 mois après une décroissance de seulement 2 unités log est observée.

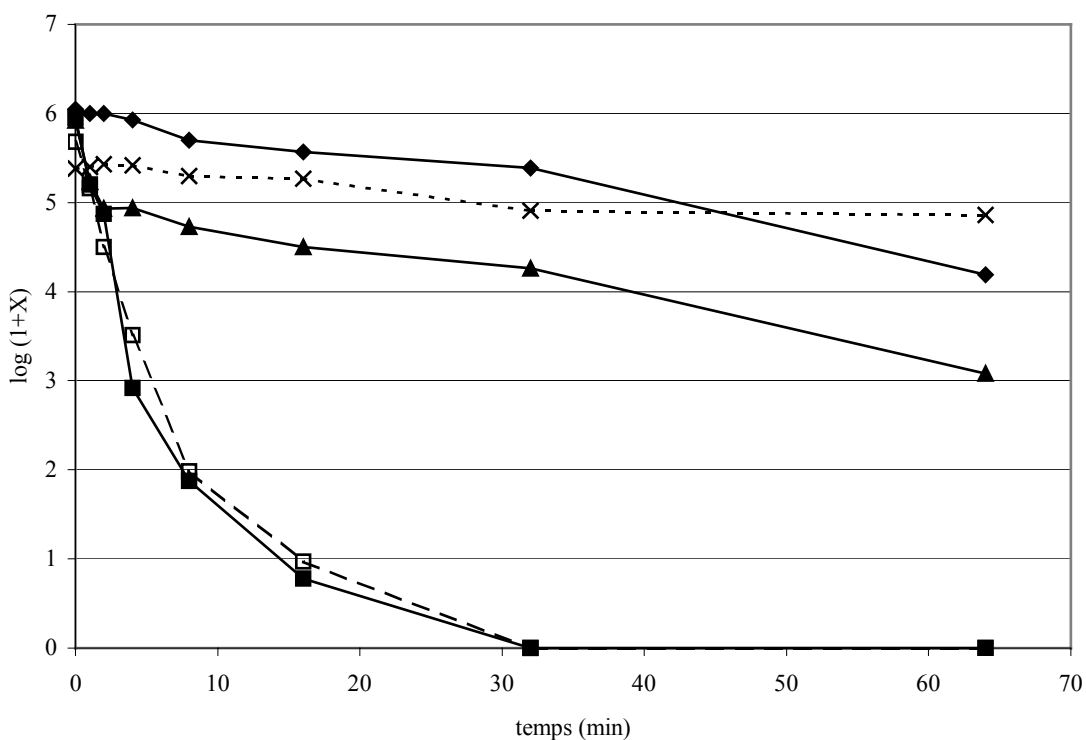


Figure 23 : Evolution chronologique de l'efficacité bactéricide de FCA01 vis-à-vis d'*E. coli* à réception du lot initial de FCA (□), après 4 mois (■), après 9 mois (▲), après 19 mois (×) et après 21 mois (◆).

X représente le nombre d'UFC.mL⁻¹, la courbe relative au lot initial est le résultat d'une moyenne de 3 expérimentations et les autres courbes représentent le résultat d'une expérimentation.

Au vu de ces résultats, on peut conclure que l'activité de la FCA diminue au cours du temps et qu'il se produit un phénomène de vieillissement intrinsèque de la FCA. La FCA peut avoir adsorbé des polluants organiques présents dans le local de stockage (ce qui entraîne une saturation des sites de surface) ou bien il peut s'être formé des oxydes d'argent au contact de

l'air (COLLONGUES, 1957), le résultat étant la perte des propriétés bactéricides et/ou catalytiques. Des études ultérieures de régénération et de lavage ont été effectuées afin de voir s'il était possible de remédier à ce phénomène. Ces résultats montrent toutefois que les conditions de stockage des FCA sont primordiales quant au maintien de leur activité germicide (à l'abri de l'air et des rayonnements UV).

Des tentatives de régénération ont été réalisées. Un nettoyage à l'eau à 100°C, puis un chauffage au four à 500°C pendant 24 à 48 heures, connus pour désorber les composés organiques (BERNARD, société Techsilab, communication personnelle), n'ont pas amélioré l'effet bactéricide de FCA01. D'autres techniques telles que la régénération *in situ* par effet Joule pourrait être envisagée, pour désorber les molécules adsorbées en surface des FCA grâce à l'application d'un courant électrique sur le média (SUBRENAT et coll., 2001).

L'argent imprégné n'est actif que sous forme Ag^+ . Ag^0 ou des oxydes d'argent n'ont pas de pouvoir bactéricide pour le premier, ou pas de pouvoir catalytique pour les seconds (COLLONGUES, 1957). INOUE et KANZAKI (1997) ont montré que l'activité bactérienne avec une zéolite imprégnée d'argent n'est plus observée lorsque le degré d'oxydation passe de +1 à 0. Or il est connu que la FCA de part ses propriétés chimiques de surface est capable de réduire des composés tels que Pt(IV) à un niveau de valence plus faible et Pd(II), Ag(I) et Au(III) en éléments métalliques (CHEN et ZENG, 2003).

1.1.3.2 Vieillessement accéléré

Un test de vieillissement accéléré a été effectué avec un échantillon de FCA01 inséré dans R1 sur lequel une suspension bactérienne circule pendant quatre jours. Le circuit en boucle fermée fonctionne en continu et la suspension bactérienne est renouvelée tous les jours.

Au fil des jours une baisse progressive et régulière des propriétés décontaminantes de FCA01 est observée (Figure 24). Les pentes des courbes de décroissance sont de plus en plus faibles au cours du temps. En effet, le premier jour une décroissance totale est obtenue après un peu plus de 3 heures de circulation, le deuxième et le troisième jour il faut attendre plus de 18 heures pour observer ce même effet. Enfin, le quatrième jour, il semblerait au vu du profil de décroissance que le temps pour obtenir une décroissance totale soit encore plus long. Les temps nécessaires à l'obtention d'une décontamination totale de la suspension bactérienne

sont cependant surestimés, pour les deuxième et troisième jours, car entre 3 et 18 heures de circulation aucun prélèvement n'a été effectué (pour des raisons pratiques). Il n'est donc pas possible dans ces conditions expérimentales d'évaluer de façon exacte le temps de circulation après lequel la décontamination est complète.

Ces tests ont été réalisés avec un échantillon de FCA01 stocké à l'air libre plusieurs mois dans le laboratoire, ce qui explique qu'au premier jour la décroissance est obtenue au bout de 3 heures et non pas après 32 minutes de circulation comme c'était le cas avec un tissu fraîchement fabriqué (Figure 23).

Au vu de ces résultats et dans les conditions expérimentales utilisées, nous pouvons supposer que l'effet bactéricide deviendra progressivement inexistant. Plusieurs hypothèses peuvent être émises pour expliquer cette perte progressive d'efficacité : une élution progressive de l'argent ou une saturation de la FCA par les débris bactériens (matière organique) présents en solution.

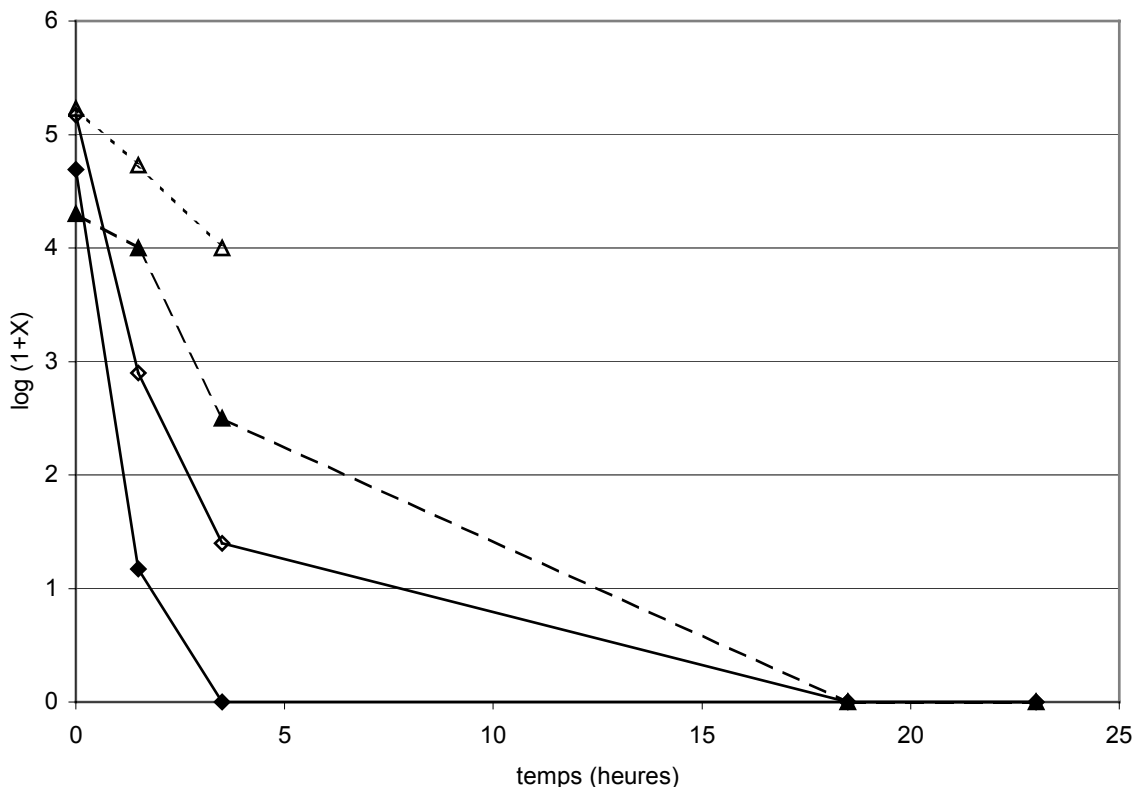


Figure 24 : Evolution temporelle, en condition de vieillissement accéléré, de l'activité bactéricide de FCA01 vis-à-vis d'*E. coli* au premier (\blacklozenge), deuxième (\diamond), troisième (\blacktriangle) et quatrième jour (\triangle). X représente le nombre d'UFC.mL⁻¹ et l'ensemble des courbes est le résultat d'une expérimentation.

I.1.4 Caractérisation des FCA montrant les meilleures propriétés bactéricides

Les deux tissus imprégnés d'argent, FCA01 et FCA06, montrant une forte activité bactéricide, ont été caractérisés par Microscopie Electronique à Balayage. Ces analyses ont pour but de déterminer les compositions élémentaires de ces médias.

I.1.4.1 Analyses au MEB

L'observation microscopique permet de visualiser l'armure du tissu FCA01, c'est-à-dire la façon dont sont arrangées les fibres, et les aspects des fibres de FCA01 et FCA06. Le MEB permet d'observer de façon détaillée les fibres et en particulier d'estimer leur diamètre approximatif. D'après les photos prises au MEB (Figure 25 et Figure 26) le diamètre des tissus FCA01 et FCA06 se situe entre 10 et 20 μm . Les fibres ont un aspect nervuré qui est caractéristique des fibres de viscose (LORD, 1955). Au grossissement ($\times 300$) auquel ont été réalisées ces analyses, la microporosité ne peut cependant pas être observée.

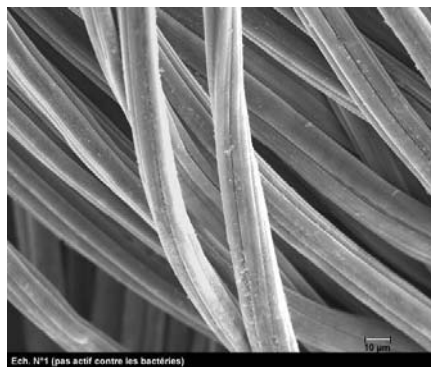


Figure 25 : Photos au MEB de FCA01 ($\times 300$).

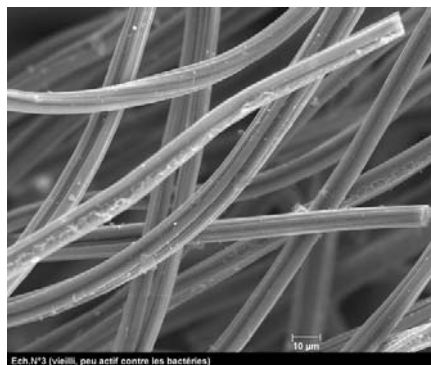


Figure 26 : Photos au MEB de FCA06 ($\times 300$).

Les analyses au MEB permettent aussi d'apprécier la composition chimique des FCA. Les études ont été réalisées sur FCA01 et FCA06 avant et après utilisation.

A partir du spectre de composition chimique générale de FCA01 (Figure 27) nous notons la présence de plusieurs pics. Le pic dominant est celui du carbone, composant principal du tissu, nous pouvons également voir la présence du sodium qui provient des résidus issus du tissu précurseur qui, en outre, est la viscose. Les autres pics observables correspondent à ceux de l'aluminium et du zinc, ce sont deux composés qui entrent en jeu lors de la fabrication de la FCA, ils proviennent très probablement de deux acides de Lewis, $AlCl_3$ et $ZnCl_2$, qui sont utilisés lors de l'oxydation du matériau pendant l'étape d'activation.

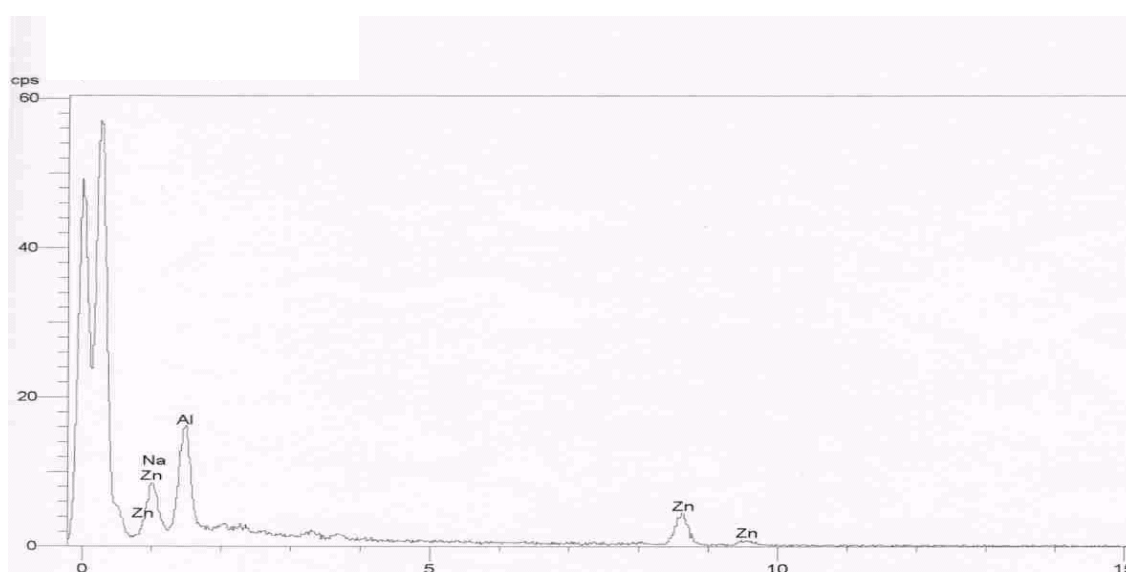


Figure 27 : Spectre de composition de FCA01.

Sur le spectre de composition de FCA06 (spectre non présenté), deux pics sont détectés. Le premier est celui du carbone et le second est celui du phosphore. Ce dernier provient vraisemblablement de l'acide phosphorique qui a été utilisé lors du processus d'oxydation de FCA06.

Pour les deux FCA, les spectres de composition chimique sont identiques avant et après utilisation. Et que ce soit pour l'une ou l'autre des FCA imprégnées de 0,05 %, il n'est pas possible de détecter l'argent. Les sondes EDAX et EDS utilisées respectivement pour

l'analyse de FCA01 et FCA06, ne détectent que les composés dont la teneur est supérieure à 1 % pour la première sonde et 0,5 % pour la seconde.

1.1.4.2 Caractérisations de surface par analyses XPS (X-ray Photoelectron Spectroscopy)

La technologie XPS, spectroscopie à électron, est utilisée pour l'analyse élémentaire de la surface de FCA01. La profondeur analysée est de 80 Å. Nous avons ainsi déterminé les compositions élémentaires et la chimie de surface de FCA01, avant et après utilisation et également après un décapage à l'argon. Dans ce dernier cas nous avons voulu voir si après avoir ôté la première couche atomique, la nature des groupements de surface restait le même. Les analyses sont focalisées sur trois atomes, carbone, oxygène et azote, qui sont les éléments principaux composant ce type de média.

Tableau 15 : Pourcentages atomiques des éléments principaux composant la surface de FCA01.

Echantillons	Carbone	Oxygène	Azote
FCA01 avant utilisation	54,24 %	38,29 %	7,47 %
FCA01 après utilisation	47,90 %	37,20 %	14,92 %
FCA01 décapée à l'argon	73,50 %	21,37 %	5,13 %

Les échantillons de FCA01 avant et après utilisation contiennent à peu près les mêmes proportions de carbone (54,24% et 47,9%) et d'oxygène (38,29% et 37,2%) ; une différence est notable quant à la quantité d'azote (Tableau 15). Avant utilisation, FCA01 contient 7,47% d'azote et après utilisation elle est composée de 14,92% d'azote. Cette différence est expliquée par le fait que la fibre vieillie a été utilisée lors d'une manipulation en anoxie, dans laquelle une saturation en azote a été réalisée afin de supprimer tout l'oxygène présent en solution. Nous pouvons également avancer l'hypothèse d'une adsorption de matière organique sous forme d'azote provenant de la dégradation des protéines bactériennes. Des atomes se sont donc « greffés » sur la fibre ce qui explique la plus grande quantité d'azote observée. Après décapage à l'argon, la teneur en carbone est plus élevée, celle de l'oxygène est moindre et enfin celle de l'azote est équivalente à celle d'un échantillon avant utilisation. Le décapage à l'argon a, sans doute, eu pour conséquence l'élimination des fonctions oxygénées situées en surface de la fibre (Tableau 16) ce qui expliquerait la diminution de la quantité en oxygène. De la même façon, l'azote issu de la manipulation en anoxie et/ou de la matière organique serait éliminée par ce décapage.

Tableau 16 : Identification des groupements de surface de FCA01.

FCA01 avant utilisation	FCA01 après utilisation	FCA01 décapée à l'argon
	C-C du graphite	C-C du graphite
C-C du graphite	OH des fonctions alcools et phénols	OH des fonctions alcools et phénols
OH des fonctions alcools et phénols	C-O-C du groupe éther	C-O-C du groupe éther
C-O-C du groupe éther	O=C-O de la fonction carboxyle	O=C-O de la fonction carboxyle
	C=O des fonctions cétone ou carboxyle	C=O des fonctions cétone ou carboxyle

Les liaisons des groupements de surface identifiées sont globalement les mêmes sur les différents tissus analysés : fonctions alcool, phénol, éther, cétone et carboxyle. Dans chaque colonne, les liaisons des groupements identifiés sont classées par ordre d'importance, de la plus présente à la moins présente. Il est logique de trouver la liaison C-C en grande quantité. La seconde est la liaison C-OH des fonctions alcools ou phénols, la troisième est la liaison C-O-C des groupes éthers, détectée en quantité équivalente à celle des groupements OH, et enfin les liaisons des fonctions O=C-O et C=O sont détectées en très petites quantités.

Toutes ces fonctions identifiées sont en accord avec ce qui est relaté dans la littérature (LI Z. et coll., 1998 ; WAN et coll., 1998 ; LEE et DAVIDSON, 1999 ; YUE et coll., 1999). Les différentes proportions des fonctions peuvent être expliquées par le fait que lors de l'étape d'oxydation le premier groupement formé est OH puis au fur et à mesure de l'oxydation se forment successivement C=O et COOH (MANGUN et coll., 1999 ; CHEN et ZENG, 2003). Cet ordre de formation des groupements de surface, peut selon le mode de fabrication de la FCA utilisée, favoriser la dominance de l'un ou l'autre des groupements. Plus l'oxydation est poussée et plus la formation des fonctions carboxyliques est importante.

I.2 Mise en évidence de la génération de substances germicides et de leur pouvoir germicide

Dans la première partie de ce travail, nous avons mis en évidence les capacités décontaminantes de FCA, et démontré que cette activité germicide était obtenue de façon très rapide et ce avant même que tous les microorganismes soient entrés en contact avec la FCA. L'hypothèse émise est qu'il y a relargage de substances germicides générées et/ou libérées

dans l'eau qui circule au travers de la FCA sur le dispositif expérimental. Ceci expliquerait le fait que les cellules soient détruites avant qu'elles ne soient toutes passées à travers la FCA.

Dans cette seconde partie, la recherche de la génération et/ou de la libération de substances germicides a été réalisée. Les expérimentations sont effectuées sur les deux FCA imprégnés de 0,05 % wt d'argent, c'est-à-dire sur FCA01 et FCA06.

I.2.1 FCA01

La capacité décontaminante d'une eau ayant circulé sur FCA01 a tout d'abord été étudiée. De l'eau distillée stérile est mise en circulation pendant 64 minutes sur FCA01. Une fois la circulation de l'eau arrêtée, la souche d'*E. coli* est immédiatementensemencée à une concentration ajustée à 10^6 cellules.mL⁻¹, ou estensemencée après un temps d'attente de 32 minutes après l'arrêt de la circulation (Tableau 11, conditions 1 et 2). La capacité de revivification des cellules est ensuite estimée. Afin de simplifier les appellations, nous nommerons l'eau ayant circulé 64 minutes sur FCA, l'eau « traitée » par FCA01.

Les résultats montrent une décroissance des concentrations en bactéries quel que soit le temps d'ensemencement des cellules (Figure 28). En ensemencant les bactéries directement après arrêt de la circulation de l'eau sur FCA01, une décroissance de 4,6 unités log est observée. En ensemencant les bactéries après un temps de latence de 32 minutes après l'arrêt de la circulation, la décroissance est de 3,7 unités log. La première constatation est que l'eau « traitée » possède bien un pouvoir bactéricide et que ce pouvoir bactéricide ne peut être attribué qu'à des substances relarguées ou générées. La deuxième constatation est que le pouvoir bactéricide de l'eau « traitée » diminue légèrement au cours du temps.

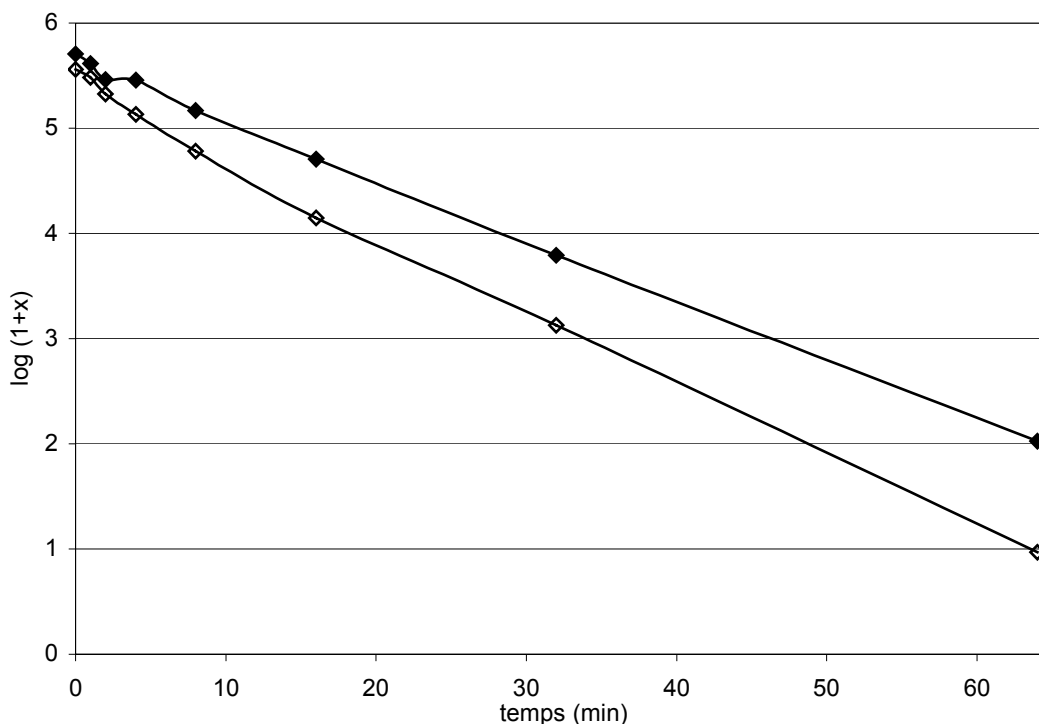


Figure 28 : Activité bactéricide vis-à-vis d'*E. coli* d'une eau « traitée » par FCA01, les bactéries sont ensemencées après 0 (◇) ou 32 minutes (◆). X représente le nombre d'UFC.mL⁻¹ et chaque courbe est le résultat d'une moyenne d'au moins 3 expérimentations.

I.2.2 FCA06

De même que précédemment, nous avons fait circuler de l'eau distillée stérile sur FCA06 dans le dispositif expérimental. Afin d'augmenter l'effet bactéricide engendré, nous avons diminué le volume utilisé, il n'est désormais plus de 500 mL mais de 250 mL. De plus, le temps de contact entre l'eau qui circule et la FCA est plus long, 24 secondes au lieu de 2 secondes et le temps de circulation est désormais de 15 minutes. Comme pour la précédente manipulation nous appellerons cette suspension eau «traitée» par FCA06. Les bactéries sont ajoutées immédiatement ou après un délai de 32 ou 64 minutes après arrêt de la circulation, à une concentration ajustée à 10⁶ cellules.mL⁻¹ (Tableau 11, conditions 3 à 5).

Comme pour FCA01, nous observons une décroissance de la concentration en bactéries quel que soit le temps après lequel les bactéries ont été ensemencées (Figure 29). Lorsque les bactéries sont additionnées tout de suite dans l'eau «traitée», la concentration

bactérienne décroît rapidement, une réduction complète est obtenue après 16 minutes de contact entre les cellules et l'eau «traitée» par FCA06. Quand les bactéries sont ajoutées après un délai de 32 ou 64 minutes après l'arrêt de la circulation de l'eau dans le dispositif, l'efficacité bactéricide est moindre. Un temps de contact de 64 minutes entre les bactéries et l'eau «traitée» est nécessaire pour obtenir des réductions de 5,5 et 5 unités log respectivement pour des ensemencements décalés dans le temps de 32 et 64 minutes.

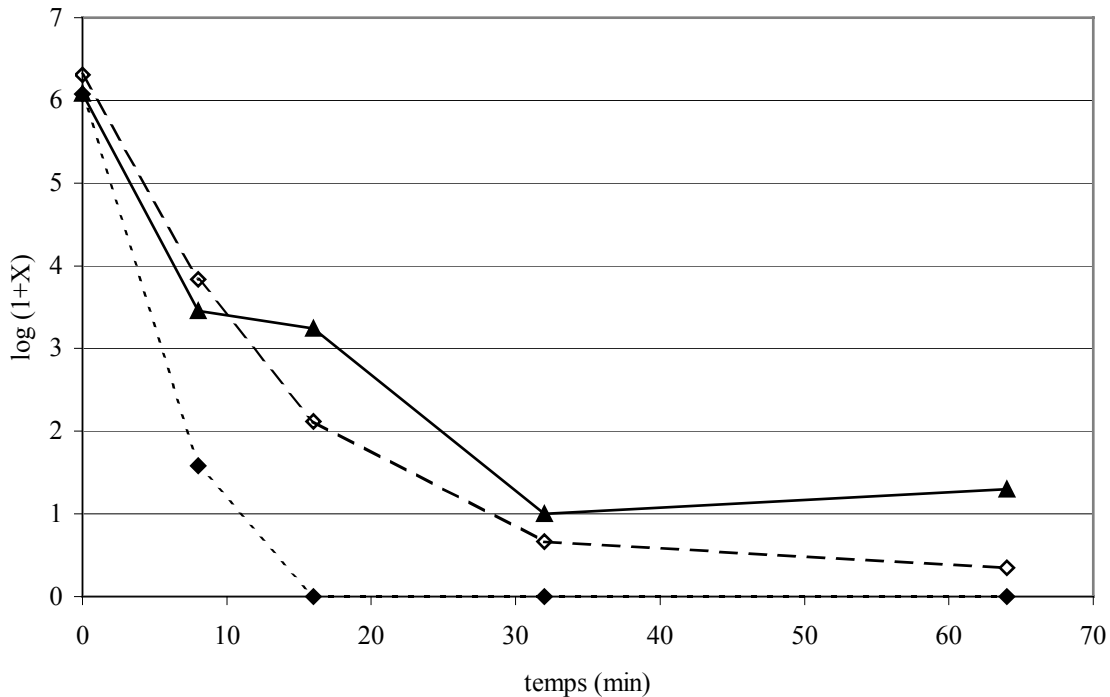


Figure 29 : Activité bactéricide vis-à-vis d'*E. coli* d'une eau «traitée» par FCA06, les bactéries sont ensemencées après 0 (◆), 32 (◇) ou 64 (▲) minutes. X représente le nombre d'UFC.mL⁻¹ et chaque courbe est le résultat d'une moyenne d'au moins 3 expérimentations.

De tels résultats, obtenus avec FCA01 et FCA06, suggèrent que des espèces bactéricides sont générées dans l'eau «traitée» et qu'elles ont des durées de vie courtes. Plus le délai pour ensemencer les cellules augmente et moins l'effet bactéricide est important.

I.2.3 Détermination par CMF de l'état physiologique des cellules traitées

Comme pour les manipulations effectuées en circuit fermé nous ne pouvons pas préjuger de l'état physiologique des cellules ayant été en contact avec de l'eau « traitée ». Les analyses par CMF vont nous permettre d'estimer l'impact d'un tel traitement. 250 mL d'eau distillée stérile ont été mis en circulation dans le dispositif pourvu de FCA06 pendant 15 minutes. Des bactéries *E. coli* ont ensuite été immédiatementensemencées, dans cette eau en dehors du système de circulation, à une concentration initiale ajustée à 10^6 cellules.mL⁻¹. Des prélèvements ont été réalisés à 0, 4, 8, 16 et 32 minutes puis marqués à l'IP et analysés par CMF. Ces analyses nous permettent de suivre l'intégrité membranaire des cellules.

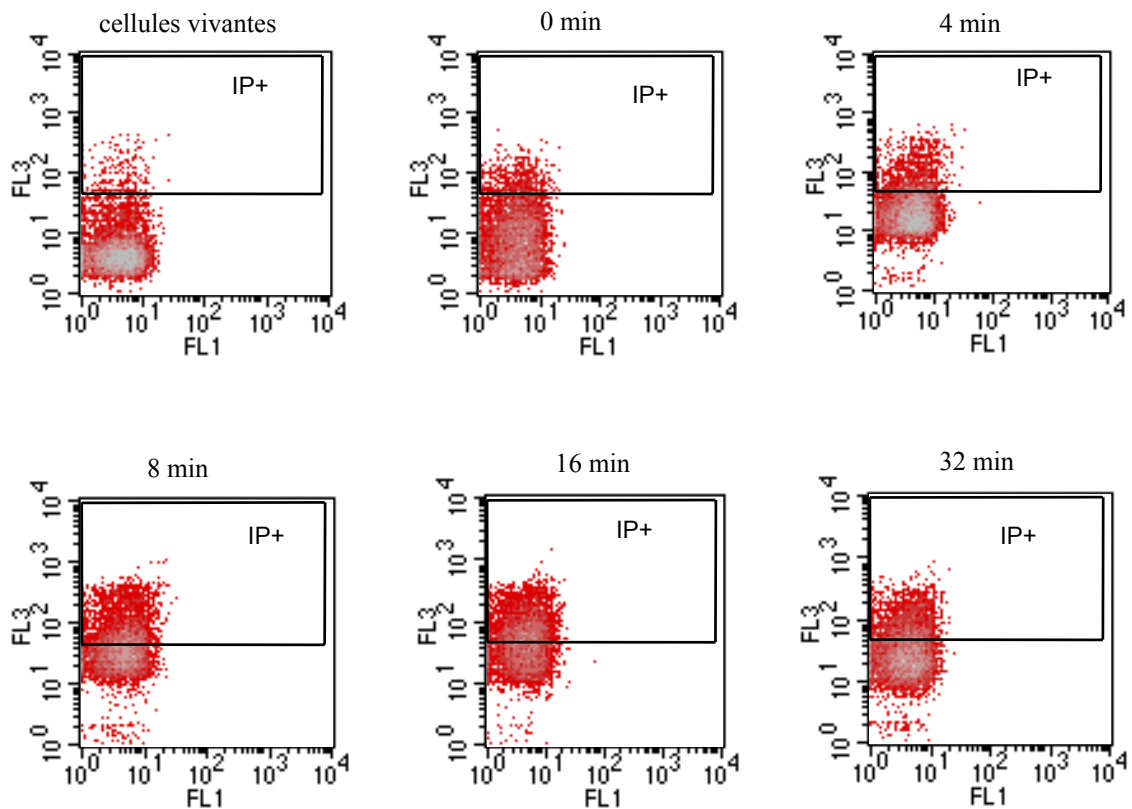


Figure 30 : Analyse de l'intégrité membranaire par CMF d'une population de cellules vivantes et de cellules ayant été en contact 0, 4, 8, 16 et 32 minutes avec de l'eau « traitée » par FCA06.

Tableau 17 : Pourcentages de cellules ayant incorporé l'IP (fenêtre IP+).

Echantillons	Pourcentages de Cellules IP+ (%)
témoin cellules vivantes	3
0 min	9
4 min	19
8 min	44
16 min	54
32 min	30

Les cytogrammes obtenus (Figure 30) nous donnent des indications plus qualitatives que quantitatives. Le pourcentage de cellules dénombré dans la fenêtre regroupant les événements IP+ est déterminé par rapport au nombre total d'évènements détectés par le cytomètre, donc toutes les cellules déjà mortes et réduites à l'état de débris cellulaires n'ont pas été prises en compte dans ce pourcentage. Cette particularité analytique fait que le pourcentage de cellules aux caractéristiques morphologiques normales, mais dont l'intégrité membranaire est modifiée, ne représente pas la réalité par rapport à la population initiale totale. Seule la tendance de l'évolution physiologique de la population bactérienne peut être évoquée.

Le nombre de cellules intégrant l'IP ne cesse d'augmenter avec l'augmentation des temps de contact (Tableau 17). Dès leur ensemencement dans la solution, 3 % des bactéries incorporent l'IP. Cette proportion de cellules endommagées augmente au cours du temps jusqu'à 16 minutes (respectivement 9, 19, 44 et 54 %). Ensuite, à 32 minutes, le pourcentage n'est que d'environ 30 %. Ce dernier pourcentage, plus faible que les précédents, ne veut pas obligatoirement dire que les bactéries de la suspension sont moins endommagées à 32 minutes qu'à 16 minutes de temps de contact entre les cellules et l'eau « traitée ». Le calcul du pourcentage à 32 minutes a sans aucun doute été fait sur une population où, la majeure partie des cellules ayant incorporé l'IP jusqu'au temps 16 minutes et comptabilisé dans la fenêtre IP+ sont désormais passés à l'état de débris.

Ces résultats confirment donc les observations concernant les dénombrements d'UFC réalisés dans les mêmes conditions expérimentales (Figure 29). Les analyses faites par CMF montrent que les cellules ont subi de graves dommages au niveau des membranes cellulaires

puisque le pourcentage de cellules fortement marquées à l'IP ne cesse d'augmenter. Il est également à noter que les dommages apparaissent de façon très rapide car après 4 minutes de contact entre les cellules et l'eau « traitée » par FCA06, un fort pourcentage d'entre elles incorporent l'IP.

II ANALYSES DES MECANISMES DE BACTERICIDIE

II.1 Implication de l'argent

Les résultats concernant les mesures d'activité bactéricide réalisées en première partie indiquent clairement une implication de l'argent. Les fibres les plus actives sont FCA01 et FCA06 qui sont imprégnées de 0,05 % d'argent. Les effets bactéricides observés pourraient provenir d'une libération d'argent en solution. C'est pourquoi, dans un premier temps, des dosages d'argent libéré dans la suspension au cours du temps ont été réalisés. Ces expérimentations ont pour but de doser la quantité d'argent maximale relarguée en solution et de reconstituer ensuite des solutions aux mêmes concentrations afin de déterminer si ces concentrations peuvent être responsables d'un effet décontaminant similaire à celui observé avec FCA01 et FCA06.

Le Tableau 18 récapitule les concentrations en argent total mesurées sur des échantillons prélevés après 0, 15, 30, 45 et 60 minutes de circulation.

Tableau 18 : Concentrations en argent mesurées dans la suspension après passage de l'eau distillée stérile sur le dispositif pourvu de FCA01 ou FCA06.

Temps (min)	Quantité d'argent libéré par FCA01 (ppb)	Quantité d'argent libéré par FCA06 (ppb)
0	0	0
15	17	157
30	16	171
45	19	188
60	22	193

Les deux FCA libèrent de l'argent au cours de la circulation de la suspension sur le dispositif en quantités plus ou moins importantes mais de façon prépondérante dans les 15 premières minutes de circulation. Les concentrations en argent total sont respectivement de 22 et 193 ppb pour FCA01 et FCA06 après 60 minutes de circulation. Le second média relargue une quantité quasiment 10 fois plus importante que le premier pour un poids de FCA sèche 5 fois plus importante (2,5 g de FCA06 et 0,5 g de FCA01). Les quantités d'argent libéré par unité de poids se situent donc dans des proportions comparables. Les deux FCA ne sont pas produites par le même fabricant, et les protocoles de fabrication et d'imprégnation ne sont certainement pas identiques, ce qui explique probablement cette différence de concentration après 60 minutes de circulation. L'argent dosé dans ces échantillons correspond à l'argent total quel que soit son degré d'oxydation. Nous savons que l'argent est bactéricide sous la forme ionique Ag^+ , les concentrations mesurées ne reflètent donc pas réellement la concentration en composés bactéricides, c'est-à-dire uniquement en ions Ag^+ .

Nous avons dans un second temps essayé d'estimer quelle serait la quantité d'argent (sous forme Ag^+) nécessaire pour obtenir un effet décontaminant similaire à ce que nous avons observé lors des tests en circuit fermé avec FCA01 et FCA06 (décroissance de 6 unités log après 32 minutes de circulation par le dispositif) (Figure 17) et avec de l'eau « traitée » par FCA01 et FCA06 (Figure 29). Pour cela, l'activité bactéricide de solutions de AgNO_3 à différentes concentrations a été testée vis-à-vis d'*E. coli*. Les concentrations en Ag^+ testées sont comprises entre 450 et 7000 ppb (Figure 31). Seules deux concentrations sont présentées car le but est de déterminer la concentration engendrant les mêmes effets bactéricides que ceux observés jusqu'à maintenant.

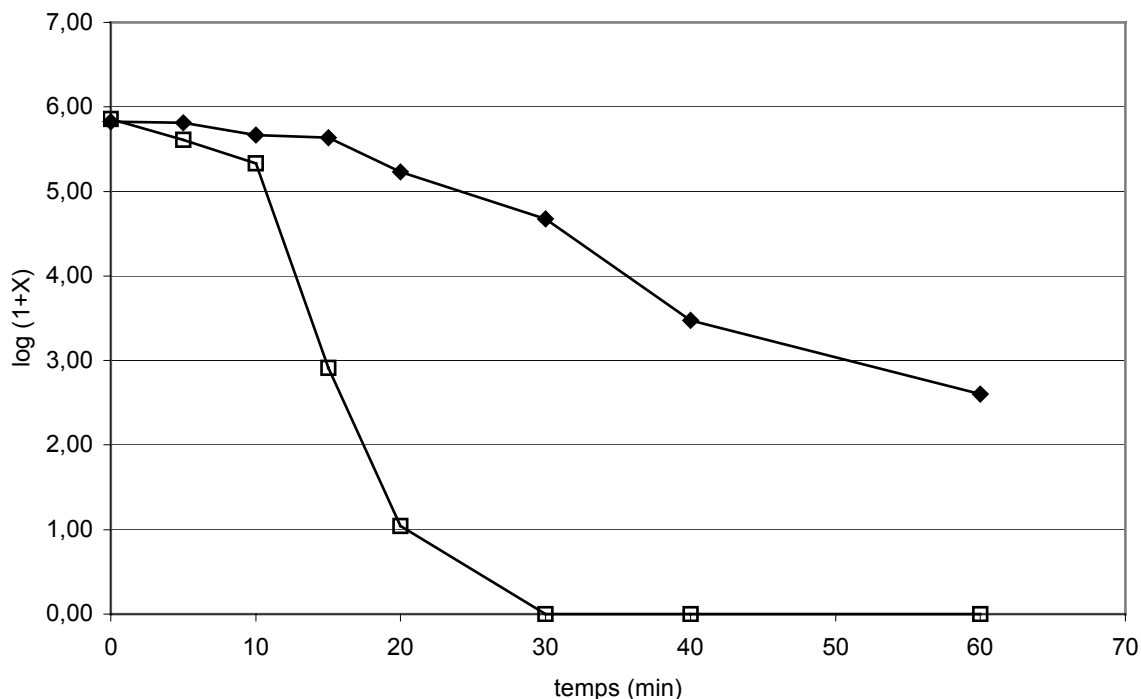


Figure 31 : Effets bactéricides vis-à-vis d'*E. coli* de solutions d' AgNO_3 à la concentration de 450 (◆) et 7000 (□) ppb en Ag^+ . X représente le nombre d'UFC.mL⁻¹ et chaque courbe est le résultat d'une expérimentation.

Quelle que soit la concentration testée nous notons une décroissance de la concentration bactérienne. Les diminutions du nombre d'unités log sont de 3,2 et 6 pour les concentrations de 450 et 7000 ppb après 64 minutes de contact. Il faut une concentration de 7000 ppb pour obtenir un effet décontaminant similaire à ceux observés avec les FCA01 ou FCA06, que ce soit en circuit fermé ou en eau « traitée ».

Il apparaît par conséquent que l'effet bactéricide obtenu avec FCA01 et FCA06 n'est pas seulement dû à la libération d'argent en solution. Les concentrations maximales mesurées en solution en argent total sont de 22 et 193 ppb respectivement pour FCA01 et FCA06, et nous avons montré qu'une concentration 300 fois supérieure dans le premier cas et plus de 36 fois supérieure dans le second cas est nécessaire pour observer un pouvoir bactéricide similaire. La quantité d'argent relarguée dans la suspension ne peut pas expliquer, à elle seule, les activités bactéricides des FCA01 et FCA06. Il est cependant connu qu'en plus de ses propriétés germicides intrinsèques, l'argent peut être impliqué dans des processus conduisant à la mort cellulaire. Il peut ainsi avoir un rôle catalytique dans la génération de composés

germicides libérés à partir de molécules (type oxygène) présentes dans la suspension bactérienne.

II.2 Implication de l'activité catalytique de la FCA

L'activité bactéricide de FCA00, fibre identique à FCA01 mais non imprégnée, montre que sans argent, une légère diminution de la concentration en bactéries est observée (Figure 17). Comme nous l'avons déjà évoqué, il est peu probable que cet effet décontaminant soit dû à un phénomène d'adsorption des bactéries à la surface de la fibre, il est donc certainement la conséquence d'une génération d'espèces bactéricides par la fibre elle-même. Le média, connu pour ses capacités catalytiques, peut par conséquent contribuer à la génération des composés germicides libérés dans la suspension.

Il apparaît donc que la formation de substances bactéricides serait catalysée non seulement par l'argent mais aussi par la FCA elle-même.

Le carbone activé (et en général toutes les formes de carbone) est beaucoup plus fréquemment employé en tant que support de catalyseurs (métaux ou composés métalliques) qu'en tant que catalyseur lui-même (MATATOV-MEYTAL et SHEINTUCH, 2002). Cependant le carbone est connu pour catalyser de nombreuses réactions, telles que des réactions d'hydrogénation, d'oxydation ou de réduction, de polymérisation et de chloration. Ces réactions impliquent des atomes tels que l'hydrogène, l'oxygène ou des halogènes (RODRIGUEZ-REINOSO, 1998).

II.3 Implication de l'oxygène

L'activité germicide observée pour certaines FCA pourrait être la conséquence d'une réaction catalytique impliquant l'oxygène dissous dans la suspension qui permettrait ainsi la formation d'espèces actives de l'oxygène fortement bactéricides. C'est pour cette raison que nous avons cherché à déterminer quelle était l'implication de la concentration en oxygène dissous dans l'effet décontaminant. Les tests de bactéricidie ont été réalisés avec FCA01, en condition d'aération normale et en anoxie. Cette dernière condition a été obtenue après un bullage à l'azote dans R2 jusqu'à l'élimination quasi-totale de l'oxygène présent en solution.

Dans ce cas, le réacteur R2 est fermé hermétiquement. Les tests sont ensuite effectués en circuit fermé.

Tout d'abord, nous avons vérifié que la condition d'anoxie, pendant 64 minutes, n'a aucun effet létal sur la souche *E. coli* (Figure 32). La courbe témoin montre que la concentration en bactéries reste quasi-constante durant 64 minutes. Pour les essais réalisés avec FCA01, une diminution de 2,8 unités log est observée en anoxie (0,2 - 0,8 mg.L⁻¹ d'O₂ résiduel) après 64 minutes de circulation alors qu'un effet décontaminant total (soit 6 unités log) est obtenu en condition normale d'aération (7 - 8 mg.L⁻¹ d'O₂) pour un même temps de circulation. La présence d'oxygène dissous apparaît être un paramètre important pour l'efficacité bactéricide de FCA01.

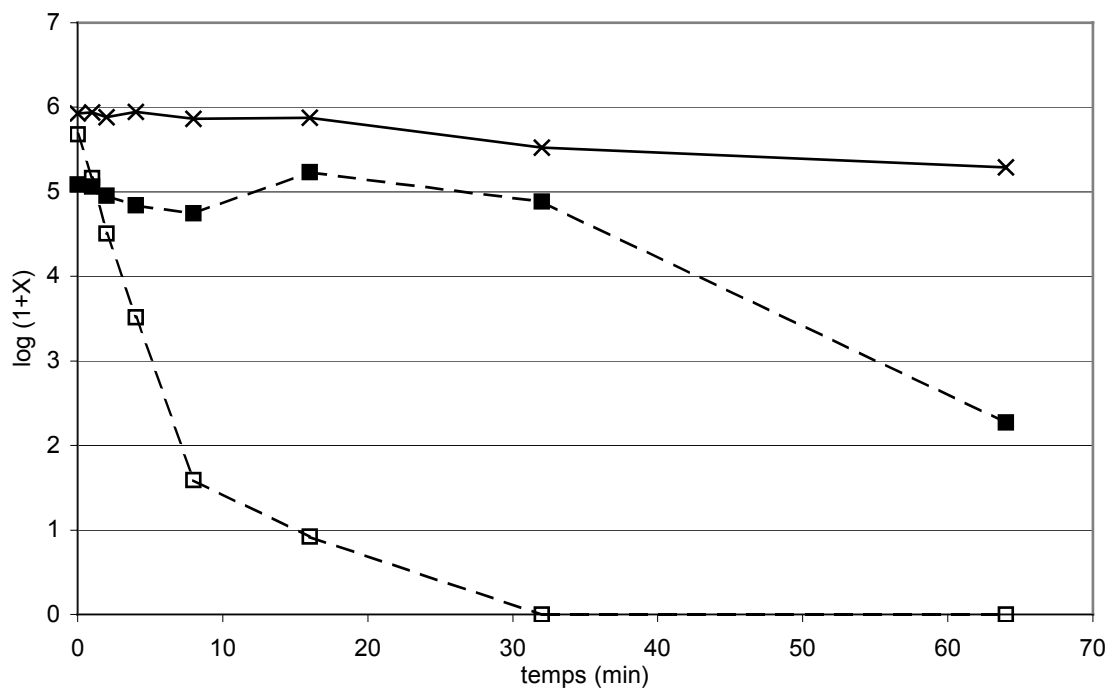


Figure 32 : Activité bactéricide de FCA01 vis-à-vis d'*E. coli* en conditions d'aération normale (□) et d'anoxie (■). Le témoin de survie des bactéries en anoxie est également présenté (×). X représente le nombre d'UFC.mL⁻¹ et chaque courbe est le résultat d'une moyenne d'au moins 3 expérimentations.

II.4 Identification des espèces responsables de l'activité germicide

Dans cette partie nous allons plus particulièrement nous pencher sur l'hypothèse d'une génération de ROS à partir de l'oxygène dissous en suspension et dont la formation serait catalysée par l'argent et/ou la FCA.

En effet, les résultats obtenus jusqu'à présent montrent que des FCA imprégnées d'argent génèrent des espèces germicides en solution, que ces espèces ont des durées de demi-vie courtes, que l'argent imprégné et libéré en solution ne peut pas à lui seul expliquer l'effet bactéricide observé et enfin, que la quantité d'oxygène dissous joue un rôle primordial pour obtenir une efficacité antimicrobienne conséquente. La génération de ROS a de plus été démontrée ou émise en tant qu'hypothèse de mécanisme antimicrobien à partir de matériaux aux caractéristiques similaires (SAWAI et coll., 1996 ; INOUE et KANZAKI, 1997 ; SAWAI et coll., 1998 ; YAMAMOTO et coll., 1999 ; INOUE et coll., 2002).

L'identification des composés germicides présents en solution a donc été réalisée. Tout en essayant de préciser l'implication de l'argent, en tant qu'agent bactéricide, nous nous sommes surtout focalisés sur l'identification des ROS. Théoriquement, ces espèces ont des durées de demi-vie courtes et sont donc très difficiles à identifier directement. C'est pourquoi une approche indirecte a été mise en place *via* des analyses par RPE, l'utilisation d'agents inhibiteurs des ROS et une étude basée sur l'expression de gènes par RT-PCR. L'utilisation d'un agent neutralisant des ions argent a aussi été réalisée afin de mieux expliquer l'implication de ces ions.

II.4.1 Identification de radicaux par analyse RPE

La RPE est une méthode spectroscopique permettant de détecter des substances paramagnétiques, c'est-à-dire des électrons non appariés issus de systèmes biologiques physiques ou chimiques. Les radicaux font partie de ces substances détectables par RPE.

Ce sont les radicaux OH° et $\text{O}_2^{\circ-}$ qui ont été recherchés. En raison de la durée de demi-vie très courte de ces espèces, il est impératif d'utiliser un piègeur qui stabilise spécifiquement ces composés, le 5,5-DiMéthyl-1-Pyrroline N-Oxyde (DMPO).

Au cours de la circulation d'eau distillée stérile par le dispositif pourvu de FCA01, des prélèvements après 0, 4, 8, 16, 32 et 64 minutes de circulation ont été réalisés. Le piègeur est soit additionné dans l'eau qui circule au début de la manipulation, les composés potentiellement générés seront ainsi piégés au fur et à mesure de leur génération, soit extemporanément dans les différents prélèvements effectués, de façon à stabiliser les radicaux potentiellement présents dans le prélèvement.

Les premiers résultats concernent les essais où le DMPO est ajouté dans l'eau distillée stérile mise en circulation sur le dispositif pourvu de FCA01. Tous les spectres (témoin ou essais) sont identiques (Figure 33), et ne révèlent aucun signal électromagnétique. Il semblerait qu'il n'y ait pas de radicaux (OH° ou $\text{O}_2^{\circ-}$) détectables dans la solution.

Ce manque de signal peut être dû au fait que toutes les molécules de DMPO sont adsorbées sur la fibre de carbone activé. Pour cela nous avons effectué le test de Fenton avec la suspension ayant circulé 64 minutes sur la FCA afin de vérifier la présence ou non de DMPO dans la solution finale.

La réaction de Fenton ($\text{Fe}^{2+} + \text{H}_2\text{O}_2 + \text{suspension expérimentale} \rightarrow \text{OH}^\circ$) libère des radicaux OH° qui sont alors facilement détectables par RPE et caractérisés par un spectre typique.

Cette expérience nous a permis de constater que la concentration en DMPO en solution est en excès, l'absence de signal ne provient donc pas de l'adsorption totale des molécules sur la fibre.

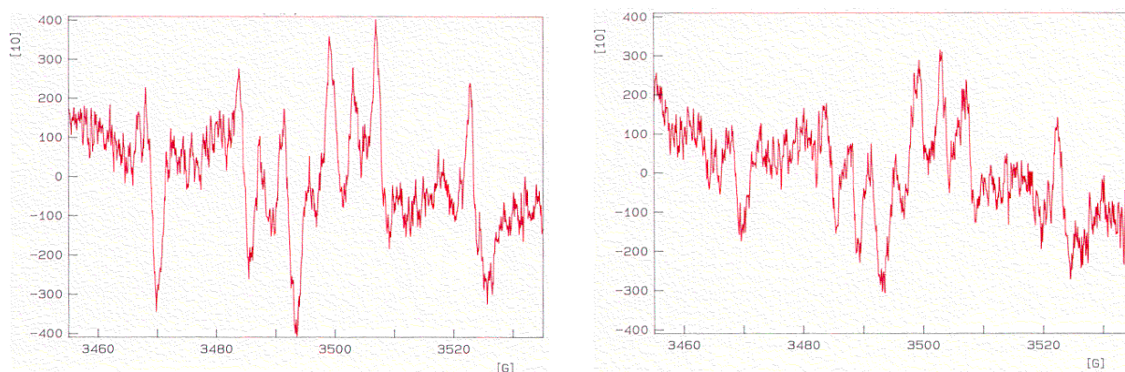


Figure 33 : Spectres RPE du témoin (eau distillée + DMPO) (à gauche) et d'un essai après 16 minutes de circulation sur FCA01 (à droite).

Les seconds résultats concernent les essais où le DMPO est ajouté extemporanément dans le prélèvement. Les spectres obtenus sont présentés ci-dessous (Figure 34).

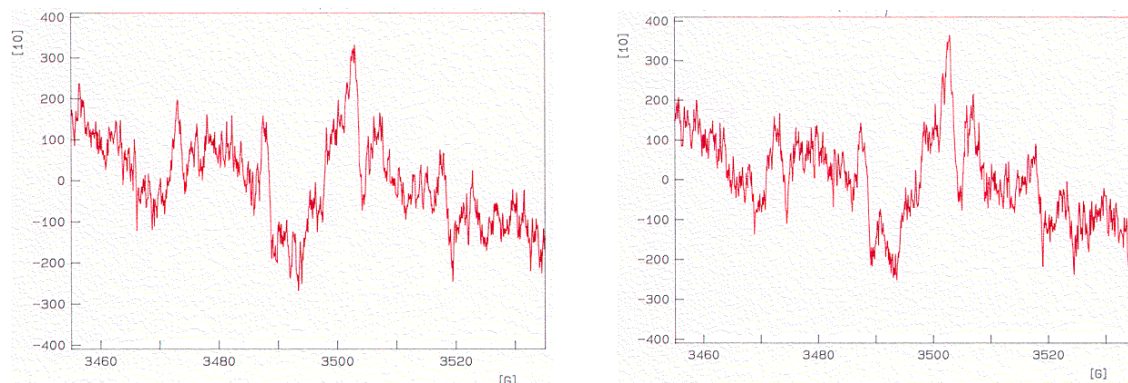


Figure 34 : Spectres RPE du témoin (eau distillée + DMPO) (à gauche) et d'un essai après 32 minutes de circulation d'eau distillée sur FCA01 (à droite).

Tous les spectres (témoin et essais) montrent le même profil, n'indiquant aucun signal électromagnétique. Il n'est donc pas possible de conclure à la présence d'espèces radicalaires par ces analyses RPE.

Dans les deux cas l'absence de signal peut être expliquée par différentes hypothèses : le piègeur est non adapté aux radicaux présents puisque celui-ci ne permet la détection que de HO° et de grande quantité de O_2° , la concentration en espèces radicalaires est trop faible pour qu'elles soient détectables, ou il n'y a pas de radicaux.

La présence de radicaux OH° et O_2° n'a pas été prouvée par analyses RPE, la méthode d'analyse que nous avons employée n'est donc probablement pas adaptée, sans doute à cause de l'inefficacité du piègeur utilisé au regard des concentrations potentiellement présentes en radicaux. Nous avons cependant montré qu'au niveau des groupements de surface de la FCA il y avait présence d'espèces radicalaires, détectées également sans présence de DMPO (résultats non présentés). La chimie de surface des FCA est très variée, nous avons auparavant identifié des fonctions chimiques de surface, mais lors de la fabrication de la FCA il peut également se produire la formation de radicaux. Ils sont la conséquence de la décomposition des fonctions oxygénées de surface après traitement thermique (LI et coll., 2001).

II.4.2 Identification des espèces germicides par utilisation de composés inhibiteurs ou piègeurs

Un agent neutralisant des ions Ag^+ et différents inhibiteurs de ROS ont été utilisés pour étudier l'implication de l'argent et des ROS dans le mécanisme de germicide. Ces agents ont été additionnés à une eau « traitée » par FCA06 pendant 15 minutes. Leur addition est faite immédiatement après circulation de l'eau, individuellement ou par combinaison de deux ou trois des composés. Les bactéries sont ensuite ajoutées à la solution à la concentration initiale de 10^6 cellules.mL⁻¹.

Les effets bactéricides de l'eau « traitée » par FCA06, sans ajout d'agent neutralisant ou inhibiteurs, entraînent une décontamination totale (6 unités log) après seulement 16 minutes de contact entre l'eau « traitée » et les cellules (Figure 35). Lorsque le thioglycolate de sodium, agent neutralisant des ions Ag^+ , est ajouté au préalable dans l'eau « traitée », la diminution de la charge bactérienne n'est plus que de 1,5 unités log après 32 minutes de temps de contact. Les propriétés bactéricides de l'eau « traitée » par FCA06 ont été, en grande partie, inhibées par l'agent neutralisant de Ag^+ . La revivification des cellules n'est cependant pas totalement restaurée. Ces résultats confirment que les ions Ag^+ ont une part prédominante dans le mécanisme antimicrobien mais ne peuvent pas à eux seuls expliquer tous les effets observés.

Divers composés enzymatiques et non-enzymatiques sont connus pour prévenir la toxicité des ROS sur *E. coli*. Nous avons ainsi utilisé deux inhibiteurs enzymatiques des ROS pour étudier leur implication dans le mécanisme bactéricide. La catalase est utilisée pour inhiber l'effet toxique de H_2O_2 et la SOD pour inhiber celui de O_2° .

Quand la catalase ou la SOD sont additionnées individuellement, un effet bactéricide est toujours observé mais la charge bactérienne décroît plus lentement que lorsque aucun inhibiteur n'est ajouté. La décroissance de la concentration cellulaire est approximativement de 5 unités log après 32 minutes de temps de contact entre les bactéries et l'eau « traitée » par FCA06, que ce soit l'une ou l'autre de ces deux conditions (Figure 35). Nous remarquons cependant qu'avec un ajout de SOD, la décroissance bactérienne est plus lente qu'avec ajout

de catalase, ce qui indique que la SOD inhibe un peu plus les substances germicides que la catalase ou que les composés inhibés par la SOD, $O_2^{\circ-}$, ont un pouvoir plus toxique que ceux inhibés par la catalase, H_2O_2 .

Ajoutés séparément les inhibiteurs des ROS ne permettent donc pas une restauration de la capacité des bactéries à se revivifier, une inhibition de l'effet est cependant notable, ce qui suggère que H_2O_2 et $O_2^{\circ-}$ contribuent à l'effet bactéricide mais ceci dans des proportions moins importantes que les ions Ag^+ .

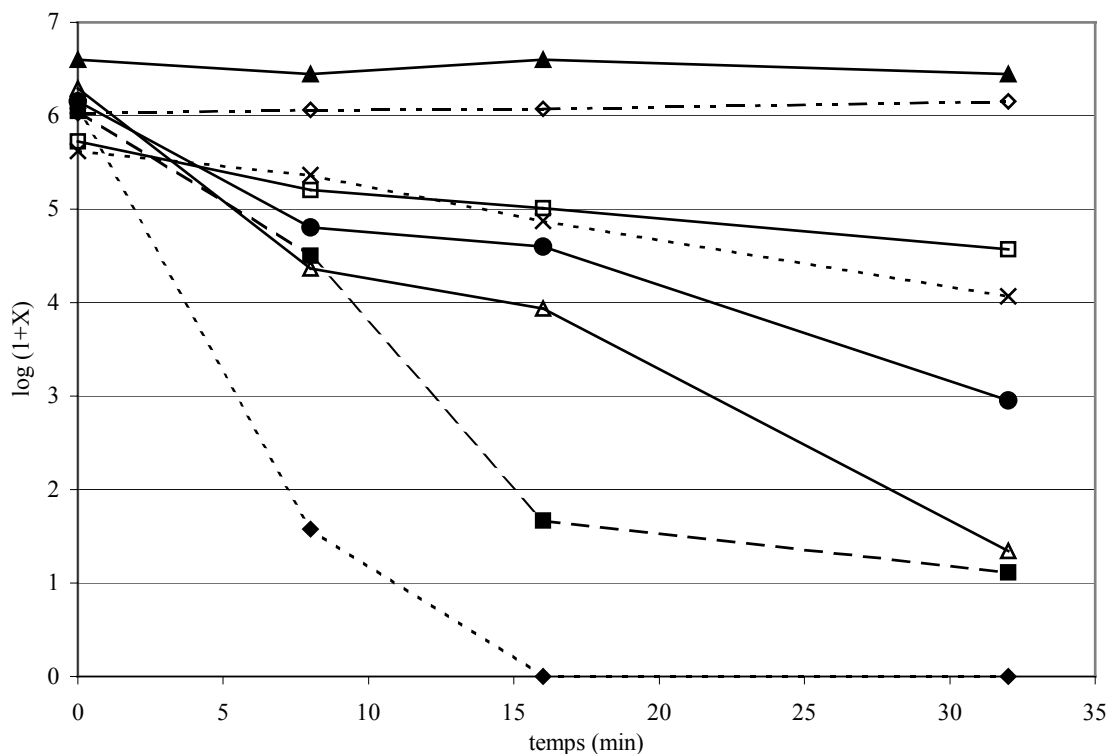


Figure 35 : Activité bactéricide vis-à-vis d'*E. coli* de l'eau « traitée » par FCA06 sans ajout ni de composés inhibiteurs ni d'agent neutralisant (◆), après ajout de catalase (■), de SOD (Δ), de thioglycolate de sodium (×), de SOD et catalase (●), de thioglycolate de sodium et catalase (□), de thioglycolate de sodium et SOD (▲) et de SOD, catalase et thioglycolate de sodium (◇). X représente le nombre d'UFC.mL⁻¹ et chaque courbe est le résultat d'une moyenne d'au moins 3 expérimentations.

Dans un second temps, ces différents composés sont utilisés par combinaisons de deux ou trois. Après ajout de catalase et SOD, thioglycolate de sodium et catalase ou de thioglycolate de sodium et SOD, l'inhibition de l'effet bactéricide de l'eau « traitée » est plus importante que lorsque ceux-ci sont ajoutés individuellement. La décroissance de la charge bactérienne est d'environ 3 unités log pour la première combinaison citée après 32 minutes de

contact entre l'eau « traitée » et les cellules ; l'effet est donc partiellement inhibé. Pour les combinaisons impliquant le thioglycolate de sodium, la restauration de la revivification des bactéries est complète en ce qui concerne son association avec SOD et quasiment complète en ce qui concerne l'association avec la catalase. Enfin, lorsque tous les composés sont additionnés dans l'eau « traitée » l'inhibition de l'effet bactéricide est complètement restaurée.

L'état physiologique des cellules ayant été mises en contact avec de l'eau « traitée » par FCA06 contenant des composés inhibiteurs ou agent neutralisant a été étudié par CMF. Un marquage à l'IP est réalisé après l'ajout de chaque inhibiteur. Les cytochromes sont présentés en Annexe 6. Les observations confirment de façon générale les résultats obtenus après revivification des bactéries sur milieu nutritif : lorsque l'inhibiteur est efficace dans l'inhibition du pouvoir bactéricide (cas du thioglycolate), la population bactérienne a une intégrité membranaire peu modifiée alors que lorsque l'inhibiteur est peu actif (cas de la catalase), la perméabilité membranaire de la population bactérienne est augmentée. Pour la SOD, l'augmentation importante de la perméabilité n'est pas vraiment en accord avec la revivification et reste sans explication.

II.4.3 Etude du stress oxydatif par RT-PCR

La présence de ROS, telles que des peroxydes ou des superoxydes, peut induire une situation de stress oxydatif au niveau des cellules. La réponse des cellules à ce stress peut induire chez les bactéries une stimulation de l'expression de gènes particuliers. Afin de confirmer que les ROS sont responsables de la létalité cellulaire induite par l'activité de FCA06, nous avons étudié la modification de l'expression de deux gènes impliqués dans la réponse au stress oxydatif, les gènes *sodA* et *katG*. Le stress oxydatif peut également induire l'expression de protéines normalement induites par d'autres situations telles que le choc thermique et les cas de dommages causés à l'ADN, c'est-à-dire la réponse SOS (WALKUP et KOGOMA, 1989 ; PEDAHzUR et coll., 1997). C'est pourquoi nous nous sommes également intéressés à l'expression de deux gènes codant pour des protéines du choc thermique, *dnaK* et *mopA*, et deux gènes de protéines de la réponse SOS, *lexA* et *recA*.

Pour chaque gène, le niveau de l'expression a été déterminé pour des bactéries dans deux conditions biologiques : après un temps de contact de 4 minutes avec l'eau « traitée » par FCA06 et en contact avec de l'eau « non traitée ». La Figure 36 montre l'expression des gènes de cellules dans une condition « traitée » par rapport à l'expression de ces mêmes gènes en condition « non traitée ». Un temps de contact de 4 minutes a été choisi suite aux analyses par CMF où nous avons remarqué que les cellules subissaient des dommages à partir de 4 minutes de temps de contact avec l'eau « traitée ». De plus, pour ces analyses par RT-PCR, il faut que les cellules soient en nombre suffisant et ne soient pas toutes en voie de létalité, c'est-à-dire il faut qu'elles soient encore assez viables pour pouvoir mettre en place leurs systèmes de défense.

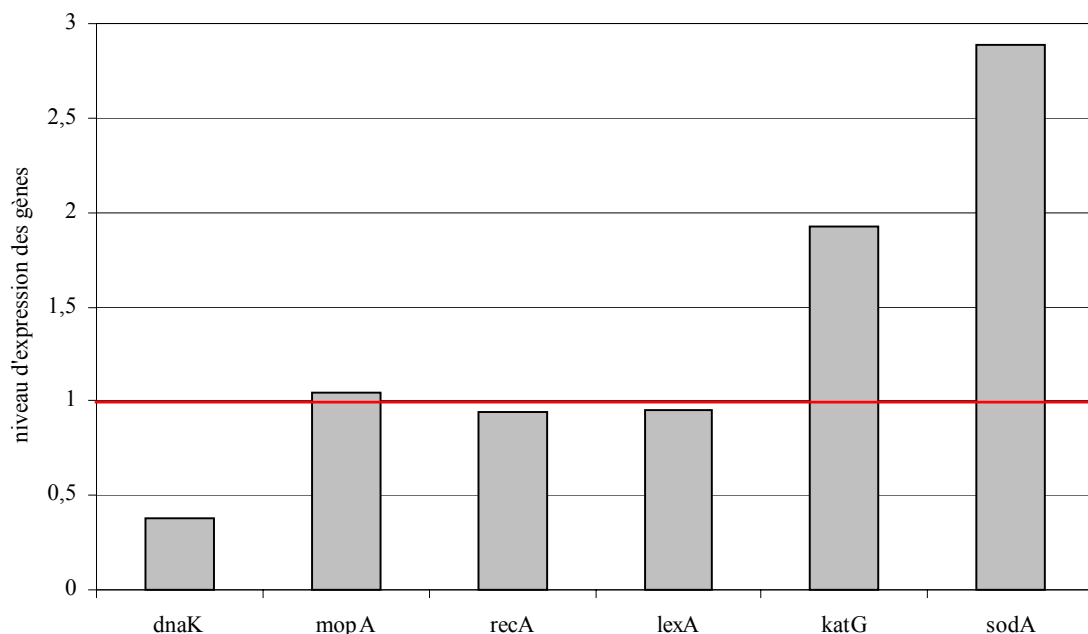


Figure 36 : Evaluation du niveau d'expression de quelques gènes d'*E. coli* K12 après 4 minutes de contact avec de l'eau « traitée » par FCA06. Le trait situé à 1 marque le niveau d'expression de gènes dans des conditions non stressantes.

Les résultats montrent que *dnaK* est faiblement exprimé, le rapport de l'expression de gène était environ de 0,4. Les expressions de *mopA*, *recA* et *lexA* sont considérées comme inchangées en comparaison avec une condition normale, les rapports sont respectivement de 1 - 0,9 et 0,95. En ce qui concerne le niveau d'expression de *katG* et de *sodA*, les rapports sont respectivement 1,9 et 2,9. Ces deux gènes sont donc fortement exprimés.

Même si, comme pour les analyses par CMF, nous n'avons qu'une estimation qualitative quant à l'état physiologique des bactéries *E. coli*, ces résultats nous permettent cependant de confirmer que les bactéries ont mis en place un système de défense contre le stress oxydatif ; elles ont donc été en présence d'un excès de peroxydes et de superoxydes. Le niveau d'expression des gènes de défense contre les ROS est bien supérieur à celui des cellules en condition normale.

Selon nos conditions expérimentales, nous n'observons pas de forte expression de *dnaK* et de *recA*, deux gènes induits par les peroxydes et sous contrôle du régulon OxyR, ni de *mopA* qui code la protéine GroEL connue pour être induite lors d'un stress oxydatif (WALKUP et KOGOMA, 1989). Ces ROS sont connus pour provoquer des cassures des molécules d'ADN et induisent ainsi l'activation de la réponse SOS (WALKUP et KOGOMA, 1989 ; PEDAHzUR et coll., 1997). Cependant le temps de contact entre les bactéries *E. coli* et l'eau « traitée » par FCA06 n'a sans doute pas été suffisamment long pour que des dommages soient provoqués ou que le système de réparation se mette en place. Il en est de même pour la protéine RecA dont l'expression du gène est connue pour être stimulée en présence de ROS (PEDAHZUR et coll., 1997).

PEDAHZUR et coll. (1997) ont montré une sur-expression de *recA*, *dnaK* et *katG*, et celle d'autres gènes de la réponse SOS, du choc thermique et d'autres sous dépendance des deux régulons OxyR et SoxRS en présence de H₂O₂ et/ou d'argent.

Dans nos conditions expérimentales, ce sont les enzymes du système de défense primaire qui sont fortement exprimées. Des protéines, comme celles de réparation de l'ADN, font partie du système de défense secondaire et n'ont sans doute pas été induites après 4 minutes.

II.5 Mécanismes mis en jeu

Dans le mécanisme de génération des ROS, nous émettons l'hypothèse que Ag⁺ et la FCA permettent la formation de O₂^{•-} à partir de l'oxygène dissous présent en solution, grâce à leurs propriétés catalytiques. Puis se forment successivement H₂O₂ et HO[•]. Suite aux expérimentations réalisées avec les inhibiteurs nous nous rendons compte que plus la réaction est stoppée en amont et plus l'effet bactéricide est inhibé. Lorsque les ions Ag⁺ sont neutralisés, l'inhibition de l'effet bactéricide est importante mais pas totale, l'hypothèse est

que l'effet bactéricide résiduel est la conséquence de l'activité catalytique de la FCA qui permet également la formation de ROS à partir d' O_2 .

Lorsque les enzymes catalase ou SOD sont ajoutées séparément l'effet bactéricide est partiellement inhibé, dans ces deux cas seul un « maillon » de la chaîne est bloqué. De plus la SOD permet la formation de H_2O_2 à partir de O_2° . Après ajout de catalase, l'effet inhibiteur est faible, ceci peut également être expliqué par le fait que cette enzyme n'est efficace qu'en présence de grandes quantités de H_2O_2 . En effet, en présence de faibles concentrations en H_2O_2 , elle l'est beaucoup moins en raison de sa faible affinité pour cet oxydant (K_m élevé) (LOEWEN, 1984). Enfin lorsque nous ajoutons le thioglycolate et la SOD, les réactions les plus en amont sont stoppées ce qui peut expliquer que la restauration de la revivification des bactéries soit complète.

FCA(Ag) semble apte à activer la formation de O_2° et H_2O_2 à partir de l'oxygène dissous, les implications de ces deux espèces ne sont cependant pas prédominantes dans l'effet germicide, comme il a été montré *via* l'utilisation d'inhibiteurs de ROS. Nous émettons donc l'hypothèse que l'activité bactéricide est accentuée par la formation de HO° , connu pour avoir un très fort pouvoir oxydant. La présence simultanée de O_2° , H_2O_2 et de métaux permet la formation de HO° grâce aux réactions de Fenton et d'Haber-Weiss (IMLAY et LINN, 1996 ; Mc CORMICK et coll., 1998 ; KEHRER, 2000).

De tels résultats ont déjà été observés, non pas avec des FCA(Ag), mais avec des matériaux similaires en termes de propriétés bactéricides et tous sont imprégnés de métaux, à savoir une zéolite imprégnée d'argent (INOUE et KANZAKI, 1997 ; INOUE et coll., 2002) ou des poudres céramiques d'oxydes métalliques (SAWAI et coll., 1996 ; SAWAI et coll., 1998 ; YAMAMOTO et coll., 1999). Les études réalisées avec ces matériaux montrent que l'effet bactéricide observé est la conséquence de l'activité catalytique des métaux imprégnés qui permettent la génération de ROS et que par conséquent l'oxygène dissous est très important au déclenchement de l'activité antimicrobienne (SAWAI et coll., 1998 ; INOUE et KANZAKI, 1997 ; INOUE et coll., 2002). De plus, MOON et coll. (1999) ont montré qu'une FCA imprégnée de palladium catalysait la réduction d'oxygène dissous par le métal imprégné et par la FCA elle-même.

Chapitre 2 :
Application à la décontamination de l'air

Puisque le but final de l'étude concerne la décontamination de l'air en cabine d'avion, il a donc fallu créer artificiellement un environnement pouvant être assimilé à un tel espace confiné. C'est dans cet environnement que nous avons expertisé les potentialités d'un traitement décontaminant par aérosolisation.

Pour cela nous avons mis au point un pilote expérimental simulant une cabine d'avion dans lequel nous avons créé un air artificiellement contaminé. Le choix de créer un bioaérosol artificiel a été préféré à l'utilisation d'air ambiant contenant naturellement des bioaérosols, en raison d'une meilleure maîtrise des concentrations en germes et donc d'une facilité d'analyse. Enfin, un traitement bactéricide a été appliqué par aérosolisation d'eau « traitée » par FCA(Ag), pour laquelle les propriétés antimicrobiennes ont déjà été démontrées (Partie 3 - Chapitre 1).

La première étape des travaux a donc consisté à valider le pilote expérimental exposé Partie 2 - IV.2 afin d'évaluer, par la suite, les potentialités de décontamination d'une eau « traitée » par FCA sur un air artificiellement contaminé. Les valeurs de plusieurs paramètres tels que l'humidité relative, la concentration du bioaérosol doivent correspondre à celles rencontrées dans un environnement aéronautique. Nous avons donc fixé au départ différents paramètres de sorte qu'ils soient en adéquation avec les conditions trouvées dans l'air cabine des avions.

I VALIDATION DES PARAMETRES DU DISPOSITIF EXPERIMENTAL

I.1 Humidité Relative (HR)

L'HR dans le banc est un des paramètres imposés, elle doit se situer aux alentours de 20 %, ce qui correspond à une HR moyenne relevée en cabine d'avion. Pour cela des calculs théoriques, faisant appel à des notions de thermodynamique, ont été réalisés afin de déterminer la quantité d'eau devant être injectée dans le banc pour pouvoir obtenir cette HR à une température de 20°C (Annexe 7). L'obtention de l'HR est la conséquence d'une

combinaison de deux principaux facteurs : le débit en AC et le débit de liquide nébulisé dans la chambre de mélange T10.

Le débit d'AC a été déterminé grâce à des données bibliographiques et en raison des restrictions techniques et du respect de l'isocinétie entre le débit d'AC dans le banc à air et le débit auquel seront réalisés les prélèvements de bioaérosols. Le débit d'AC est dans un premier temps fixé à $50 \text{ L}\cdot\text{min}^{-1}$. Il pourra cependant varier entre $33,33 \text{ L}\cdot\text{min}^{-1}$ (débit minimum du préleveur de bioaérosols) et $50 \text{ L}\cdot\text{min}^{-1}$ qui est le débit maximum que peut contrôler le régulateur massique d'AC.

Compte tenu d'un débit d'AC de $50 \text{ L}\cdot\text{min}^{-1}$, les calculs montrent qu'il faut un apport de liquide (eau distillée et/ou suspension bactérienne) d'environ $0,18 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$ dans la chambre de mélange pour obtenir une HR d'environ 20 %. Par conséquent le débit réglé au niveau de la pompe P40, régulant de façon identique les débits de liquide (eau distillée stérile ou suspension bactérienne) en M20 et M30, est de $0,09 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$.

La première mise au point du pilote a tout d'abord consisté à vérifier expérimentalement l'HR dans la chambre de mélange. Il faut donc *a priori* un débit en M20 et en M30 d'environ $0,09 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$ pour obtenir une HR de 20 %. Les différents paramètres (débits en AC et en liquide) sont ensuite modifiés afin d'évaluer le panel d'HR réalisable avec le pilote expérimental.

Le débit en M20, c'est-à-dire, le débit de la suspension bactérienne est fixe et ne varie jamais puisque la concentration en bactéries est constante. Par contre, le débit en M30 peut être modifié de $0,09$ à $0,27 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$. Le débit en AC pouvant également varier de $33,33$ à $50 \text{ L}\cdot\text{min}^{-1}$, les temps de séjour sont respectivement de 7 min 03 sec et 4 min 42 sec. Ces temps de séjour dans T10 sont également en adéquation avec les temps de séjour de l'air trouvés en cabine d'avion.

Le Tableau 19 regroupe les différentes conditions expérimentales et les mesures effectuées en terme d'HR et de température.

Tableau 19 : Récapitulatif des différents paramètres mesurés selon différents débits en AC et en eau dans M30. Le débit en M20 est fixé à 0,09 mL.min⁻¹.

N° d'essai	Temps de séjour dans T10	Débit en M30 (mL.min ⁻¹)	T (°C)	HR (%)
1	4 min 42 sec	0,09	22,4 ± 2,0	19,1 ± 4,0
2	4 min 42 sec	0,18	24,3 ± 2,8	27,9 ± 5,7
3	4 min 42 sec	0,27	20,9 ± 0,8	42,9 ± 4,5
4	7 min 03 sec	0,09	21,9 ± 1,0	36,6 ± 1,3
5	7 min 03 sec	0,18	21,8	48
6	7 min 03 sec	0,27	22,1	58,2

D'après ce tableau, deux remarques peuvent être faites : plus le débit en M30 est élevé ou plus le temps de séjour en chambre de mélange est long et plus l'HR augmente. L'augmentation de l'HR est constante et régulière, en effet lorsque le débit en M30 est doublé ou triplé, l'HR est incrémentée à chaque fois de 10 % quel que soit le débit d'AC appliqué. Pour un débit de 50 L.min⁻¹, elle est au départ à 19,1 ± 4,0 % pour un débit de liquide de 0,09 mL.min⁻¹ en M30, puis l'HR augmente à 27,9 ± 5,7 % lorsque le débit est doublé puis enfin l'HR atteint 42,9 ± 4,5 % en triplant le débit. Pour un débit en AC de 33,33 L.min⁻¹, la première HR obtenue est de 36,6 ± 1,3 % puis elle augmente à 48 et 58,2 % après avoir doublé puis triplé le débit en M30.

Ces résultats obtenus expérimentalement confirment les calculs théoriques effectués pour obtenir une HR aux alentours de 20 %.

I.2 Génération du bioaérosol

I.2.1 Choix de la souche

Le choix du microorganisme est primordial car les aérosols microbiens sont des environnements instables. Leur production et leur analyse sont difficiles car les particules qui le composent sont très sensibles (GRIFFITHS et coll., 1996 ; DOWD et MAIER, 1999). Les microorganismes sont en effet affectés par de nombreux facteurs (pollution, dessiccation, stress physique, changement brutal de conditions environnementales, état aéroporté...) qui peuvent entraîner une perte de viabilité ; les microorganismes deviennent par conséquent difficiles à étudier (GRIFFITHS et DeCOSEMO, 1994 ; GRIFFITHS et coll., 1997 ;

GRIFFITHS et STEWART, 1999 ; FOLMSBEE et coll., 2000). Certains germes sont cependant plus résistants en aérosol que d'autres ; en effet, les champignons sont plus robustes que les bactéries végétatives (DOWD et MAIER, 1999).

Malgré ces éléments, nous avons conservé la souche *E. coli*, d'une part parce que c'est avec cette souche que tous les travaux en phase aqueuse ont été réalisés et d'autre part pour sa facilité de culture. Enfin, ces travaux sont réalisés pour une application en cabine d'avion et l'analyse des bioaérosols en avion indiquent que les germes rencontrés (des bactéries végétatives) sont principalement émis par les occupants, c'est-à-dire des germes qui ne sont pas habituels de l'air.

1.2.2 Choix de la méthode de prélèvement

La méthode de collecte du bioaérosol est un facteur très important à prendre en compte pour l'obtention d'un bioaérosol et est très influente sur la revivification des bactéries aérosolisées. Ceci comprend le procédé de prélèvement (filtration, impaction, mise en suspension...), la vitesse de collecte et la durée de collecte.

Un prélèvement par filtration sur membrane en gélatine a été choisi pour cette étude. Il semble que la collecte de bioaérosol par filtration engendre moins de contraintes physiques et de phénomène de dessiccation des cellules (WANG et coll., 2001). Les bactéries piégées dans la gélatine sont protégées pour un temps plus long par rapport à des bactéries piégées sur membranes de prélèvement classiques (nitrate de cellulose).

En ce qui concerne les autres paramètres, vitesse et durée de prélèvement, il est connu que plus la vitesse de collecte est élevée et plus la létalité est importante (STEWART et coll., 1995). De plus, plus la durée de collecte est longue et plus les germes subissent les phénomènes de dessiccation (DING et WANG, 1997 ; WILLEKE et coll., 1998 ; FOLMSBEE et coll., 2000). En accord avec les données bibliographiques et les contraintes physiques, la vitesse des prélèvements a donc été réglée à 50 L.min⁻¹ pour une durée se situant entre 1 et 2 minutes (DECHOW et coll., 1997 ; FOLMSBEE et coll., 2000).

I.2.3 Stabilité du bioaérosol

Il a été démontré qu'il était possible d'obtenir une atmosphère dans T10 avec une HR stable. L'obtention et la stabilité du bioaérosol, dans les conditions d'HR établies précédemment, a par la suite été étudiée. La concentration désirée en sortie de banc expérimental est aux alentours de 10^3 cellules.m⁻³ d'air, ce qui correspond aux concentrations en microorganismes habituellement mesurées en espace intérieur (LIS et PASTUSZKA, 1997 ; NEUMANN et coll., 2002).

Le pilote expérimental décrit Figure 13 et Figure 14 a été utilisé. M20 et M30 nébulisent tout d'abord de l'eau distillée stérile à un débit d'environ 0,09 mL.min⁻¹. L'étude de la génération du bioaérosol est réalisée pour deux temps de séjour : 4 min 42 sec et 7 min 03 sec. Le bioaérosol est obtenu par l'aérosolisation, après stabilisation de l'HR, par M20, d'une suspension bactérienne d'*E. coli*.

Plusieurs concentrations en bactéries de la suspension à nébuliser ont été testées afin de déterminer celle permettant l'obtention d'un bioaérosol concentré à 10^3 cellules.m⁻³ d'air. Après plusieurs essais, la concentration de la suspension a été ajustée à 10^3 et 10^4 bactéries.mL⁻¹ respectivement pour les temps de séjour de 4 min 42 sec et 7 min 03 sec.

Les paramètres obtenus pour un temps de séjour de 4 min 42 sec dans T10 sont présentés Figure 37. La température ($20,9 \pm 0,2$ °C) et le pourcentage d'HR ($18,2 \pm 0,7$ %) restent constants tout au long des expérimentations effectuées. La concentration en bioaérosol reste également constante et égale à $3,4 \pm 0,2$ unités log, c'est-à-dire environ 10^3 cellules.m⁻³ d'air.

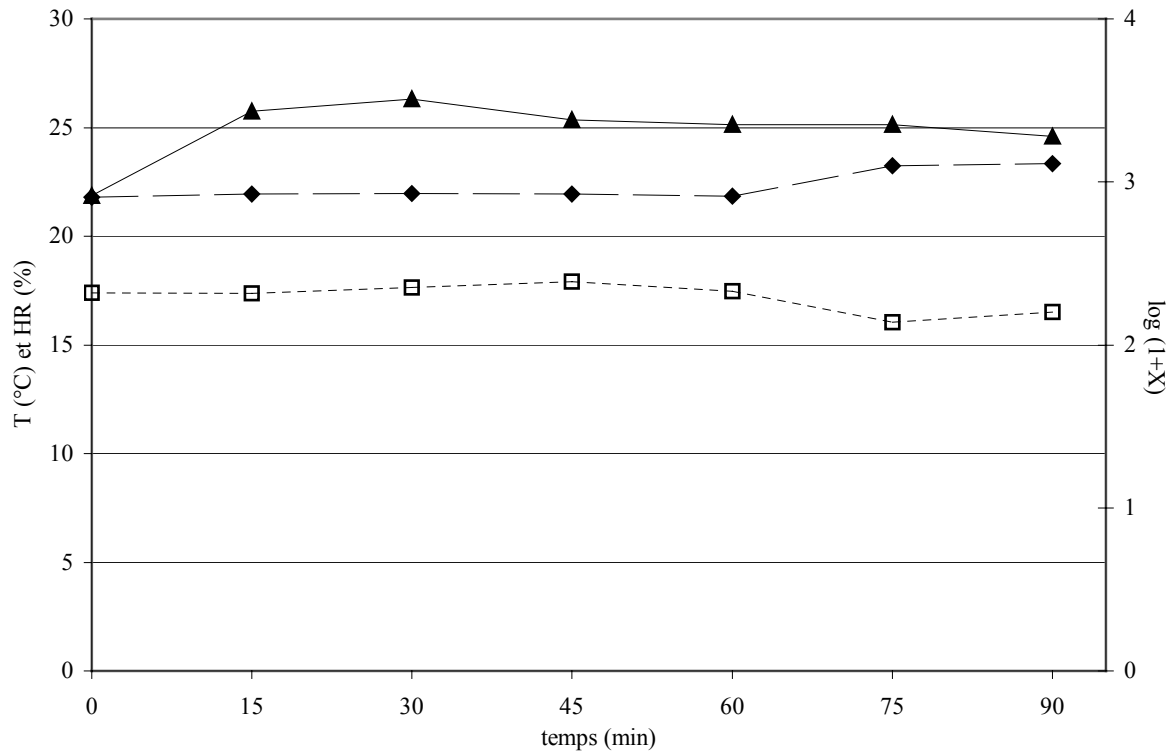


Figure 37 : Evolution de la température (♦), de l'HR (□) et de la concentration du bioaérosol (▲), au cours du temps pour un temps de séjour de 4 min 42 sec dans T10. X représente le nombre d'UFC.m⁻³ d'air et chaque courbe est le résultat d'une moyenne d'au moins 3 expérimentations.

Remarque : La concentration du bioaérosol est calculée en tenant compte de la vitesse de prélèvement et du temps de prélèvement. Le dénombrement réalisé sur membranes en gélatine après incubation à 37°C correspond à 33,33 ou 50 L d'air. Cette donnée est alors convertie pour la ramener à une quantité de bactéries par mètre cube d'air.

La Figure 38 se réfère à la même expérimentation mais avec un temps de séjour de 7 min 03 sec dans T10. La première conséquence de ce temps de séjour plus long est une augmentation de l'HR. En effet, elle est désormais de $36,7 \pm 2,8$ % sur l'ensemble des manipulations et la température est en moyenne de $21,9 \pm 1,2$ °C sur l'ensemble des expérimentations. La concentration en bactéries aérosolisées est de l'ordre de $3,5 \pm 0,2$ unités log sur la durée de l'expérimentation ce qui correspond à la concentration désirée.

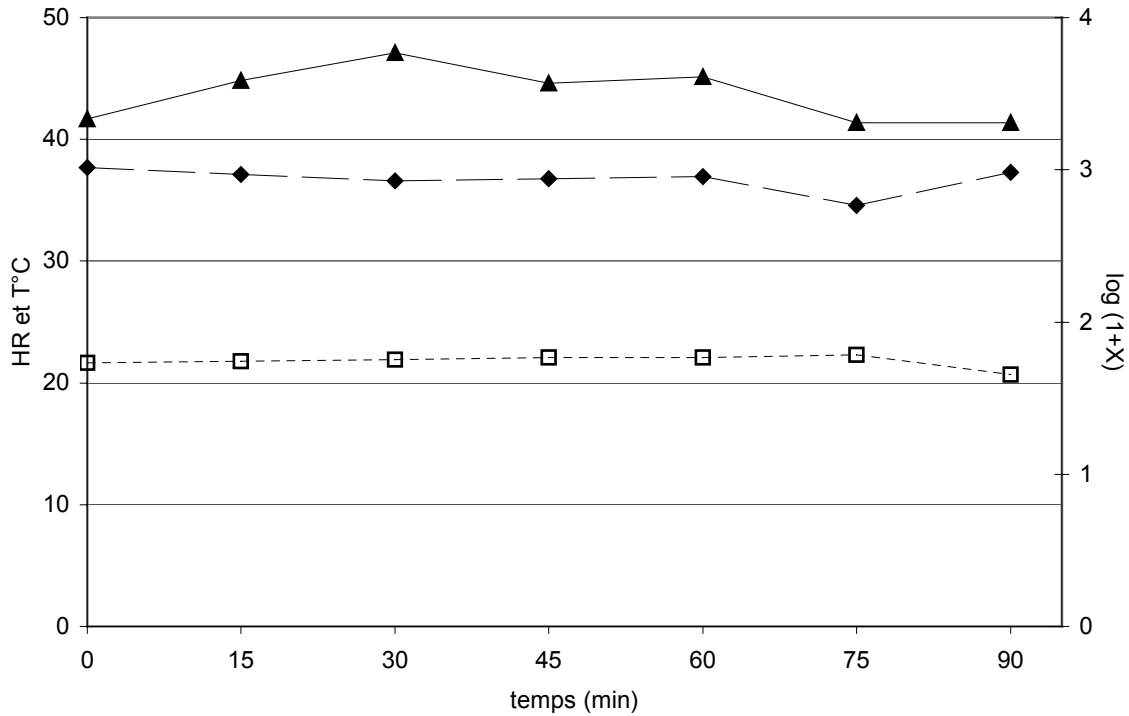


Figure 38 : Evolution de la température (♦), de l'HR (□) et de la concentration du bioaérosol (▲), au cours du temps pour un temps de séjour de 7 min 03 sec dans T10. X représente le nombre d'UFC.m⁻³ d'air et chaque courbe est le résultat d'une moyenne d'au moins 3 expérimentations.

Nous nous sommes rendu compte suite à ces manipulations qu'un temps de 30 à 45 minutes était nécessaire pour atteindre une concentration maximale en bactéries aérosolisées. Nous en tiendrons donc compte pour tous les tests à venir. Les concentrations en bactéries mesurées pendant cette phase de stabilisation ne sont pas représentées sur les Figure 37 et Figure 38.

Il est apparemment possible d'obtenir un bioaérosol de concentration constante pour les deux temps de séjour étudiés. L'état physiologique des cellules bactériennes du bioaérosol obtenu a par la suite été étudié.

I.3 Etat physiologique de la suspension bactérienne aérosolisée

Il est connu que l'aérosolisation est une condition néfaste pour les bactéries végétatives (GRIFFITHS et coll., 1996 ; HENNIGSON et coll., 1997 ; LI et LIN, 2001), c'est pourquoi nous devons au préalable étudier l'état physiologique des bactéries *E. coli* aérosolisée. Pour mener à bien ces investigations plusieurs manipulations ont été mises en place : des études de revivification des bactéries sur milieux nutritifs avec le calcul des rendements obtenus, des courbes de croissance et des analyses par CMF des bactéries aérosolisées.

I.3.1 Rendements après revivification

Le Tableau 20 reprend les résultats obtenus précédemment pour la mise au point de l'HR avec les différents rendements de revivification des bactéries après aérosolisation. Pour chaque expérimentation, la concentration initiale de la suspension bactérienne nébulisée est déterminée par dénombrement des UFC sur milieu nutritif PCA. En prenant en compte la durée du prélèvement, une estimation théorique du nombre de bactéries nébulisées est réalisée. Le rendement de revivification des bactéries, après nébulisation, est déterminé par le rapport du nombre d'UFC mesuré en sortie de banc avec le nombre total de bactéries qui ont théoriquement été nébulisées.

Tableau 20 : Corrélation entre les différents paramètres obtenus avec le dispositif d'essai sur l'air. Le débit en M20 est fixé à 0,09 mL.min⁻¹.

N° d'essai	Temps de séjour	Débit en M30 (mL.min ⁻¹)	T (°C)	HR (%)	Rendement après revivification (%)
1	4 min 42 sec	0,09	22,4 ± 2	19,1 ± 4	31,8 ± 20,6
2	4 min 42 sec	0,18	24,3 ± 2,8	27,9 ± 5,7	27,9 ± 12,0
3	4 min 42 sec	0,27	20,9 ± 0,8	42,9 ± 4,5	35,5 ± 11,0
4	7 min 03 sec	0,09	21,9 ± 1	36,6 ± 1,3	13,8 ± 2,0
5	7 min 03 sec	0,18	21,8	48	/
6	7 min 03 sec	0,27	22,1	58,2	/

Quelle que soit l'HR mesurée pour un temps de séjour de 4 min 42 sec dans T10, le rendement moyen obtenu est similaire. Il est de $31,8 \pm 20,6$ - $27,9 \pm 12,0$ et $35,5 \pm 11,0$ % pour des HR d'environ 20, 28 et 43 %. Les écarts types sont cependant très importants, ce qui montre bien l'instabilité de la viabilité des bactéries dans l'air. Ceci est confirmé avec les essais 5 et 6 pour lesquels le rendement n'a pu être calculé en raison du manque de reproductibilité des essais.

Par contre, en ce qui concerne les bactéries aérosolisées ayant subi un temps de séjour de 7 min 03 sec dans une chambre ayant une HR d'environ 37 %, le rendement bactérien chute alors à $13,8 \pm 2$ %. Le temps de séjour est un paramètre très important à prendre en compte. En effet, les essais 3 et 4 diffèrent entre eux uniquement par leur temps de séjour puisque les HR ne sont pas très différentes ; le nombre de bactéries non revivifiables après aérosolisation est réellement inférieur pour un temps de séjour supérieur.

Pour la suite des expérimentations, les analyses seront effectuées sur des bioaérosols obtenus selon les trois premiers essais pour lesquels les rendements de revivification sont les plus élevés. Il y a selon les expérimentations de grandes variations quant au pourcentage de cellules revivifiées. Nous ne prendrons donc en compte que les résultats pour lesquels le pourcentage de cellules revivifiées après aérosolisation est au minimum de 30 %.

I.3.2 Courbes de croissance

Trois prélèvements avec des membranes en gélatine ont été réalisés en sortie de dispositif à différentes HR. Les membranes ont ensuite été mises en suspension dans des milieux nutritifs liquides puis la croissance des populations recueillies a été évaluée par le suivi de l'absorbance à 580 nm.

Les courbes de croissance présentées Figure 39 montrent que les croissances de ces trois populations bactériennes aérosolisées à des HR moyennes de 22, 36 et 53 % ne sont pas très différentes. Les phases de latence sont de 9,5 - 9 et 8,6 heures et les taux de croissance sont de 0,4 - 0,35 et 0,36 h⁻¹ respectivement pour les HR de 22, 36 et 53 % (Tableau 21). La revivification des bactéries semble équivalente après aérosolisation des cellules à différentes HR. Les temps de latence et les taux de croissance sont similaires pour les trois HR testées.

Le temps de la phase de latence des bactéries (en phase stationnaire) non nébulisées et mises en culture dans un milieu nutritif liquide est au maximum de 300 minutes. L'aérosolisation a nettement augmenté ce temps de la phase de latence ce qui témoigne des dommages provoqués aux cellules.

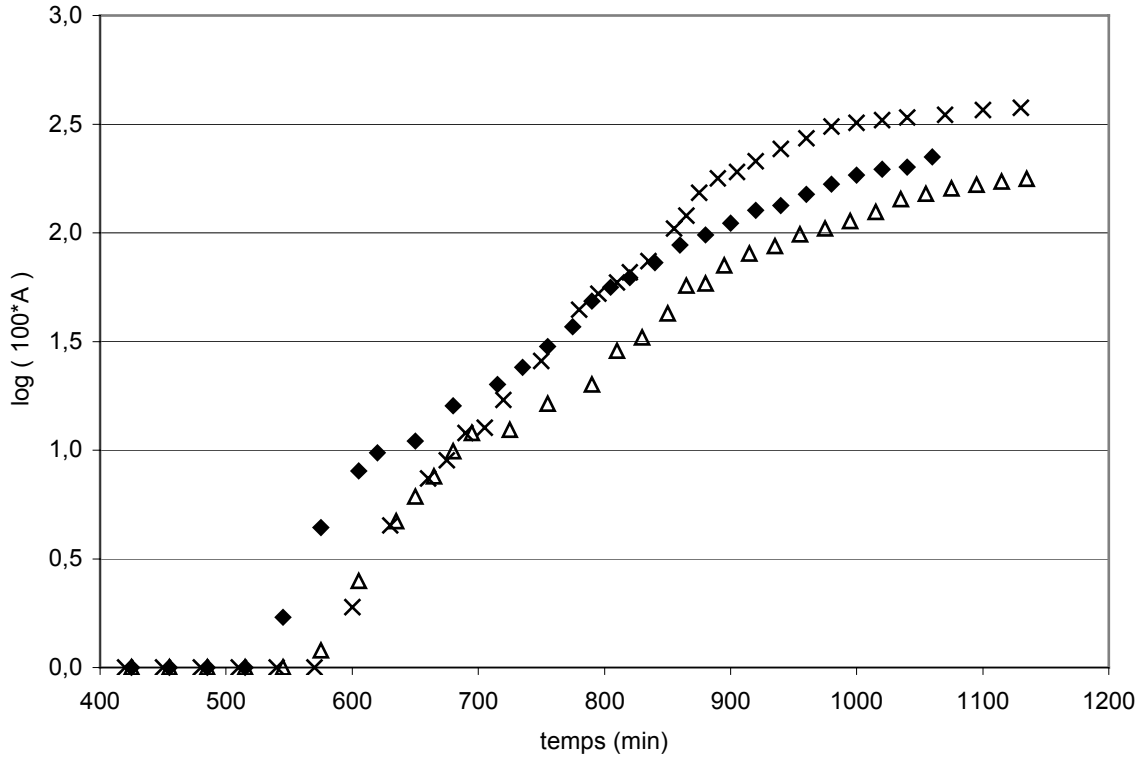


Figure 39 : Evolution au cours du temps de l'absorbance de cultures d'*E. coli* prélevées après aérosolisation à des HR de 22 % (x), 36 % (Δ) et 53 % (◆). Ces courbes sont le résultat d'une expérimentation par condition.

Tableau 21 : Paramètres des courbes de croissance effectuées avec les bactéries *E. coli* aérosolisées.

HR (%)	Taux de croissance (h ⁻¹)	Temps de la phase de latence (h)
22	0,4	9,5
36	0,35	9
52	0,36	8,6

I.3.3 CMF

Les cellules *E. coli* K12 aérosolisées à différentes HR (allant de 20 à 50 %) ont été analysées par CMF (conditions 1, 2 et 3 du Tableau 20). Ainsi leur état physiologique est comparé à celui de cellules mortes (obtenues après un chauffage de 10 minutes à 80 °C) et à celui de cellules vivantes en suspension non aérosolisées.

Les cellules aérosolisées sont prélevées sur des membranes en gélatine en sortie de dispositif. Les membranes sont ensuite dissoutes dans une eau distillée stérile thermostatée à 37°C. Après dissolution, il reste des particules de gélatine en suspension et celles-ci sont assimilées, lors de l'analyse CMF, à des événements cellulaires. C'est pour cette raison que les échantillons de cellules aérosolisées de même que les témoins ont subi un double marquage, immunologique et d'intégrité membranaire.

Le premier marquage est un immuno-marquage, qui va permettre de différencier les particules de gélatine des cellules bactériennes ; le fluorochrome utilisé est le FITC. Le second marquage est un marquage à l'IP qui va permettre d'évaluer l'intégrité membranaire des cellules du bioaérosol.

Les premières analyses ont consisté à évaluer l'interférence des particules de gélatine avec les bactéries ayant incorporé de l'IP.

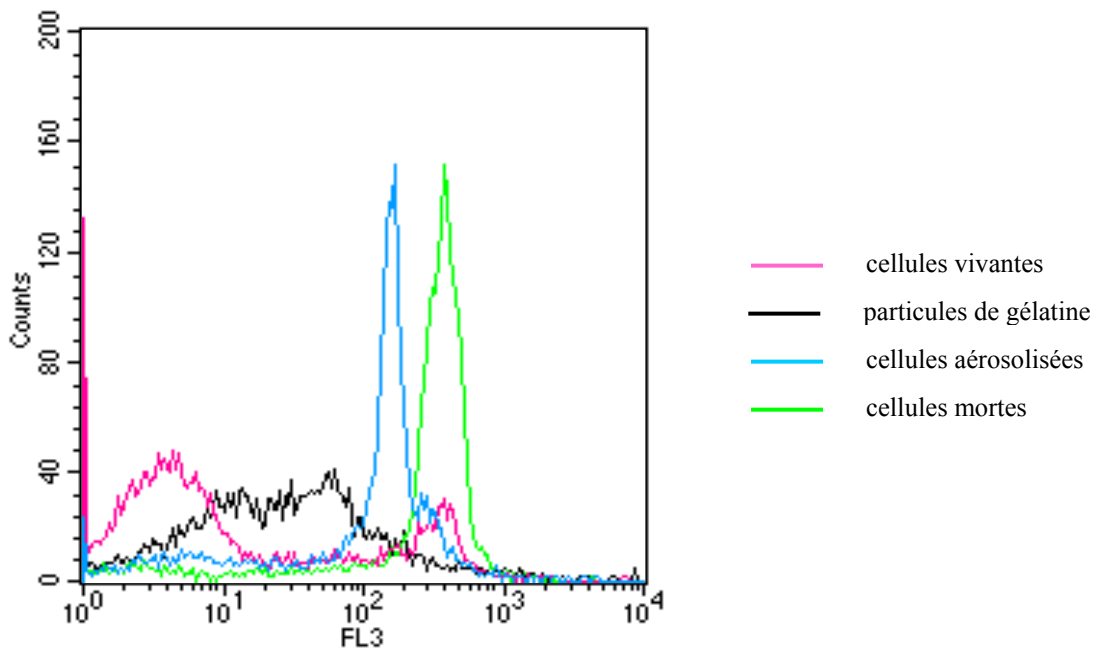


Figure 40 : Analyse par CMF des différences de fluorescence de cellules vivantes, mortes, aérosolisées et de particules de gélatine. FL3 représente l'intensité de fluorescence rouge de l'IP.

L'histogramme (Figure 40) représente les intensités de fluorescence rouge de cellules marquées à l'IP. Les cellules d'une population normale bactérienne (« cellules vivantes ») se trouvent majoritairement dans la première décade de l'échelle FL3 (pic rose). Une petite proportion de cette population a une intensité de fluorescence rouge élevée (troisième décade), elle représente la proportion de cellules mortes habituellement présentes dans une population cellulaire normale. Le monopic (vert) correspondant aux cellules mortes se situe en fin de troisième décade, il représente des cellules ayant fortement incorporé l'IP. En ce qui concerne les cellules aérosolisées, le pic leur correspondant (bleu) se situe à une intensité de fluorescence rouge en début de troisième décade. Ce pic est très distinct de celui correspondant aux cellules mortes. En raison de l'intensité de fluorescence rouge, nous pouvons considérer que ces cellules sont en voie de mortalité. Enfin, en ce qui concerne les particules de gélatine, elles présentent des intensités de fluorescence allant de la première à la troisième décade (pic noir).

Deux conclusions peuvent être tirées de cette manipulation. Tout d'abord, il est nettement possible de distinguer les cellules aérosolisées de cellules mortes grâce aux marquages à l'IP. Ensuite, il sera très difficile de distinguer les cellules aérosolisées vivantes des particules de gélatine car les particules de gélatine ont des intensités de fluorescence très étalées se superposant sur les deux premières décades.

Les cytogrammes Figure 41 représentent des populations témoins de cellules vivantes (Figure 41-c) et cellules mortes (Figure 41-b), des particules de gélatine issues de la dissolution de membrane en gélatine (Figure 41-a) et trois populations bactériennes aérosolisées à des HR moyennes de 20,4 - 31,4 et 38,6 % (Figure 41-d, e et f).

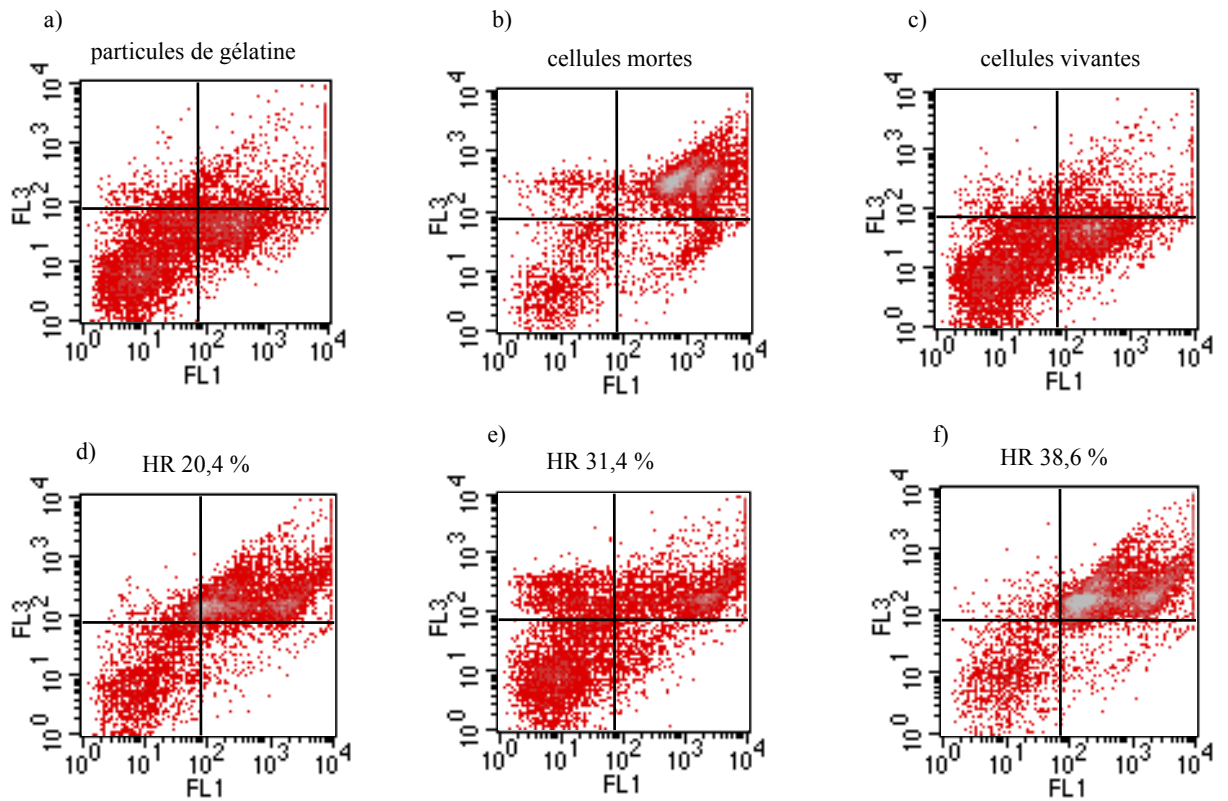


Figure 41 : Analyse par CMF de particules de gélatine (a), de cellules mortes (b), de cellules vivantes (c), et de bactéries aérosolisées (d, e et f) ayant subi un double marquage. FL1 et FL3 représentent respectivement les fluorescences du FITC et de l'IP.

Les cytogrammes sont découpés en quatre fenêtres identiques. La moitié gauche correspond à des cellules ou particules non immuno-marquées (FITC-); par conséquent, la moitié droite correspond aux événements immunologiquement marqués (FITC+). La partie basse correspond à des cellules n'ayant pas incorporé l'IP (IP-) et donc la partie haute correspond à des événements marqués à l'IP (IP+). La zone qui nous intéresse en priorité est la moitié droite des cytogrammes car ces événements correspondent aux événements marqués FITC. Les pourcentages relatifs à chaque zone sont récapitulés Tableau 22.

Tableau 22 : Pourcentage d'évènements relatifs à chaque fenêtre des cytogrammes.

Echantillon analysé	IP + FITC – (%)	IP + FITC + (%)	IP – FITC – (%)	IP – FITC + (%)
Particules de gélatine	6,4	12,8	51,5	29,3
Cellules vivantes	6,4	12,6	50,9	30,1
Cellules mortes	3,4	79,2	11,1	6,3
HR 20,4 %	10,9	65,0	20,6	3,5
HR 31,4 %	16,5	39,4	38,1	6,0
HR 38,6 %	3,2	82,0	11,7	3,1

Concernant les cellules mortes, la majorité des évènements (environ 80 %) se trouvent dans la fenêtre IP+ et FITC+. Pour les deux autres témoins, cellules vivantes et particules de gélatine, les cytogrammes sont identiques. Les pourcentages relatifs aux évènements sont similaires quelle que soit la zone du cytogramme observée. Ces résultats indiquent que la détection exhaustive des cellules aérosolisées correspondant à la fenêtre FITC+/IP- (cellules vivantes n'ayant pas perdu leur intégrité membranaire) va être très difficile. Nous pouvons émettre l'hypothèse que des cellules aérosolisées vivantes ne soient pas marquées au FITC en raison de la présence de particules de gélatine qui pourrait empêcher l'accès du FITC aux sites membranaires reconnus par le FITC.

Concernant les trois essais avec les cellules aérosolisées, la majorité des évènements se situe dans la zone IP+/FITC+. Environ 65, 40 et 82 % des évènements se trouvent dans cette fenêtre respectivement pour les HR de 20,4 - 31,4 et 38,6 %. Il est donc difficile de dire si la variation de l'HR modifie l'état physiologique des bactéries aérosolisées mais il apparaît clairement que les cellules aérosolisées subissent des dommages au niveau de leurs membranes.

Afin de mieux estimer l'état physiologique des cellules, c'est-à-dire pour limiter les interférences avec les particules de gélatine, des essais réalisés sans immuno-marquage ont été entrepris. Les mêmes échantillons que ceux cités précédemment ont été analysés par CMF après un simple marquage à l'IP (Figure 42).

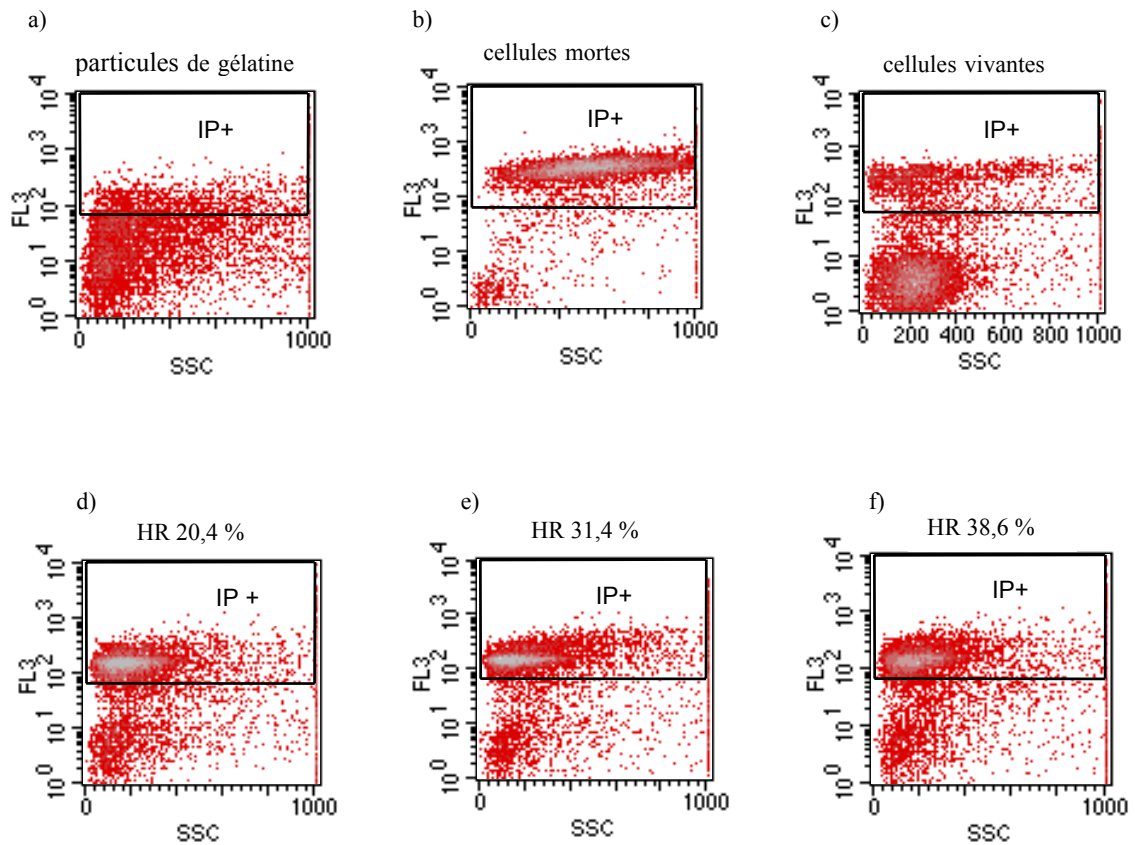


Figure 42 : Analyse par CMF de l'intégrité membranaire par CMF de particules de gélatine (a), de cellules mortes (b), de cellules vivantes (c) et de bactéries aérosolisées (d, e et f).

Les particules de gélatine ne fixent pas beaucoup l'IP, environ 25 % des événements se situent dans la zone intitulée IP+ (Figure 42-a), cette zone correspond aux intensités de fluorescence rouge des deuxième et troisième décades. Les cellules mortes se trouvent comme attendu dans la zone IP+ (Figure 42-b), et les cellules vivantes dans la zone IP- (Figure 42-c). En ce qui concerne les trois populations bactériennes aérosolisées (Figure 42-d, e et f), elles incorporent moins l'IP que des cellules mortes « témoin » puisqu'elles ont des intensités de fluorescence moindres. Les proportions de cellules dans la zone IP+ sont similaires pour les trois humidités testées, 75, 77 et 82 % (respectivement pour les HR de 20,4 - 31,4 et 38,6 %). Les 3 profils sont identiques et les pourcentages déterminés dans la zone IP+ montrent bien qu'il n'y a pas de différence après aérosolisation aux trois HR testées. Cependant, la comparaison des pourcentages d'événements IP+, déterminé pour le même échantillon à 31,4 % d'HR, après un double marquage (environ 56 %, Tableau 22) ou après un simple marquage (77 %, Figure 42-e), permet de confirmer que le double marquage préalablement réalisé n'est

pas encore totalement optimisé. Il est évident que ce sont les particules de gélatine non solubilisées qui créent des artefacts.

Bien que le protocole de marquage ne soit pas totalement optimisé, ces résultats confirment que la variation d'HR, entre 20 et 50 %, n'entraîne pas de variation notable de l'état physiologique des bactéries aérosolisées. Il est à rappeler que le phénomène d'aérosolisation provoque des dommages aux membranes des cellules et que cette contrainte physique soit la principale cause responsable de dommages provoqués aux cellules.

I.4 Conclusion

Deux paramètres sont à prendre en compte pour l'étude d'un bioaérosol. Le premier est un paramètre physique, c'est-à-dire le comportement du microbe en tant que particule, le second est d'ordre biologique c'est-à-dire la capacité de la bactérie à survivre dans un aérosol (WILLEKE et coll., 1995 ; HENNINGSON et coll., 1997). Obtenir un bioaérosol est beaucoup plus complexe qu'obtenir un aérosol car pour ce dernier le résultat ne dépend que des propriétés physiques des particules (FOLMSBEE et coll., 2000).

Même si *E. coli* n'apparaît pas être le modèle le plus approprié pour la formation et l'étude d'aérosols (GRIFFITHS et coll., 1996 ; HENNINGSON et coll., 1997 ; LI et LIN, 2001), les résultats présentés montrent qu'il est possible de créer un bioaérosol de concentration constante pendant plus d'une heure, avec un rendement moyen de survie des bactéries (environ 30 %), à des HR variant de 20 à 50 % et pour un temps de séjour de presque 5 minutes. Cette donnée n'est pas valable lorsque le temps de séjour est supérieur à 7 minutes puisque le rendement de survie chute alors à environ 14 %. Jusqu'à maintenant les études réalisées sur la génération d'aérosol de bactéries *E. coli*, montraient une décroissance de la concentration en cellules jusqu'à une concentration nulle (GRIFFITHS et coll., 1996 ; HENNINGSON et coll., 1997). L'aérosolisation semble affecter la structure des cellules et causer un stress qui soit irréversible.

L'HR est également très importante pour la survie des germes au sein d'un bioaérosol. En ce qui concerne les bactéries, il existe une différence entre les bactéries à Gram positif et

celles à Gram négatif. Pour une bactérie comme *E. coli*, plus l'HR est élevée et plus la létalité est élevée. Il a été montré que la plupart des bactéries à Gram négatif associés aux aérosols tendaient à survivre plus longtemps dans des atmosphères à faible HR. En revanche, les bactéries à Gram positif, survivent mieux dans des HR plus élevées. La différence de capacité de survie vient de la composition biochimique de la membrane cellulaire (DOWD et MAIER, 1999). Un des mécanismes pouvant expliquer ce phénomène est un changement structural de la bicouche lipidique de la membrane cellulaire. Cette modification affecte la configuration des protéines de surface et aboutit finalement à la mort de la cellule (DOWD et MAIER, 1999).

Au cours de notre étude, nous avons vu que la variation d'HR influence peu la revivification des bactéries dans une gamme d'HR variant de 20 à 50 % et pour un temps de séjour de 4 min 42 sec. Lorsque celui-ci passe à environ 7 minutes, la revivification d'*E. coli* est fortement altérée puisque le rendement chute de moitié. Dans la gamme d'HR testée, c'est la combinaison « HR-temps d'exposition » qui est importante. Un temps de séjour plus court (inférieur à 4 minutes) aurait probablement amélioré le rendement de survie des bactéries.

La température est bien sûr étroitement liée à l'HR, mais il est peu probable que les températures auxquelles nous avons travaillé, 20-25°C, influencent la revivification des bactéries.

D'autres facteurs sont également importants à considérer tels que le mode de génération du bioaérosol. Nous avons pour cela utilisé un nébuliseur et de l'AC qui entre 1 à 2 bars n'a pas d'influence sur la viabilité des cellules (GRIFFITHS et coll., 1996). Certains auteurs estiment que l'aérosolisation des cellules est la phase la plus néfaste sur la viabilité des cellules car c'est cette étape qui engendre le plus de dommages aux cellules. Le stress provoqué par cette technique (toxicité de l'oxygène pour certains microorganismes et surtout le phénomène de dessiccation brutale) est généralement irréversible pour de nombreux microorganismes et tout particulièrement pour les bactéries végétatives (GRIFFITHS et DeCOSEMO, 1994 ; GRIFFITHS et coll., 1996 ; FOLMSBEE et coll., 2000).

Enfin le dernier point concerne la méthode d'échantillonnage, en particulier la vitesse de prélèvement, la durée de prélèvement et le type d'échantillonneur. Plus la vitesse est élevée et plus la létalité est élevée (STEWART et coll., 1995). Pour pallier, au mieux, aux contraintes de vitesse et de durée de prélèvement, ils ont été réalisés en isocinétie et sur des

temps de 1 à 2 minutes afin de limiter les phénomènes de dessiccation du milieu de prélèvement. FOLMSBEE et collaborateurs (2000) avaient obtenu les meilleurs rendements après aérosolisation pour des temps de prélèvements de 2 minutes. Enfin, concernant le préleveur et par conséquent le support d'échantillonnage, nous avons choisi un prélèvement par filtration. A l'inverse des impacteurs, cette technique permet une grande efficacité de collecte car les contraintes physiques imposées aux cellules sont moindres (WANG et coll., 2001). De plus la membrane en gélatine utilisée semble protéger les bactéries des phénomènes de dessiccation.

En conclusion, nous pouvons dire que même si *E. coli* n'est pas dans son habitat naturel, le pilote mis au point permet d'obtenir un bioaérosol stable dans le temps, tant d'un point de vue de la concentration en bactéries que de l'HR et de la température. Même si l'aérosolisation crée des dommages aux membranes des cellules bactériennes, le taux de revivification atteint environ 30 % pour un temps de séjour de l'ordre de 5 minutes. Ceci permet par conséquent d'envisager l'utilisation du pilote pour la mise au point d'un traitement décontaminant à base d'eau « traitée » par FCA.

II VALIDATION DU PRINCIPE DE DECONTAMINATION PAR AEROSOLS (H₂O₂)

La mise au point du banc, en terme de génération d'un bioaérosol stable, a été effectuée. Le principe de décontamination par utilisation d'aérosol bactéricide pour décontaminer un air artificiellement contaminé a par la suite été validé. Pour cela nous avons utilisé le dispositif avec un temps de séjour de 4 min 42 sec, et des débits identiques en M20 et en M30 fixés à environ 0,09 mL.min⁻¹. Cette validation a été réalisée en procédant de deux façons. La première technique a été de générer un bioaérosol dans la chambre de mélange puis d'aérosoliser dans cette atmosphère une solution bactéricide connue, l'eau oxygénée. La seconde technique a consisté à créer une atmosphère bactéricide, par nébulisation d'H₂O₂, dans la chambre de mélange et d'aérosoliser ensuite des bactéries. Dans les deux expérimentations, l'aptitude à la revivification des bactéries est suivie au cours du temps.

La Figure 43 montre la capacité de décontamination d'une eau oxygénée sur un bioaérosol artificiellement généré. Le temps t=0 minute correspond au moment à partir duquel

l'agent bactéricide est nébulisé, la concentration en bactéries a auparavant été stabilisée. Les résultats montrent que la température ($23,6 \pm 1,8 \text{ }^\circ\text{C}$) et l'HR ($18,5 \pm 2,4 \%$) restent constantes durant toute la manipulation et que dès l'injection de l'eau oxygénée, la concentration bactérienne décroît brutalement. Peu après l'aérosolisation du bactéricide une décontamination totale est obtenue, soit après environ 15 minutes.

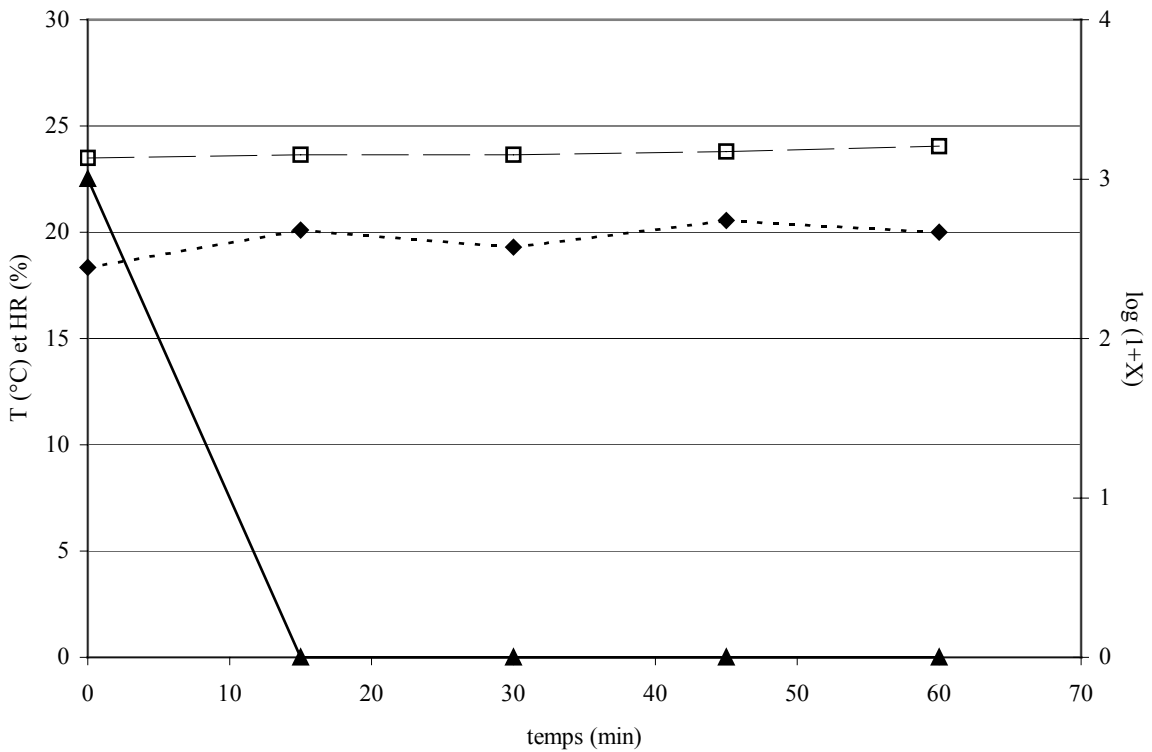


Figure 43 : Evolution de la température (♦), de l'HR (□) et de la concentration du bioaérosol d'*E. coli* (▲), au cours du temps pour un temps de séjour de 4 min 42 sec dans T10 après décontamination du bioaérosol avec de l'eau oxygénée.

X représente le nombre d'UFC.m⁻³ d'air et chaque courbe est le résultat d'une moyenne d'au moins 3 expérimentations.

L'évolution du nombre d'UFC.m⁻³ d'air dans une atmosphère préalablement saturée en eau oxygénée est donnée sur la Figure 44. L'agent bactéricide a été aérosolisé pendant au moins 30 minutes puis ensuite les bactéries ont été nébulisées. Le temps de manipulation est plus long que pour la précédente expérimentation car il faut tenir compte du délai nécessaire à l'obtention d'une concentration constante en bactéries dans la chambre de mélange. D'après la mise au point réalisée au préalable, un bioaérosol généré avec notre dispositif doit avoir atteint 10³ bactéries.m⁻³ d'air après 30 à 45 minutes. Or, au vu de ces résultats nous

remarquons que la concentration en bioaérosol reste très faible puisque les mesures indiquent une concentration résiduelle en bactéries de l'ordre de quelques dizaines par rapport à une concentration de 10^3 cellules.m⁻³ normalement attendue pour le bioaérosol. Les paramètres de température ($20,5 \pm 0,2$ °C) et d'HR ($32,9 \pm 4,2$ %) sont constants tout au long de la manipulation.

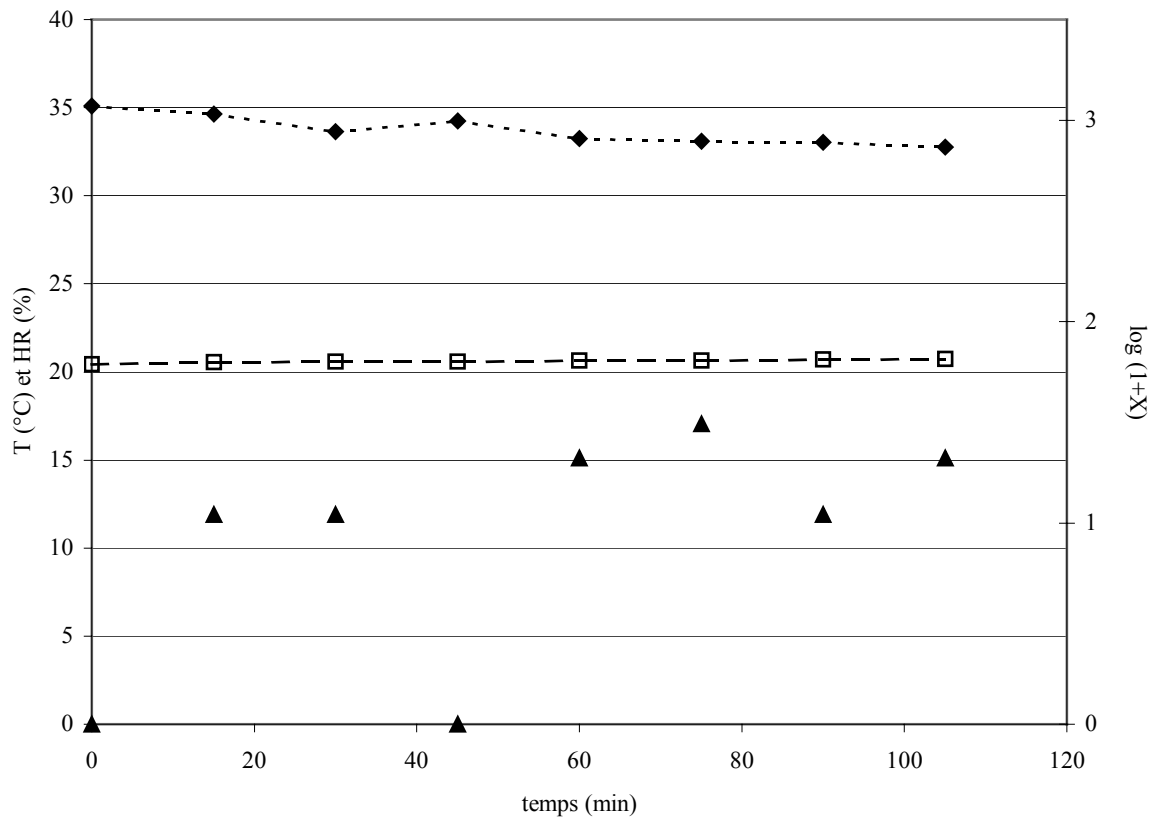


Figure 44 : Evolution de la température (♦), de l'HR (□) et de la concentration du bioaérosol d'*E. coli* (▲), au cours du temps pour un temps de séjour de 4 min 42 sec dans T10 dans une atmosphère saturée en eau oxygénée.

X représente le nombre d'UFC.m⁻³ d'air et chaque courbe est le résultat d'une moyenne d'au moins 3 expérimentations.

Les deux méthodes de traitement utilisées avec l'eau oxygénée permettent de valider le dispositif expérimental mis au point. La configuration du banc permet de décontaminer un air artificiellement contaminé.

III ESSAIS DE DECONTAMINATION DE L'AIR AVEC FCA06

III.1 Mise au point de la concentration en substances germicides de l'eau « traitée »

Le but de ces expérimentations est de mettre au point un procédé de décontamination de l'air basé sur l'utilisation d'eau « traitée » par FCA. Pour cela nous avons choisi d'utiliser FCA06 qui montre de très bonnes propriétés de décontamination en phase aqueuse. Il est à noter que ces essais ont été réalisés en parallèle des essais effectués en phase aqueuse, c'est pour cela que les conditions les plus performantes n'ont pas été testées en premier. L'évolution temporelle des conditions expérimentales utilisées pour les essais de décontamination de l'air a suivi celle des travaux réalisés en phase aqueuse.

Le principe est de nébuliser un aérosol d'eau « traitée » par FCA06 sur un bioaérosol créé artificiellement. Les potentialités de décontamination de l'aérosol chargé en substances germicides sont ensuite évaluées par dénombrement des UFC sur milieu nutritif. L'eau « traitée » est générée dans le circuit parallèle composé de T60, T70 et P80 (Figure 15). La procédure expérimentale générale est décrite Partie 2-IV.3.

Les paramètres décrits ci-dessous ne varient pas quelles que soient les conditions expérimentales de nébulisation de l'eau « traitée » décrites Figure 45 :

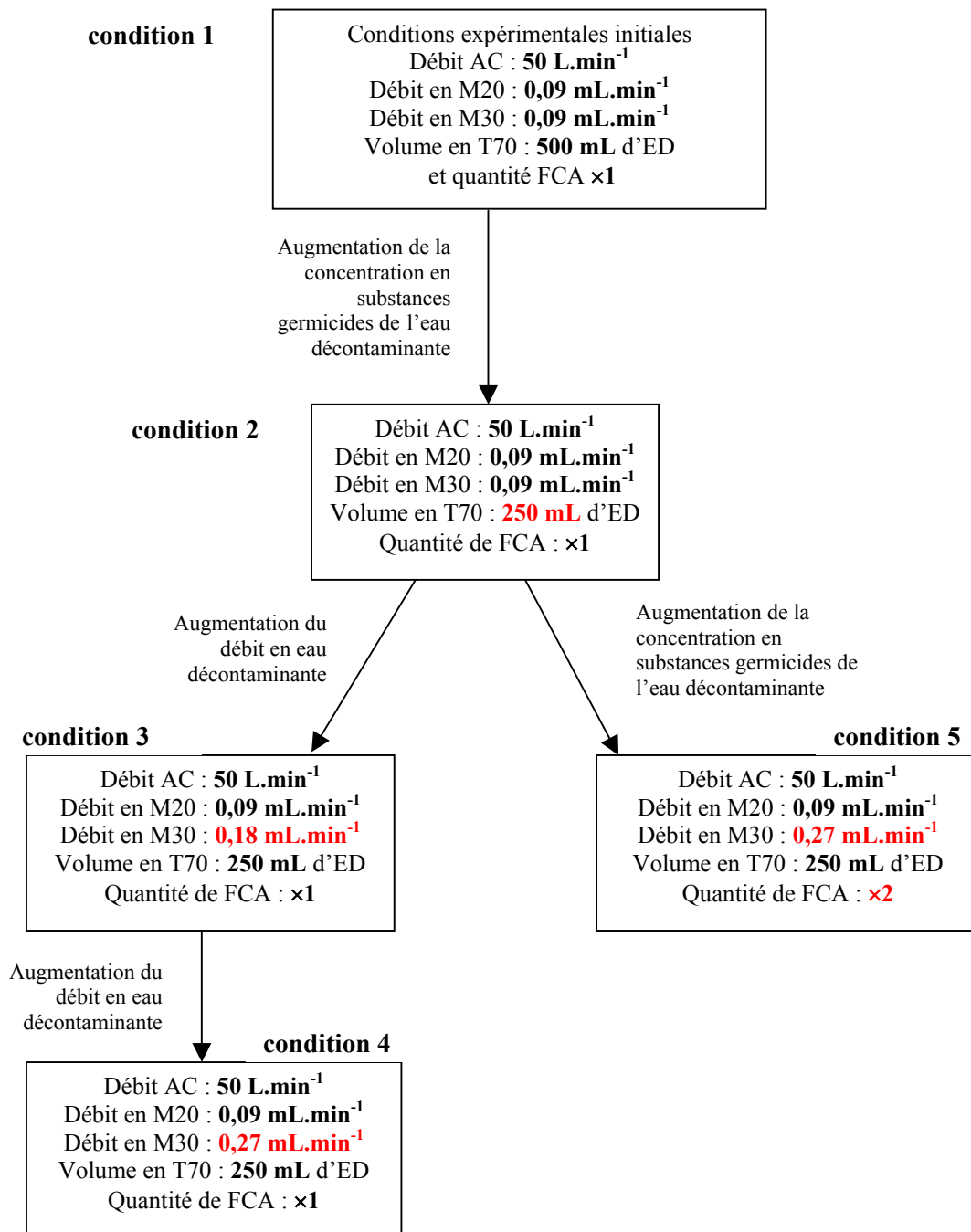
- le circuit fermé composé de T60, T70 et P80 fonctionne à un débit de $70 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$.
- le temps de génération de l'eau « traitée », également appelé temps de circulation, est de 60 minutes.
- la chambre de mélange est conçue selon la configuration 4 (Annexe 5), ce qui correspond à un volume de 235 L et un temps de séjour de 4 min 42 sec.

Afin de créer une eau suffisamment concentrée en substances germicides, plusieurs paramètres expérimentaux ont été modifiés de façon temporelle (Figure 45) et les différentes combinaisons retenues ont été testées. L'objectif consiste à rechercher la combinaison qui permet d'accroître l'apport en substances germicides dans la chambre de mélange. Pour cela, deux procédures sont mises en place : augmenter la concentration en substances germicides

de l'eau « traitée » (diminution du volume d'eau qui circule par le dispositif ou augmentation de la quantité de FCA06 sur laquelle circule l'eau) ou augmenter le volume d'eau germicide nébulisée (augmentation du volume nébulisé en M30).

Le paramètre qui a été modifié entre les conditions 1 et 2 (Figure 45) est le volume de liquide contenu dans T70 et circulant dans le circuit fermé parallèle (T60-T70-P80), qui a été réduit de 500 à 250 mL. Par la suite, le débit de l'eau « traitée » nébulisée en M30 a été augmenté, ce qui correspond aux configurations 3 et 4 (Figure 45).

Entre les conditions 2 et 5, le débit et le volume d'eau ne sont pas modifiés. Par contre, la quantité de FCA06 sur laquelle circulait l'eau distillée stérile est doublée.



ED : Eau Distillée

AC : Air Comprimé

M20 : buse servant à pulvériser la suspension bactérienne (le débit est toujours fixe)

M30 : buse servant à pulvériser l'eau distillée ou l'eau « traitée » selon les essais

×1 : correspond à l'équivalent d'un réacteur T60 rempli de FCA06

Les paramètres qui varient d'un essai à l'autre sont indiqués en rouge.

Figure 45 : Représentation schématisée de l'évolution des paramètres expérimentaux au fur et à mesure de l'avancée des tests de décontamination de l'air avec FCA06.

Les résultats de ces différents tests liés à la mise au point du procédé de décontamination de l'air sont récapitulés Tableau 23 et Figure 46.

Le Tableau 23 reprend les paramètres HR et températures moyennes mesurées lors des expérimentations. De façon générale, et comme déjà montré lors de la mise au point de ces paramètres (Partie 3-chapitre 2 I.I.1), les pourcentages d'HR augmentent avec l'augmentation de la quantité de liquide aérosolisée en M20 et M30. Cette variation d'HR ne sera pas prise en compte pour la comparaison des résultats obtenus dans les différentes conditions expérimentales, car les conclusions précédentes montrent que la variation d'HR entre 20 et 50 %, pour un temps de séjour de 4 min 42 sec, n'a pas d'incidence sur la revivification des bactéries aérosolisées (Partie 3-chapitre 2 I.I.4).

Tableau 23 : Températures et HR moyennes mesurées au cours des essais réalisés dans les conditions 1 à 5.

	Condition 1	Condition 2	Condition 3	Condition 4	Condition 5
HR moyenne (%)	15,8	18,8	22,7	42,8	48,5
T moyenne (°C)	26,2	24,3	26,3	21,7	20,4

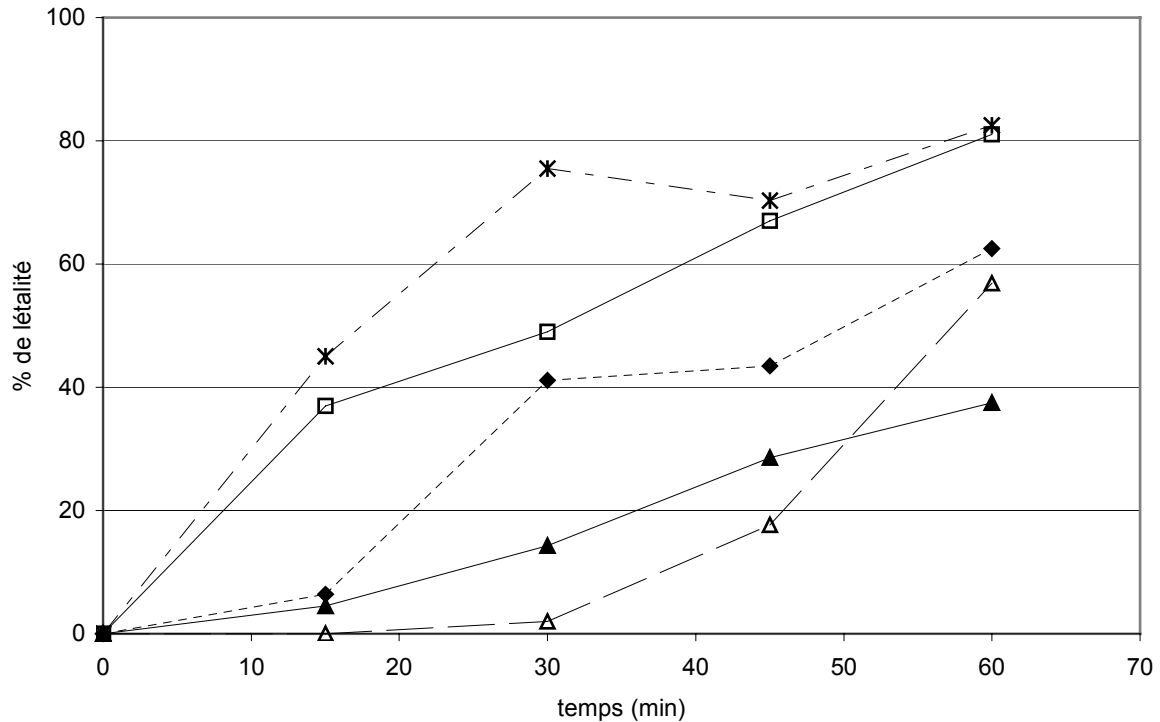


Figure 46 : Evolution du pourcentage de létalité des bactéries selon les conditions 1 (▲), 2 (Δ), 3 (□), 4 (◆) et 5 (×).

Chaque courbe est le résultat d'une moyenne d'au moins 2 expérimentations.

Les pourcentages de létalité obtenus selon les conditions testées sont récapitulés Figure 46. Les pourcentages de létalité sont de 38, 57, 81, 63 et 83 % respectivement pour les conditions allant de 1 à 5. D'un point de vue général, il apparaît que plus l'apport en substances germicides est accru et plus la létalité des bactéries est importante, ceci excepté pour les conditions 3 et 4. Il est donc nécessaire de continuer dans cette « direction » afin d'essayer d'augmenter la concentration de l'eau « traitée » en substances germicides.

Les résultats obtenus avec ces différentes configurations ne peuvent cependant pas être considérés comme satisfaisants en terme de décontamination du bioaérosol puisque nous obtenons un abattement de 80 % après 1 heure dans les meilleures conditions. Ces résultats, obtenus à l'aide d'une eau « traitée » qui a circulé pendant 60 minutes sur FCA06 avant nébulisation, confirme toutefois que des substances germicides sont générées.

D'autres conditions ont été mises en place.

Ces substances germicides probablement de type ROS (Partie 3-Chapitre 1-II) ayant une durée de vie courte, nous pouvons avancer l'hypothèse qu'elles disparaissent au fur et à mesure de leur formation. De plus, nous avons précédemment démontré que l'aptitude de la FCA à générer des ROS décroît au cours du temps (Partie 3-Chapitre 1-I.2). Pour ces raisons, dans la suite des essais, le temps de génération de l'eau traitée avant sa nébulisation dans le banc à air a été réduit de 60 à 15 minutes.

Cette condition expérimentale, non présentée Figure 45 et que nous appellerons condition 6, est basée sur la condition 2. Les paramètres sont identiques, seul le temps de circulation en circuit parallèle fermé est réduit à 15 minutes.

Les résultats obtenus selon la condition expérimentale 6 (non présentés) montrent un pourcentage de létalité d'environ 40 % après 60 minutes de temps de contact entre le bioaérosol et l'eau « traitée ». Ce pourcentage augmente de façon constante et atteint 83 % après environ 200 minutes d'expérimentation. L'accroissement du pourcentage de létalité au cours du temps, en relation avec l'injection du bioaérosol à débit constant, montre que la saturation et/ou la stabilisation de la chambre de mélange en substances germicides n'est pas obtenue immédiatement après le début de la nébulisation de l'eau « traitée ».

L'HR et la température moyennes relevées tout au long de l'expérimentation sont constantes et respectivement de $20,3 \pm 2$ % et $21,5 \pm 0,8$ °C. La réduction du temps de génération de l'eau « traitée » de 60 à 15 minutes n'a pas amélioré les capacités de décontamination du bioaérosol puisqu'en condition 2 (Figure 46), le pourcentage de létalité obtenu après 60 minutes était de l'ordre de 55 %.

Au vu de ces résultats qui ne montrent pas de différence significative entre les conditions 2 et 6, nous pouvons toujours émettre l'hypothèse que les ROS disparaissent au fur et à mesure de leur génération. Pour cette raison, les dernières conditions expérimentales seront testées avec de l'eau « traitée » qui sera générée de façon extemporanée.

Ainsi, dans les conditions 7 et 8 (génération extemporanée de l'eau « traitée ») l'eau distillée stérile circule sur 2,5 g de FCA06 sèche à un débit de $0,09 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$ en circuit ouvert pour la condition 7 et à un débit de $2,7 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$ pour la condition 8. L'eau « traitée » est nébulisée au fur et à mesure de sa génération aux débits cités ci-dessus.

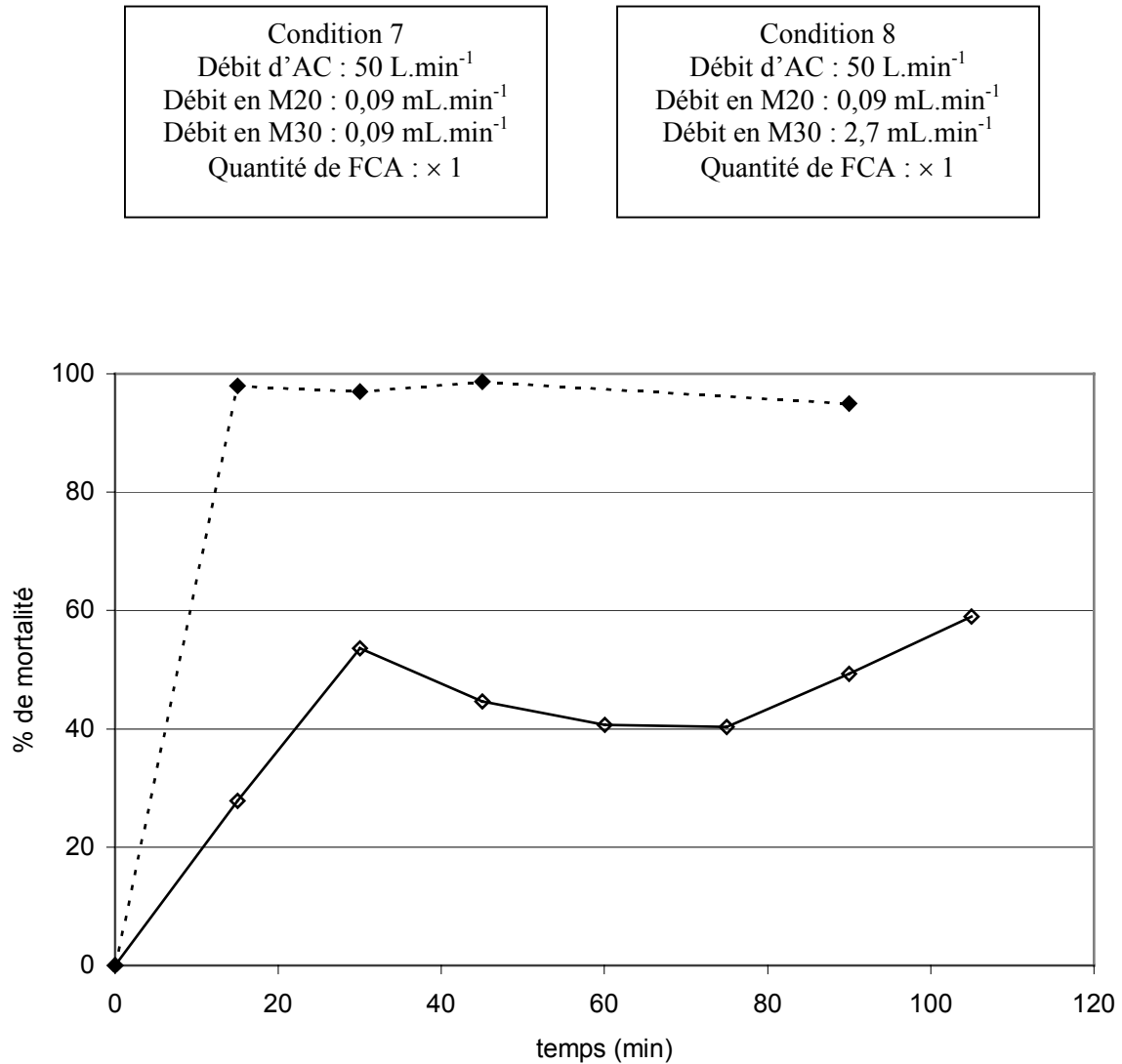


Figure 47: Evolution du pourcentage de létalité des bactéries selon les conditions 7 (◇) et 8 (◆). Chaque courbe est le résultat d'une moyenne d'au moins 3 expérimentations.

En ce qui concerne la condition 7, l'HR et la température moyennes sur toute la durée de la manipulation sont respectivement de $23,2 \pm 5 \%$ et $27,6 \pm 0,1 \text{ °C}$ et le pourcentage de létalité atteint 60 % après 30 minutes de temps de contact entre le bioaérosol et l'eau « traitée », il reste constant pendant toute la durée de l'expérience (Figure 47). Le pourcentage de létalité maximum est atteint dès 30 minutes de temps de contact ce qui signifie que l'atmosphère dans la chambre de mélange est saturée en eau « traitée » et donc stabilisée.

En ce qui concerne la condition 8, l'HR et la température moyennes sur toute la durée de la manipulation sont respectivement de $60,1 \pm 2,6 \%$ et $25 \pm 0,6 \text{ °C}$. Le pourcentage de létalité augmente brutalement jusqu'à plus de 95 % après 15 minutes de nébulisation de l'eau

« traitée », ce qui signifie que l'atmosphère est rapidement stabilisée. Il reste ensuite constant entre 95 et 99 % tout au long de l'expérimentation. La stabilisation de l'atmosphère est obtenue plus vite en condition 8 qu'en condition 7. Ceci peut s'expliquer par le fait que la concentration en substances germicides est plus importante en condition 8 car même si le poids de FCA est identique, le débit d'eau « traitée » nébulisée est triplé dans cette dernière condition.

Le fait que l'on obtienne pas de décontamination totale en milieu gazeux comparativement aux résultats obtenus en milieu aqueux peut être expliqué par le fait que les ROS générés diffusent moins facilement dans l'air que dans l'eau et que « l'entretien » des réactions de formation des ROS est probablement moins aisé en raison de la plus faible HR. Les réactions en cascade sont peut-être moins favorisées et donc le renouvellement des ROS en chambre de mélange est diminué. Il est également à noter que le temps de contact, en condition aérosolisée, entre les microorganismes et l'eau « traitée » (de l'ordre de 5 minutes) est très inférieur à ceux étudiés lors des tests de germicidie (de l'ordre de 30 à 60 minutes) (Chapitre 2, I.2.2).

Deux solutions sont désormais possibles pour augmenter l'apport en substances germicides et donc envisager une amélioration de la décontamination du bioaérosol :

- augmenter le poids de FCA
- ou augmenter le débit en eau « traitée ». Le dernier cas est plus difficilement envisageable. Premièrement à cause de restrictions techniques, dans la configuration actuelle du pilote expérimental nous ne pouvons plus augmenter le débit d'eau « traitée ». Et deuxièmement en raison de la contrainte qui serait engendrée par un poids d'eau trop important lors de l'embarquement d'un tel système.

III. 2 Test de vieillissement accéléré

La dernière condition que nous avons testée (condition 8), où l'eau « traitée » est générée extemporanément, est celle qui montre les meilleures capacités de décontamination. Un test de vieillissement, qui consiste à expertiser les capacités de la FCA à générer des ROS au cours du temps, a donc été effectué pendant 5 jours. Durant cette période de l'eau circule continuellement sur 2,5 g de FCA06 sèche au débit de $0,27 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$. Cette eau « traitée » est

ensuite directement nébulisée dans T10 au débit de $2,7 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$. La suspension bactérienne servant à générer le bioaérosol est ajustée à une concentration initiale de $7 \cdot 10^2 - 10^3$ cellules. mL^{-1} et elle est renouvelée toutes les 24 heures. Les prélèvements d'échantillon d'air sont effectués sur membrane en gélatine, une fois que la concentration du bioaérosol est stabilisée. Ils sont réalisés quotidiennement sur une tranche horaire d'environ 500 minutes.

Sur la totalité de l'expérimentation (5 jours), l'HR et la température moyennes restent constantes et sont respectivement de $66,8 \pm 6,8 \%$ et $23,7 \pm 1,8^\circ\text{C}$.

De façon générale et quel que soit le jour, le pourcentage de létalité du bioaérosol augmente dès le début de l'expérimentation et reste constant sur la totalité de la tranche horaire (Figure 48). Ces résultats montrent que la stabilisation de l'atmosphère est rapidement obtenue dans la chambre de mélange. La première tranche horaire (premier jour) montre un pourcentage de létalité de $96 \pm 3,4 \%$, le deuxième jour il est de $84 \pm 6 \%$, le troisième jour il se situe à $48,2 \pm 4,4 \%$, puis diminue à $33 \pm 5,5 \%$ le quatrième jour et est quasiment inexistant le dernier jour ($8 \pm 5,8 \%$).

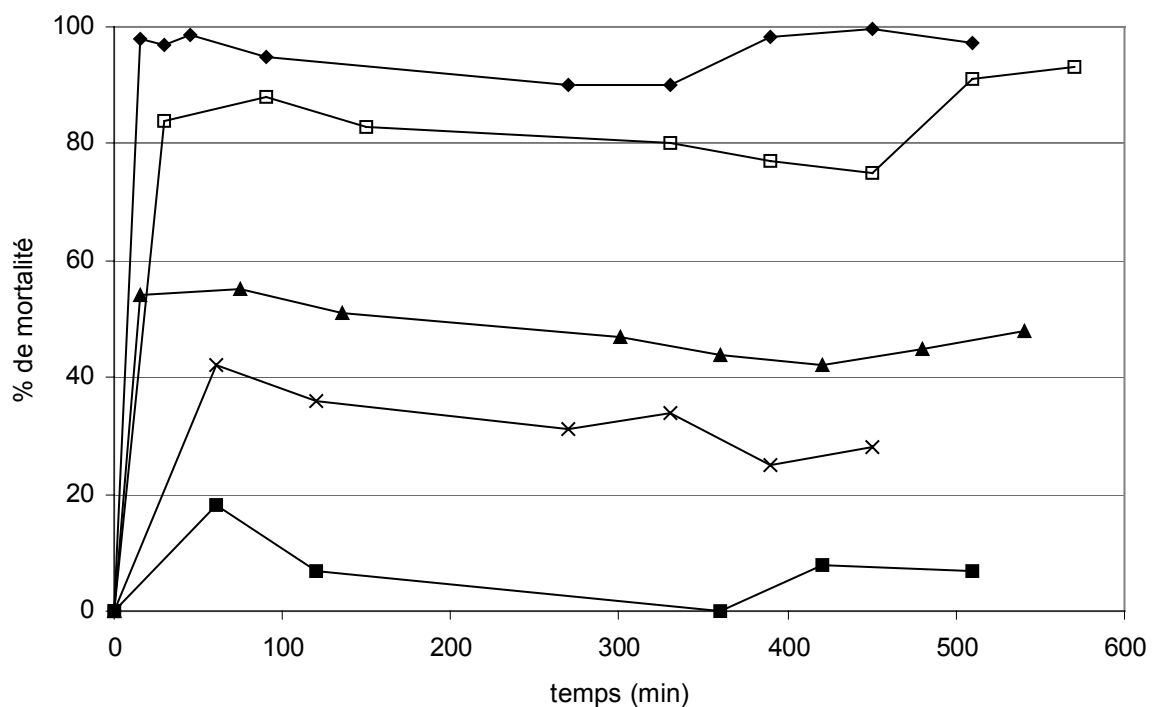


Figure 48 : Evolution du pourcentage de létalité après 24 (◆), 48 (□), 72 (▲), 96 (×) et 120 heures (■) de circulation d'eau distillée stérile sur FCA06, en continu. La courbe est le résultat d'une expérimentation.

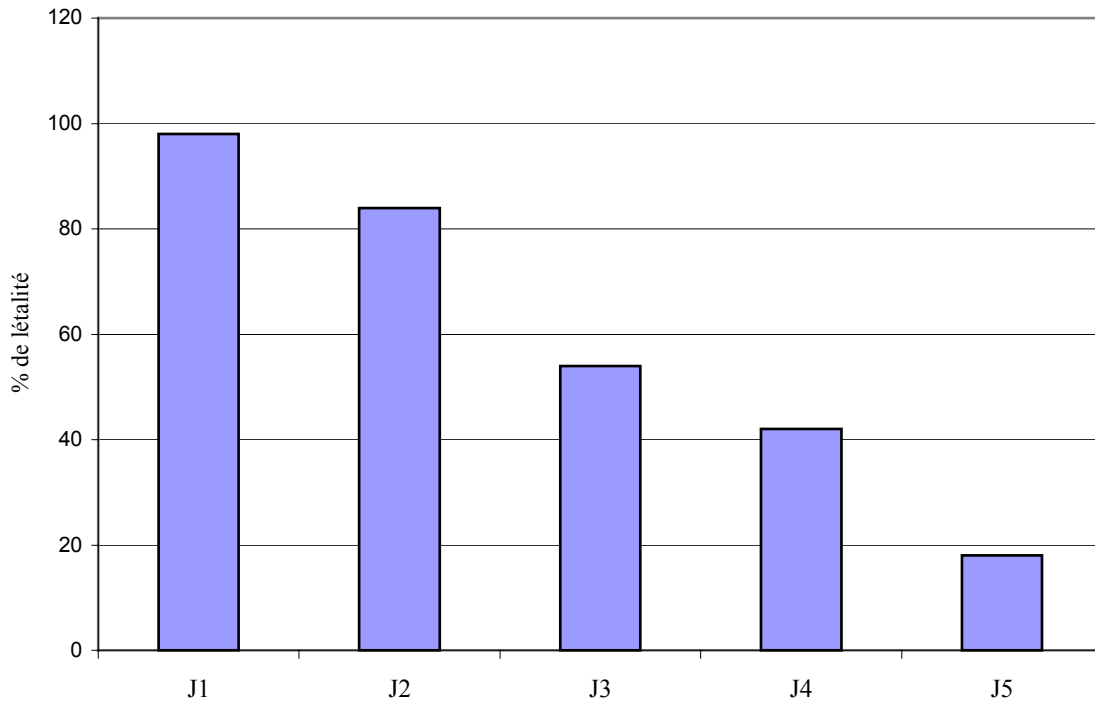


Figure 49 : Evolution des pourcentages de létalité après 30 minutes de temps de contact entre le bioaérosol et l'eau « traitée » extemporanément par FCA06.

L'effet décontaminant de l'eau « traitée » diminue au cours du temps, après 3 jours la capacité décontaminante de l'échantillon n'est plus que d'environ 50 %, soit environ la moitié de sa capacité de décontamination de départ. Après 5 jours d'utilisation en continu, la capacité de décontamination est quasiment nulle (Figure 49). La FCA perd donc ses capacités à générer des ROS au cours du temps.

De façon comparable aux résultats de vieillissement accéléré obtenu en milieu aqueux (Figure 24), la diminution des capacités décontaminantes de l'échantillon de FCA06 est régulière et constante. L'hypothèse d'un appauvrissement de l'argent imprégné suite à un phénomène d'éluion pourrait expliquer cette perte d'activité.

III. 3 Applicabilité – Simulation

Le dernier point des travaux a consisté à extrapoler à l'échelle industrielle les résultats obtenus sur le banc air en vue de préjuger des potentialités d'utilisation d'un tel procédé pour la décontamination de l'air dans une cabine d'avion. Cette simulation, certes sommaire, doit permettre d'évaluer les potentialités d'applicabilité d'un tel système en conditions réelles.

Cette simulation nécessite de calculer les quantités d'eau à traiter qui devront être embarquées et la quantité FCA06 (exprimée en masse sèche) à employer. Nous nous sommes basés sur les conditions expérimentales définies selon la condition 8, qui est la condition pour laquelle les résultats en terme de pourcentage de mortalité bactérienne sont les meilleurs. Ces paramètres sont les suivants : le débit d'air comprimé à traiter est de $3 \text{ m}^3 \cdot \text{h}^{-1}$, la masse de FCA06 sèche est de 2,5 g et le débit de l'eau traitée est de $16,2 \text{ mL} \cdot \text{h}^{-1}$. Les 2,5 g de FCA utilisés permettent d'obtenir un abattement de la charge bactérienne compris entre 80 et 99 % pendant 48 heures d'utilisation en continu (Figure 48). La simulation ne pourra donc pas se faire sur une durée supérieure d'utilisation. En effet, au-delà de cette durée le pourcentage d'abattement est trop faible.

L'appareil choisi pour réaliser la simulation est un avion du type A320 pour lequel le débit d'air recyclé est de $3\ 000 \text{ m}^3 \cdot \text{h}^{-1}$. Cet air recyclé est traité grâce à quatre unités de traitement équivalentes qui gèrent donc chacune $750 \text{ m}^3 \cdot \text{h}^{-1}$ d'air.

Ainsi, pour une durée de 48 heures de vol et en basant sur les conditions expérimentales précédemment citées (condition 8), il faudrait, par unité de traitement, une masse sèche de **625 g de FCA06** et un débit **d'eau à traiter de $4 \text{ L} \cdot \text{h}^{-1}$** (soit environ 200 L pour 48 heures de vol).

Ces données ne sont pas aberrantes en soit mais elles sont uniquement valables pour 48 heures de vol en continu ; c'est à dire en réalité sur 5 jours puisqu'on considère qu'un avion effectue en moyenne 9 à 10 heures de vol par jour. Cependant, les fréquences de maintenance actuellement appliquées en milieu aéronautique concernant les unités de filtration de l'air sont non compatibles avec la durée de vie calculée (5 jours) puisque les filtres doivent avoir des durées de vie de 6 mois à minima. La possibilité de traiter l'air cabine recyclé de façon discontinue peut être un moyen d'augmenter la durée de vie de notre procédé

sans pour autant atteindre les durées de vie préconisées. Il manque donc des données primordiales quant au vieillissement de quantités plus importantes de FCA06 pour pouvoir réellement préjuger de l'applicabilité d'un tel procédé de décontamination en conditions réelles.

En terme de perspectives, il serait donc intéressant de poursuivre les recherches dans cette voie, à savoir de déterminer la réelle cause du vieillissement de FCA06. Nous avons précédemment vu lors du test de vieillissement accéléré (Partie 3-Chapitre 2-III. 2) que la diminution de l'effet décontaminant était rapide au cours du temps. Deux hypothèses peuvent être énoncées pour expliquer le vieillissement de FCA06.

La première hypothèse est que la perte d'activité de FCA06 serait la conséquence d'une élution de l'argent imprégné. Afin de vérifier cette hypothèse, il serait intéressant de contrôler l'élution de l'argent imprégné afin d'évaluer la quantité d'argent encore présente sur la FCA06 au cours du temps. Un dosage direct de l'argent sur la FCA, sous forme de cendres, pourrait être effectué ou bien un dosage de l'argent présent dans l'eau « traitée ». Ce dosage permettrait de déterminer la quantité minimum d'argent imprégné nécessaire au maintien d'une activité bactéricide conséquente. S'il s'avèrerait que l'élution de l'argent est la cause de la perte d'activité de la FCA, il faudrait alors tester d'autres médias similaires à la FCA et présentant les mêmes propriétés germicides (zéolites imprégnées d'argent, poudres céramiques imprégnées d'argent, matrice en silice contenant des ions argent...). Le but sera alors de sélectionner un matériau support où la libération d'argent est mieux contrôlée donc moins importante au cours du temps qu'avec la FCA06.

La seconde hypothèse est que la perte d'activité germicide serait la conséquence d'une modification du degré d'oxydation de l'argent imprégné ou d'une modification de sa forme imprégnée (oxydes d'argent par exemple). Afin de vérifier cette hypothèse il faudrait essayer différents tests de régénération ou de nettoyage pour voir si l'activité de la FCA(Ag) est restaurée ou non.

Conclusion

Les travaux présentés dans ce manuscrit apportent un certain nombre de réponses quant aux propriétés germicides des FCA, d'une part, et quelques réponses quant à l'application d'un procédé basé sur leur utilisation pour la décontamination de l'air, d'autre part.

Dans une première partie, les résultats des différentes expérimentations réalisées en phase aqueuse nous permettent d'énoncer les conclusions suivantes :

- Certaines FCA, imprégnées ou non, possèdent des propriétés antibactériennes en système dynamique. Les FCA montrant les meilleures propriétés germicides sont imprégnées de métaux et plus particulièrement d'argent (FCA(Ag)).
- Le spectre d'action contre les microorganismes de FCA(Ag) est large. Ce média est actif contre des souches de bactéries, de levures et de champignons.
- Le contact entre les cellules microbiennes et le média n'est pas nécessaire à l'activité germicide du média. L'activité germicide est surtout la conséquence de la génération de substances germicides dans le milieu aqueux.
- Le pouvoir antimicrobien provient de la formation de ROS après réduction de l'oxygène dissous. Cette réaction est catalysée par l'argent imprégné et la FCA elle-même.

Le mécanisme de germicidie s'explique donc par la formation de ROS. Les présences de l'ion superoxyde et du peroxyde d'hydrogène ont été démontrées de façon indirecte. La présence du radical hydroxyle n'a pas été démontrée mais il est fort probable que cette espèce soit également impliquée dans le mécanisme de germicidie puisque la formation de ce radical est étroitement associée à la présence simultanée de l'ion superoxyde et du peroxyde d'hydrogène. En effet, la présence de l'ion superoxyde et du peroxyde d'hydrogène, en plus de celle de métaux nous laisse supposer que la réaction d'Haber-Weiss s'est produite, permettant ainsi la génération de HO° .

Des phénomènes d'instabilité des propriétés décontaminantes de FCA(Ag) ont également été mis en évidence. Le média nécessite des précautions de conditionnement afin que ses propriétés soient au mieux conservées. Les phénomènes entraînant la perte d'activité germicide n'ont pas été élucidés. La principale hypothèse pourrait être liée à une modification

de l'argent imprégné, soit suite à une réduction entraînée par la FCA, soit suite à la formation d'oxydes d'argent après un contact trop prolongé avec l'air.

La seconde partie des résultats est consacrée aux potentialités de décontamination de l'air par FCA(Ag). Une grande partie de ce travail a consisté en la mise en place du pilote expérimental et à valider le principe de décontamination établi. C'est pour cette raison que les conclusions quant aux réelles potentialités de décontamination de FCA(Ag), pour des applications à l'échelle industrielle, ne sont que partielles :

➤ Il est possible de créer un bioaérosol dont les paramètres sont constants (température, HR, concentration du bioaérosol) avec une souche bactérienne telle que *E. coli*, pourtant non habituelle d'un environnement tel que l'air.

➤ Les bactéries contenues dans le bioaérosol généré sont cependant endommagées et principalement par la contrainte physique imposée par le processus d'aérosolisation. Le rendement de revivification est fortement dépendant du couple « temps de séjour et % d'HR ». Pour un temps de séjour d'environ 5 minutes, il n'y a pas de différence dans la revivification des bactéries lorsqu'elles sont aérosolisées entre approximativement 20 et 50 % d'HR.

➤ La décontamination d'un bioaérosol bactérien est réalisable avec le pilote expérimental de décontamination de l'air que nous avons mis au point, comme le prouvent les essais réalisés grâce à une pulvérisation de produit bactéricide tel que l'eau oxygénée.

Au stade de nos essais, il n'a pas encore été clairement démontré une décontamination complète d'un bioaérosol par de l'eau « traitée » par une FCA(Ag). Nous avons cependant montré l'existence d'effets décontaminants bien qu'ils soient dans des proportions bien moindres en phase gazeuse qu'en phase aqueuse. Les pourcentages de létalité obtenus avec le pilote de traitement de l'air sont au maximum de $96 \pm 3,4$ %. Pour obtenir une meilleure décontamination du bioaérosol, il faudrait envisager une amélioration du pilote expérimental (pouvoir appliquer des gammes de débits d'air et de liquide plus larges) et/ou des conditions expérimentales de décontamination de l'air (augmenter la quantité de FCA dans la condition 8).

En ce qui concerne l'applicabilité d'un tel procédé pour décontaminer l'air en cabine d'avion, la première question qui se pose concerne le niveau de décontamination souhaité. Si

le but recherché est de diminuer la concentration en microorganismes et donc mieux maîtriser le niveau de contamination, ceci est envisageable dans les conditions expérimentales actuellement employées. Si une décontamination accrue (au moins 2 unités log) du bioaérosol est envisagée voire une décontamination totale, le procédé nécessite des améliorations comme il a été cité ci-dessus.

Il faut également se poser des questions quant aux durées de vie et d'utilisation du procédé. Nous avons vu que dans nos conditions expérimentales, après 3 jours d'utilisation en continu, la capacité de décontamination n'est plus que de 50 % et qu'après 5 jours d'utilisation en continu, elle est inexistante. Ceci nous ramène à des questions de dimensionnement et de mise en place du procédé en condition réelle qui n'ont pas encore été abordées jusqu'à présent.

Bibliographie

- AMANATIDOU, A., SMID, E.J., BENNIK, M.H. et GORRIS, L.G. (2001) Antioxidative properties of *Lactobacillus sake* upon exposure to elevated oxygen concentrations. *FEMS Microbiol Lett.* **203** (1) : 87-94.
- AMLER, R.W., BLOCH, A.B., ORENSTEIN, W.A., BART, K.J., TURNER, P.M. et HINMAN, A.R. (1982) Imported measles in the United States. *JAMA.* **248** (17) : 2219-2133.
- ASHRAE standard 161-2000 (2000). Air quality within commercial aircraft, Committee review draft. Atlanta, GA.
- ASHRAE standard 55-1992 (1992). Thermal environmental conditions for human occupancy. Atlanta, GA.
- ASHRAE/CSS (American Society of Heating Refrigerating and Air-Conditioning Engineers and / Consolidated Safety Services) (1999) Relate air quality and other factors symptoms reported by passengers and crew on commercial transport category aircraft. ASHRAE research project 957-RP.
- ATA (Air Transport Association of America) (1994), Airline cabin air quality study. Submitted to: Air Transport Association of America, Washington DC, April 1994.
- AUST, S.D., THOMAS, C.E., MOREHOUSE, L.A., SAITO, M. et BUCHER, J.R. (1986) Active oxygen and toxicity. *Adv Exp Med Biol.* **197** : 513-526.
- AUST, S.D. (1989) Metal ions, oxygen radicals and tissue damage. *Bibl Nutr Dieta.* **43** : 266-277.
- BAGSHAW, M., DE VOLL, J.R., JENNINGS, R.T., MCCRARY, B.F., NORTHRUP, S.E., RAYMAN, R.B., SAENGER, A. et THIBEAULT, C. (2002) Medical guidelines for airline passengers. Alexandria VA: Aerospace Medical Association.
- BAKER, C.J., DEAHL, K., DOMEK, J. et ORLANDI, E.W. (1997) Oxygen metabolism in plant/bacteria interactions: effect of DPI on the pseudo-NADPH oxidase activity of peroxidase. *Biochem Biophys Res Commun.* **252** (2) : 461-4.
- BALOUET, J.-C. (2000) Cabin air quality, an update. Paris.
- BANSAL, R.C., BONNET, J.B. et STOECKLI, F. (1988) Active Carbon. Marcel Bekker Inc., New York.
- BAROUKI, R. et MOREL, Y. (2001) Le stress oxydatif et la physiopathologie diabétique. « Journées annuelles de diabétologie de l'Hôtel-Dieu » Palais des Congrès, Paris.

- BRASQUET, C. et LE CLOIREC, P. (1997) Adsorption onto activated carbon fibers: Application to water and air treatments. *Carbon* **35** (9) : 1307-1313.
- CARLILE D. (1996), Cabin Air Comfort, *FAST* **19** : 4-11.
- CARROTT, P.J.M., NABAIS, J.M.V., RIBEIRO CARROTT M.M.L., R.-C. et MENENDEZ, J.A. (2001) Thermal treatments of activated carbon fibres using a microwave furnace. *Micropor Mesopor Mat.* **47** (2-3) : 243-252.
- CAVALCANTE, A.K., MARTINEZ, G.R., DI MASCIIO, P., MENCK, C.F. et AGNEZ-LIMA, L.F. (2002) Cytotoxicity and mutagenesis induced by singlet oxygen in wild type and DNA repair deficient *Escherichia coli* strains. *DNA Repair (Amst)*. **1** (12) : 1051-6.
- CDC (1983) Epidemiological notes and reports. Interstate importation of measles following transmission in an airport - California. *MMWR*. **32** (16) : 210-216.
- CDC (1995) Exposure of passengers and flight crew to *Mycobacterium tuberculosis* on commercial aircraft, 1992-1995. *MMWR*. **44** (8) : 137-140.
- CDC (2001) Exposure to patients with meningococcal disease on aircrafts- United States 1999-2001. *MMWR*. **50** : 485-488.
- CHALMERS, T.C., HALFPENNY, P.F., SPENGLER, J.D., BURGE, H.A., CALABRESE, E.J., HORVATH, S.M., LAIRD, N.M., MATANOVSKI, G., MELIUS, J.M., RADNOFSKY, M.I. et STEDMAN, D.H. (1986) *The airliner cabin environment: air quality and safety*. Washington, D.C.: National Academy Press.
- CHEN, S. et ZENG, H. (2003) Improvement of the reduction capacity of activated carbon fiber. *Carbon*. **41** : 1265-1271.
- CHERET, D. (1996) Elaboration et caractérisation d'un tissu de carbone activé. Thèse de Doctorat de Sciences Appliquées, Mulhouse (1996MULH0433).
- COLLONGUES, R. (1957) L'argent. In *Nouveau traité de Chimie Minérale / Paul Pascal. Tome III*. Masson (ed.) Paris.
- CSS (1994) Airline cabin air quality study. Air Transportation Association of America.
- DAVIES, R.L. et ETRIS, S.F. (1997) The development and functions of silver in water purification and disease control. *Catal Today*. **36** : 107-114.
- DECHOW M. (1996), Airbus Cabin Air quality, *FAST Airbus Technical Digest* **19** : 20-29.
- DECHOW M., SOHN H. et STEINHAUS J. (1997), Concentrations of selected contaminants in cabin air of airbus aircrafts. *Chemosphere*, **35** (1-2) : 21-31.

- DEMBLE, B. (1996) Redox signaling and gene control in the *Escherichia coli* *soxRS* oxidative stress regulon - a review. *Gene*. **179** : 53-57.
- DEMBLE, B. et AMABILE-CUEVAS, C.F. (1991) Redox redux: the control of oxidative stress responses. *Cell*. **67** : 837-839.
- DING, P.-H. et WANG, C.-S. (1997) Effect of sampling time on the sampling efficiency of all-glass impinger-30 samplers for *E. coli* aerosol. *J Aerosol Sci*. **28**(1): 671-672.
- DOWD, S.E. et MAIER, R.M. (1999) Aeromicrobiology. In *Environmental Microbiology*. press, A. (ed.) San Diego, Calif, 91-121.
- DRIVER, C.R., VALWAY, S.E., MORGAN, W.M., ONORATO, I.M. et CASTRO, K.G. (1994) Transmission of *Mycobacterium tuberculosis* associated with air travel. *JAMA*. **272** (13).
- DUBININ, M.M. (1966) Porous structure and adsorption properties on active carbon. In *Chemistry and physics carbon*. Walter P.L., Jr Ed. New York, 51.
- DUMYAHN, T.S., SPENGLER, J.D., BURGE, H.A. et MUILENBURG, M. (2000) Comparison of the environments of transportation vehicles: results of two surveys. *Air quality and confort in airliner cabins, ASTM STP 1393*. Nagda, N.L. (ed.) West Conshohocken, PA: American Society for Testing Materials, 3-25.
- FARR, S.B. et KOGOMA, T. (1991) Oxidative stress responses in *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium*. *Microbiol Rev*. **55** (4) : 561-85.
- FENG, Q.L., WU, J., CHEN, G.Q., CUI, F.Z., KIM, T.N. et KIM, J.O. (2000) A mechanistic study of the antibacterial effect of silver ions on *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus*. *J Biomed Mater Res*. **52** (4) : 662-8.
- FIGUEIREDO, J.L., PEREIRA, M.F.R., M.M.A., F. et ORFAO, J.J.M. (1999) Modification of the surface chemistry of activated carbons. *Carbon* **37**(9): 1379-1389.
- FONTAINE, E. (2001) Production et élimination des radicaux libres oxygénés. « *Journées annuelles de diabétologie de l'Hôtel-Dieu* » Palais des Congrès, Paris.
- FOLMSBEE, M., STREVETT, K., STAFFORD, K. et EVENSON, C. (2000) The effect of sampling time on the total efficiency of the Andersen microbial sampler : a field study. *J Aerosol Sci*. **31** (2) : 263-271.
- FRIDOVICH, I. (1984) Oxygen: aspects of its toxicity and elements of defense. *Curr eye res*. **3** (1) : 1-2.
- FURR, J.R., RUSSELL, A.D., TURNER, T.D. et ANDREWS, A. (1994) Antibacterial activity of Actisorb Plus Actisorb and silver nitrate. *J Hosp Infect*. **27** (3) : 201-208.

- GEORGE, N. et DAVIES, J.T. (1988) Adsorption of microorganisms on activated charcoal cloth: A material with potential applications in biotechnology. *J Chem Tech Biotechnol.* **43** : 117-129.
- GRIFFITHS, W.D. et DeCOSEMO, G.A.L. (1994) The assessment of bioaerosols : a critical review. *J Aerosol Sci.* **25** (8) : 1425-1458.
- GRIFFITHS, W.D., STEWART, I.W., READING, A.R. et FUTTER, S.J. (1996) Effect of aerosolisation, growth phase and residence time in spray and collection fluids on the culturability of cells and spores. *J Aerosol Sci.* **27** (5) : 803-820.
- GRIFFITHS, W.D., STEWART, I.W., FUTTER, S.J., UPTON, S.L. et MARK, D. (1997) The development of sampling methods for the assessment of indoor bioaerosols. *J Aerosol Sci.* **28** (3) : 437-457.
- GRIFFITHS, W.D. et STEWART, I.W. (1999) Performance of bioaerosol samplers used by the UK biotechnology industry. *J Aerosol Sci.* **30** (8) : 1029-1040.
- GRIMAUD, R., EZRATY, B., MITCHELL, J.K., LAFITTE, D., BRIAND, C., DERRICK, P.J. et BARRAS, F. (2001) Repair oxidized proteins. *J Biol Chem.* **276** (52) : 48915-48920.
- HALL, R.J., SANGIOVANNI, J.J., HOLLICK, H.H., OBEE, T.N. et HAY, S.O. (2000) Design of air purifier for aircraft passenger cabins based on photocatalytic oxidation technology. *Air quality and comfort in airliner cabins, ASTM STP 1393*. Nagda, N.I. (ed.) West Conshohocken, PA: American Society for Testing Materials, 135-161.
- HENNINGSON, E.W., LUNDQUIST, M., LARSSON, E., SANDSTRÖM, G. et FORSMAN, M. (1997) A comparative study of different methods to determine the total number and the survival ration of bacteria in aerobiological samples. *J Aerosol Sci.* **28** (3) : 459-469.
- HERNANDEZ, M. et SWARTZ, M. (2000) A review of sampling and analysis methods for assessing airborne microbiological contamination on commercial aircraft, a literature survey and review. Draft report to NIOSH.
- HOCKING, M.B. (2000) Passenger aircraft cabin air quality: trends, effects, societal costs, proposals. *Chemosphere.* **41** : 603-615.
- HUNT E.H. and SPACE D.R. (1994), The airplane Cabin Environment, Issues pertaining to flight attendant comfort. The Boeing Company, International In-Flight service management organization conference, Montreal, Canada.

- HUNT E.H., REID D.H., SPACE D.R. and TILTON F.E. (1995), Commercial airliner environmental control system, engineering aspects of cabin air quality. The Boeing Company, The aerospace Medical association annual meeting, Anaheim, California.
- IMLAY, J.A.; LINN, S. (1986), Bimodal pattern of killing if DNA repair defective of anoxically grown *Escherichia coli* by hydrogen peroxide. *J Bacteriol* **166** : 519-527
- INOUE, Y. et KANZAKI, Y. (1997) The mechanism of antibacterial activity of silver-loaded zeolite. *J Inorg Biochem.* **67** (1-4) : 337.
- INOUE, Y., HOSHINO, M., TAKAHASHI, H., NOGUCHI, T., MURATA, T., KANZAKI, Y., HAMASHIMA, H. et SASATSU, M. (2002) Bactericidal activity of Ag-zeolite mediated by reactive oxygen species under aerated conditions. *J Inorg Biochem.* **92** (1) : 37-42.
- JANSSEN, J.E. (1989) Ventilation for acceptable indoor air quality. *ASHRAE Journal* **31** (10) : 40-48.
- JAGIELLO, J., BANDOSZ, T.J. et SCHWARZ, J.A. (1992) A study of the activity of chemical groups on carbonaceous and model surfaces by infinite dilution chromatography. *Chromatographia.* **33** (9) : 441-444.
- JANCZEWSKI, J. (2001) Airline cabin air quality study. CSS, Presentation to the NRC Committee on air quality in passenger cabins on commercial aircraft, January 3-4, Washington D.C
- JULIEN, F. (1994) Contribution à l'étude des mécanismes de l'adsorption de molécules organiques sur différents types de charbons actifs. Thèse de Doctorat de Chimie et Microbiologie de l'Eau, Poitiers (1994POIT2305).
- KENYON, T.A., VALWAY, S.E., IHLE, W.W., ONORATO, I.M. et CASTRO, K.G. (1996) Transmission of multi-drug resistant *Mycobacterium tuberculosis* during a long airplane flight. *N Engl J Med.* **334** (15) : 933-938.
- KEHRER, J.P. (2000), The Haber-Weiss reaction and mechanisms of toxicology. *Toxicology* **149** : 43-50.
- KIM, B.R.; ANDERSON, J.E.; MUELLER, S.A.; GAINES, W.A.; KENDALL, A.M. (2002) Literature review - efficacy of various disinfectants against *Legionella* in water systems. *Wat Res.* **36** : 4433-4444.
- KLONTZ, K.C., HYNES, N.A., GUNN, R.A., WILDER, M.H., HARMON, M.W. et KENDAL, A.P. (1989) An outbreak of *influenza A/Taiwan/1/86* (H1N1) infections at a naval base and association with airplane travel. *Am J Epidemiol.* **129** (2) : 341-348.

- LEAN, M.E.J. et BURNS, J. (2001) Tentatives pharmacologiques et nutritionnelles pour corriger le stress oxydatif. « *Journées annuelles de diabétologie de l'Hôtel-Dieu* » Palais des Congrès, Paris.
- LEE, P. et DAVIDSON, J. (1999) Evaluation of activated carbon filters for removal of ozone at the PPB level. *Am Ind Hyg Assoc J.* **60** (5) : 589-600.
- LEE, S.C., POON C.S., LI X.D. and LUK F. (1999), Indoor air quality investigation on commercial aircraft. *Indoor Air* **9** (3) : 180-187.
- LEE, S.C., POON, C.S., LI, X.D., LUK, F., CHANG, M. et LAM, S. (2000) Air quality measurements on sixteen commercial aircraft. *Air quality and comfort in airliner cabins, ASTM STP 1393*. Nagda, N.L. (ed.) West Conshohocken, PA: American Society for Testing Materials, 45-58.
- LI, Z., KRUK, M., JARIONEC, M. et RYU, S.-K. (1998) Characterization of structural and surface properties of activated carbon fibers. *J Colloid Interf Sci.* **204** (1) : 151-156.
- LI, C.Y., WAN, Y.Z., WANG, J., WANG, Y.L., JIANG, X.Q. et HAN, L.M. (1998) Antibacterial pitch-based activated carbon fiber supporting silver. *Carbon* **36** (1-2) : 61-65.
- LI, K., LING, L., LU, C., LIU, Z., LIU, L. et MOCHIDA, I. (2001) Influence of CO-evolving groups on the activity of activated carbon fiber for SO₂ removal. *Fuel Process Technol.* **70** (3) : 151-158.
- LI, C.-S. et LIN, Y.-A. (2001) Storage effects on bacterial concentration : determination of impinger and filter samples. *Sci Total Environ.* **278** : 231-237.
- LI, P., QUINLIVAN, P.A. et KNAPPE, D.R.U. (2002) Effects of activated carbon surface chemistry and pore structure on the adsorption of organic contaminants from aqueous solution. *Carbon* **40** (12) : 2085-2100.
- LIS, D.O. et PASTUSZKA, J.S. (1997) Bacterial and fungal aerosol in homes without and with mold problem, in upper silesia, poland. Preliminary results. *J Aerosol Sci.* **28** (1) : 665-666.
- LISOVSKII, A., SHTER, G.E., SEMIAT, R. et AHARONI, C. (1997) Adsorption of sulfur dioxide by active carbon treated by nitric acid : II. Effect of preheating on the adsorption properties. *Carbon* **35** (10-11) : 1645-1648.
- LIPPMANN, M., BURGE, H.A., JONES, B.W., MACHER, J.M., MORGAN, M.S., NAZAROFF, W.W., RAYMAN, R.B., SPENGLER, J.D., TAGER, I.B., VAN NETTEN, C., WEISS, B., WESCHLER, C.J. et WITSCHI, H. (2002) *The airliner cabin environment and the health of passengers and crew*. Washington, D.C.: National Academy Press.

- LOEWEN, P.C. (1984) Isolation of catalase-deficient *Escherichia coli* mutants and genetic mapping of *katE*, a locus that affects catalase activity. *J Bacteriol.* **157** (2) : 622-626.
- LORD, J. (1955) Air flow through plugs of textile fibers. *J Text Inst.* **46**: 191.
- McFARLAND, J.W. (1993) Exposure to *Mycobacterium tuberculosis* during air travel. *Lancet.* **342** : 112-113.
- MANGUN, C.L., BENAK, K.R., DALEY, M.A. et ECONOMY, J. (1999) Oxidation of activated carbon fibers: effect on pore size, surface chemistry, and adsorption properties. *Chem Mater.* **11** : 3476-3483.
- MARTINEZ-CAYUELA, M. (1995) Oxygen free radicals and human disease. *Biochimie.* **77** (3) : 147-61.
- MATATOV-MEYDAL, Y. et SHEINTUCH, M. (2002) Catalytic fibers and cloths. *Appl Catal : A General.* **23** :1-16.
- Mc CORMICK, M.L.; BUETTNER, G.R.; BRITIGAN, B.E. (1998), Endogenous superoxide dismutase levels regulate iron-dependent hydroxyl radical formation in *Escherichia coli* exposed to hydrogen peroxide. *J Bacteriol.* **180** : 622-625.
- MILLER, M.A., VALWAY, S.E. et ONORATO, I.M. (1996) Tuberculosis risk after exposure on airplanes. *Tuber Lung Dis.* **77** (5) : 414-419.
- MOON, J.-S., PARK, K.-K., KIM, J.-H. et SEO, G. (1999) The reduction reaction of dissolved oxygen in water by hydrazine over platinum catalyst supported on activated carbon fiber. *Appl Catal : A General.* **184** : 41-48.
- MOORE, M., FLEMING, K.S. et SANDS, L. (1996) A passenger with pulmonary/laryngeal tuberculosis: no evidence of transmission on two short flights. *Aviat Space Environ Med.* **67** (11) : 1097-1100.
- MOSER, R.M., BENDER, T.R., MARGOLIS, H.S., Noble, G.R., KENDAL, A.P. et RITTER, D.G. (1979) An outbreak of *influenza* aboard a commercial airliner. *Am J Epidemiol.* **110** (1) : 1-6.
- NAGDA N.L., FORTMANN M.D., KOONTZ M.D., BAKER S.R. et GINEVAN M.E. (1989), Airliner cabin environment: constant measurements, Health risks, and Mitigation options. DOT-P-15-89-5. NTIS/PB91-159384. Prepared by GEOMET Technologies, Germantown, MD, for the US Department of Transportation, Washington DC.
- NAGDA N.L., KOONTZ M.D., KONHEIM A.R. et HAMMOND S.K. (1992), Measurement of cabin air quality aboard commercial airliners. *Atmos. Environ. Part A Gen.* **26** (12) : 2203-2210.

- NAGDA, N.L., RECTOR, H.E., LI, Z. et SPACE, D.R. (2000) Aircraft cabin quality : a critical review of past monitoring studies. *Air quality and comfort in airliner cabins, ASTM STP 1393*. Nagda, N.L. (ed.) West Conshohocken, PA: American Society for Testing Materials, 215-239.
- NEUMANN, H.-D., BALFANZ, J., BECKER, G., LOHMEYER, M., MATHYS, W. et RAULF-HEIMSOTH, M. (2002) Bioaerosol exposure during refuse collection: results of field studies in the real-life situation. *Sci Total Environ.* **293** : 219-231.
- NIMALI, T. (1996) Rôles des charbons actifs dans les réactions d'oxydation par le dioxygène. Thèse de Doctorat de Chimie, Paris VI (1996PA066827).
- Norme EUROCAE ED-14D / RTCA DO-160D (1998) Fungus resistance, section 13.
- Norme AFNOR FD T 90-112 (1996) Qualité de l'eau - Dosage de dix éléments métalliques (Cr, Mn, Fe, Co, Ni, Cu, Zn, Ag, Cd, Pb) par spectrométrie d'absorption atomique dans la flamme.). Qualité de l'eau, Tome 3, Méthodes d'analyse 2 – Eléments majeurs, autres éléments et composés minéraux. AFNOR Ed. 2^{ème} édition 1997.
- Norme AFNOR FD T 90-119 (1996) Qualité de l'eau - Dosage d'éléments minéraux (Al, Sb, Ag, As, Ba, Cd, Cr, Co, Cu, Sn, Mn, Mo, Ni, Pb, Se, Ti, V). Qualité de l'eau, Tome 3, Méthodes d'analyse 2 – Eléments majeurs, autres éléments et composés minéraux. AFNOR Ed. 2^{ème} édition 1997.
- OSMOND, N.M. (2000) Activated carbon fibre adsorbent materials. *Ads Sci Technol.* **18** (6) : 529-539.
- OYA, A., WAKAHARA, T. et YOSHIDA, S. (1993a) Preparation of pitch-based antibacterial activated carbon fiber. *Carbon* **31** (8) : 1243-1247.
- OYA, A., YOSHIDA, S., ABE, Y., IIZUKA, T. et MAKIYAMA, N. (1993b) Antibacterial activated carbon fiber derived from phenolic resin containing silver nitrate. *Carbon* **31** (1) : 71-73.
- OYA, A., KIMURA, M., SUGO, T., KATAKAI, A., ABE, Y., IIZUKA, T. et MAKIYAMA, N. (1993c) Antibacterial activated carbon fibre derived from phenolic resin fibre by use of co-graftpolymerization. *J Mater Sci.* **28** : 4731-4734.
- OYA, A., KIMURA, M., SUGO, T., KATAKAI, A., ABE, Y., IIZUKA, T., MAKIYAMA, N., LINARES-SOLANO, A. et SALINAS-MARTINEZ DE LECEA, C. (1994) Antibacterial activated carbon fiber derived from phenolic methacrylate-grafted phenolic resin fiber. *Carbon* **32** (1) : 107-110.

- OYA, A., YOSHIDA, S., ALCANIZ-MONGE, J. et LINARES-SOLANO, A. (1996) Preparation and properties of an antibacterial activated carbon fiber containing mesopores. *Carbon* **34** (1) : 53-57.
- PAQUET C., QUATRESOUS I., BARBOZA P. et BRINDEL P. (2003) L'épidémie de syndrome respiratoire aigu sévère (SRAS) dans le monde. *BEH* 24-25 : 110-111.
- PAREDES OLIVERA, P., PATRITO, E.M. et SELLERS, H. (1994) Hydrogen peroxide synthesis over metallic catalysts. *Surf Sci.* **313** : 25-40.
- PARK, S.-J. et JANG, Y.-S. (2003) Preparation and characterization of activated carbon fibers supported with silver metal for antibacterial behaviour. *J Colloid Interf Sci.* **261**: 238-243.
- PARK, K.-K., PARK, B.-J. et RYU, S.-K. (1999) Electrochemical treatment on activated carbon fibers for increasing the amount and rate of Cr(VI) adsorption. *Carbon* **37** : 1223-1226.
- PARK, K.-K. et KIM, J.-H. (2001) Influence of activation temperature on adsorption characteristics of activated carbon fiber composites. *Carbon* **39** : 1741-1746.
- PEDAHZUR, R., LEV, O., FATTAL, B. et SHUVAL, H.I. (1995) The interaction of silver ions and hydrogen in the inactivation of *E. coli* : a preliminary evaluation of a new long acting residual drinking water disinfectant. *Wat Sci Tech.* **31** (5-6) : 123-129.
- PEDAHZUR, R., SHUVAL, H.I. et ULITZUR, S. (1997) Silver and hydrogen peroxide as potential drinking water disinfectants: their bactericidal effects and possible modes of action. *Wat Sci Tech.* **35** (11-12) : 87-93.
- PELMONT, J. (1993) *Bactéries et Environnement : adaptations physiologiques*. Presses Universitaires de Grenoble (Ed.).
- PIERCE, W., JANCZEWSKI, J., ROETHLISBERGER, B. et JANCZEWSKI, M. (1999) Air quality on commercial aircraft, *ASHRAE J.* Sept. : 26-34
- PIMENOV, A.V., LIEBERMAN, A.I. et SHMIDT, J.L. (1998) Modified activated carbon. *United States Patent* USA: Electrophor, Inc. (Dobbs Ferry, NY).
- PIMENOV, A.V., MITILINEOS, A.G., PENDINEN, G.I., CHERNOV, V.E., LIEBERMAN, A.I., SHMIDT, J.L. et CHEH, H.Y. (2001) The adsorption and deactivation of microorganisms by activated carbon fiber. *Separ Sci Technol.* **36** (15) : 3385-3394.
- PITTMAN, C.U., JIANG, W., YUE, Z.R., GARDNER, S., WANG, L., TOGHIANI, H. et LEON Y LEON, C.A. (1999) Surface properties of electrochemically oxidized carbon fibers. *Carbon* **37** : 1797-1807.

- POLANIA-L., A., PAPIRER, E., DONNET, J.B. et DAGOIS, G. (1993) Modification et interaction des fonctions oxygénées en surface des charbons actifs. *Carbon* **31** (3) : 473-479.
- POWELL, T., BRION, G.M. et DERBYSHIRE, F. (2000) Investigating the effect of carbon shape on virus adsorption. *Environ Sci technol.* **34** (13) : 2779-2783.
- PRADHAN, B.K. et SANDLE, N.K. (1999) Effect of different oxidizing agent treatments on the surface properties of activated carbons. *Carbon* **37** : 1323-1332.
- REISMAN, R.E., MAURIELLO, P.M., DAVIS, G.B., GEORGITIS, J.W. et DEMASI, J.M. (1990) A double-blind study of the effectiveness of a high-efficiency particulate air (HEPA) filter in the treatment of patients with allergic rhinitis and asthma. *J Allergy Clin Immunol.* **85** (6) : 1050-1057.
- RODRIGUEZ-REINOSO, F. (1998) The role of carbon materials in heterogeneous catalysis. *Carbon* **36**(3): 159-175.
- RONG, H., RYU, Z., ZHENG, J. et ZHANG, Y. (2002) Effect of air oxidation of rayon-based activated carbon fibers on the adsorption behaviour for formaldehyde. *Carbon* **40** : 2291-2300.
- RUSSEL, A. D. et W. B. HUGO (1994). Antimicrobial activity and action of silver. *Progr Med Chem* **31** : 351-371.
- RYU, S.-K., KIM, S.Y., GALLEGO, N. et DEID, D.D. (1999a) Physical properties of silver-containing pitch-based activated carbon fibers. *Carbon* **37** : 1619-1625.
- RYU, S.-K., KIM, S.Y., LI, Z.J. et JARIONEC, M. (1999b) Characterization of silver-containing pitch-based activated carbon fibers. *J Colloid Interf Sci.* **220** : 157-162.
- RYU, Z., ZHENG, J., WANG, M. et ZHANG, B. (1999c) Characterization of pore size distributions on carbonaceous adsorbents by DFT. *Carbon* **37** : 1257-1264.
- RYU, Y.-K., KIM, K.-L. et LEE, C.-H. (2000) Adsorption and desorption of n-hexane, methyl ethyl ketone, and toluene on an activated carbon fiber from supercritical carbon dioxide. *Ind Eng Chem.* **39** : 2510-2518.
- SAWAI, J., IGARASHI, H., HASHIMOTO, A., KOKUGAN, T. et SHIMIZU, M. (1995) Evaluation of growth inhibitory effect of ceramics powder slurry on bacteria by conductance method. *J Chem Eng Jap.* **28** : 288-293.
- SAWAI, J., KAWADA, E., KANOU, F., IGARASHI, H., HASHIMOTO, A., KOKUGAN, T. et SHIMIZU, M. (1996) Detection of active oxygen generated from ceramic powders having antibacterial activity. *J Chem Eng Jap.* **29** (4) : 627-633.

- SAWAI, J., SHOJI, S., IGARASHI, H., HASHIMOTO, A., KOKUGAN, T., SHIMIZU, M. et KOJIMA, H. (1998) Hydrogen peroxide as an antibacterial factor in zinc oxide powder slurry. *J Ferment Bioeng.* **86** (5) : 521-522.
- SENDER, E. (2003) Purification de l'air, méthode de chocs. *Sciences et Avenir*, Février : 74.
- SHIN, S., JANG, J. ET YOON, S.-H. et MOCHIDA, I. (1997) A study on the effect of heat treatment on functional groups of pitch based activated carbon fiber using FTIR. *Carbon* **35** (12) : 1739-1743.
- SLATER, P.E., ANIS, E. et BASHARY, A. (1995) An outbreak of measles associated with a New York/Tel Aviv flight. *Travel Med Int.* **13** (3) : 92-95.
- SPACE D. (1993) Cabin Air Quality. *Airliner*, Oct-Dec : 19-24.
- SPACE, D.R., JOHNSON, R.A., RANKIN, W.L. et NAGDA, N.L. (2000) The airplane cabin environment: past, present and future research. *Air quality and comfort in airliner cabins*, ASTM STP 1393. Nagda, N.L. (ed.) West Conshohocken, PA: American Society for Testing Materials, 189-215.
- SPENGLER J., BURGE H., DUMYAHN T., DALHSTROM C., MUILENBERG M. et MILTON D. (1994), Aircraft cabin environmental survey-executive summary. Department of Environmental Health, Harvard University School of Public Health, Boston MA, May 16, 1994.
- SPENGLER J., BURGE H., DUMYAHN T., MUILENBERG M. et FORESTER D. (1997), Environmental survey on aircraft and ground-based commercial transportation vehicles. Prepared for the commercial airplane group, the Boeing Company, by Harvard School of Public Health, Harvard University, Cambridge, MA. May 31, 1997.
- STEWART, S.L.; GRINSHPUN, S.A.; WILLEKE, K.; TERZIEVA, S.; ULEVICIUS, V.; DONNELLY, J. (1995), Effect of impact stress on microbial recovery on an agar surface. *Appl Environ Microbiol.* **61** (4) : 1232-1239
- STEWART, I.W. et GRIFFITHS, W.D. (1998) Characterisation of bioaerosol samplers commonly used by the UK biotechnology industry. *J Aerosol Sci.* **29** (1) : 495-496.
- STOHS, S.J. et BAGCHI, D. (1995) Oxidative mechanisms in the toxicity of metal ions. *Free Radic Biol Med.* **18** (2) : 321-36.
- SUBRENAT, A., BALÉO, J.N., LE CLOIREC, P. et BLANC, P.E. (2001) Electrical behaviour of activated carbon cloth heated by the joule effect: desorption application. *Carbon.* **39** : 707-716.

- SUZUKI, M. (1994) Activated carbon fiber: fundamentals and applications. *Carbon* **32** (4) : 577-586.
- TAMAI, H., KATSU, N., ONO, K. et YASUDA, H. (2001) Antibacterial activated carbons prepared from pitch containing organometallics. *Carbon* **39** (13) : 1963-1969.
- THIBESSARD, A., FERNANDEZ, A., GINTZ, B., LEBLOND-BOURGET, N. et DECARIS, B. (2001) Hydrogen peroxide effects on *Streptococcus thermophilus* CNRZ368 cell viability. *Res Microbiol.* **152** : 593-596.
- THOMAS, D., PENICOT, P., CONTAL, P., LECLERC, D., VENDEL, J. (2001) Clogging of fibrous filters by solid aerosol particles, Experimental and modelling study. *Chemical Engineering Science* **56** : 3549-3561.
- THURMAN, R.P. et GERBA, C.P. (1989) The molecular mechanism of copper and silver ion disinfection of bacteria and viruses. *Crit Rev Env Contr* **18** (4) : 295-315.
- TOUATI, D., JACQUES, M., TARDAT, B., BOUCHARD, L. et DESPIED, S. (1995) Lethal oxidative damage and mutagenesis are generated by iron in delta fur mutants of *Escherichia coli*: protective role of superoxide dismutase. *J Bacteriol.* **177** (9) : 2305-14.
- TRIPATHI, V.S., GURUDATT, K., MATHUR, H. et MATHUR, G.N. (1998) Medical applications of activated carbon fabrics. *Man-made Textiles in India*: 55-57.
- THURMAN, R.B. et GERBA, C.P. (1989) The molecular mechanisms of copper and silver ion disinfection of bacteria and viruses. *Crit Rev Env Contr* **18** (4) : 295-315.
- VIEILLEFOND, H., FOURN, P. et AUFFRET, R. (1977) Characteristics in the atmosphere of long-range transport aircraft cabins. *Aviat Space Environ Med.* **45** (6): 503-507.
- VILLERMAUD, J. (1993) Génie de la réaction chimique. Conception et fonctionnement des réacteurs. Série *TEC & DOC*. Lavoisier (ed.).
- WALKUP, L.K. et KOGOMA, T. (1989) *Escherichia coli* proteins inducible by oxidative stress mediated by the superoxide radical. *J Bacteriol.* **171** (3) : 1476-84.
- WAN, Y.Z., WANG, Y.L., HE, F. et LUO, H.L. (1998) X-ray photoelectron spectroscopy studies of ACF(Ag) before and after decomposition treatment. *J Mater Sci Lett.* **17** : 2051-2053.
- WAN, Y.Z., WANG, Y.L. et WEN, T.Y. (1999) Effect of specific surface area and silver content on bacterial adsorption onto ACF(Ag). *Carbon* **37** : 351-353.
- WAN, Y.Z., WANG, Y.L., CHENG, G.X., LUO, H.L. et DONG, X.H. (2001) Preparation and characterization of activated carbon fiber supporting silver-loaded mesoporous molecular sieves. *Carbon* **39** : 1607-1610.

- WANG, Y.L., WAN, Y.Z., DONG, X.H., CHENG, G.X., TAO, H.M. et WEN, T.Y. (1998) Preparation and characterization of antibacterial viscose-based activated carbon fiber supporting silver. *Carbon* **36** (11) : 1567-1571.
- WANG, P.D. (2000) Two-step tuberculin testing of passengers and crew on a commercial airplane. *Am J Infect Control*. **28** (3) : 233-238.
- WANG, Z., REPONEN, T., GRINSHPUN, S.A., GORNY, R.L. et WILLEKE, K. (2001) Effect of sampling time and air humidity on the bioefficiency of filter samplers for bioaerosol collection. *J Aerosol Sci*. **32** : 661-674.
- WICK R.L. Jr et IRVINE L.A. (1995), The microbiological composition of airliner cabin air. *Aviat space environ med* **66** : 220-224.
- WIGMANS, T. (1989) Industrial aspects of production and use of activated carbons. *Carbon* **27** (1) : 13-22.
- WILLEKE, K., GRINSHPUN, S.A., ULEVICIUS, V., TERZIEVA, S., DONNELLY, J., STEWART, S. et JUOZAITIS, A. (1995) Microbial stress, bounce and re-aerosolization in bioaerosol samplers. *J Aerosol Sci*. **26** (1) : 883-884.
- WILLEKE, K.; LIN, X.; GRINSHPUN, S.A.; REPONEN, T.; FOARDE, K.K.; ENSOR, D.S. (1998) Laboratory and field evaluation of a new bioaerosol sampling concept. *J Aerosol Sci*. **29** (1) : 499-500.
- YAMAMOTO, O., SAWAI, J., ISHIMURA, N., KOJIMA, H. et SASAMOTO, T. (1999) Change of antibacterial activity with oxidation of ZnS powder. *J Ceram Soc Jap*. **107** (9) : 853-856.
- YAMAMOTO, O., NAKAKOSHI, K., SASAMOTO, T., NAGAKAWA, H. et MIURA, K. (2001) Adsorption and growth inhibition of bacteria on carbon materials containing zinc oxide. *Carbon* **39** : 1643-1651.
- YUE, Z.R., JIANG, W., WANG, L., GARDNER, S.D. et PITTMAN, C.U.J. (1999) Surface characterization of electrochemically oxidized carbon fibers. *Carbon* **37** : 1785-1796.

Sites Internet:

- www.nap.edu
- www.ashrae.org
- www.who.int
- www3.sympatico.ca/diane.demers
- www.Probes.com/handbook

Annexes

ANNEXE 1
PUBLICATION N°1

LE PAPE H., SOLANO-SERENA F., CONTINI P., DEVILLERS C., MAFTAH A. and LEPRAT P. Evaluation of the anti-microbial properties of an activated carbon fibre supporting silver using a dynamic method. Carbon, 2002, vol. 40, n°15, pp. 2947-2954.

Abstract

Four activated previous termcarbon fibresnext term (ACF), impregnated or not with metallic compounds, were tested in a dynamic aqueous system for their anti-microbial abilities. All strains of bacteria and fungi tested were sensitive to the microbicidal activity of an ACF supporting silver. This carbon cloth exhibited strong lethal activity against E. coli, S. cerevisiae and P. pastoris. Cell mortality was clearly shown by ATP measurements, and was obtained after a very short contact time (a few seconds) between microorganisms and the ACF supporting silver. Such anti-microbial effects did not seem to be exclusively linked to the presence of silver. The phenomena probably involved in the microbicidal mechanism are therefore discussed in this paper.

Keywords: A. Activated carbon; A. Carbon cloth

ANNEXE 2
PUBLICATION N°2

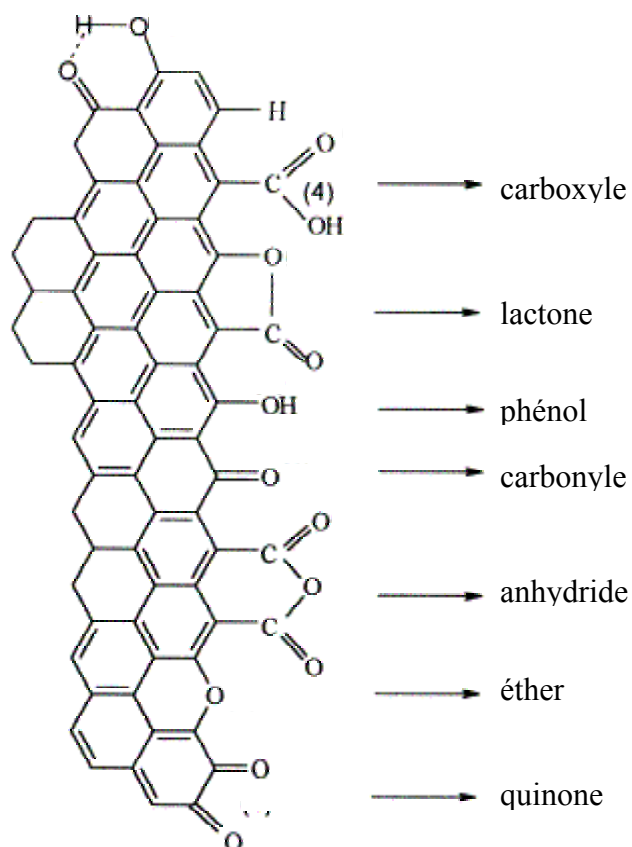
LE PAPE H., SOLANO-SERENA F., CONTINI P., DEVILLERS C., MAFTAH A. and LEPRAT P. Involvement of reactive oxygen species in the bactericidal activity of activated carbon fibre supporting silver: Bactericidal activity of ACF(Ag) mediated by ROS. Journal of Inorganic Biochemistry, June 2004, vol. 98, n° 6, pp.1054-1060.

Abstract

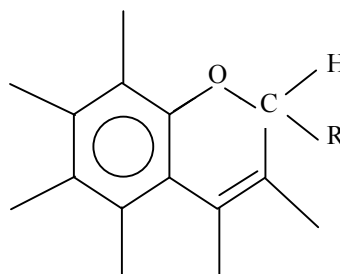
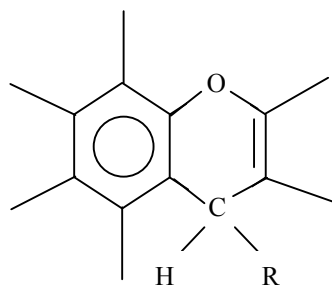
An activated previous term carbon fibre next term supporting silver (ACF(Ag)) was tested for its antibacterial capacity against *Escherichia coli* (*E. coli*). Water that has passed through ACF(Ag) demonstrated strong bactericidal ability. This activity decreased over the time suggesting that generated bactericidal species were short lifespan. Since formation of reactive oxygen species (ROS) might be catalysed by silver impregnated and/or ACF itself, implication of ROS and silver was evaluated by the use of ROS scavengers and a silver ions neutralizing agent. The role of ROS in the *E. coli* mortality was confirmed by the use of a molecular approach which revealed a strong expression of oxidative stress genes.

Keywords: Activated previous term carbon fibre next term; Silver; Reactive oxygen species; Oxidative stress; Bactericidal activity.

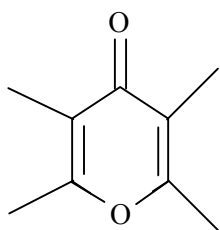
ANNEXE 3
QUELQUES GROUPEMENTS ACIDES IDENTIFIES EN SURFACE DES FCA
(RODRIGUEZ-REINOSO, 1998)



ANNEXE 4
QUELQUES GROUPEMENTS BASIQUES IDENTIFIES EN SURFACE DES FCA



chromènes



pyrone

ANNEXE 5
TEMPS DE SEJOUR REALISABLES AVEC T10
SELON LE VOLUME ET LE DEBIT D'AC APPLIQUES

Numéro de configuration et volume de T10	Débit AC = 33,3 L.min ⁻¹ 1	Débit AC = 40 L.min ⁻¹	Débit AC = 50 L.min ⁻¹
1 10,44 dm ³	0'19''	0'16''	0'12''
2 53,44 dm ³	1'36''	1'20''	1'04''
3 119,7 dm ³	3'35''	2'59''	2'24''
4 234,9 dm ³	7'03''	5'52''	4'42''
5 62,3 dm ³	1'52''	1'33''	1'15''
6 128,5 dm ³	3'51''	3'13''	2'34''
7 243,7 dm ³	7'19''	6'06''	4'52''
8 155,0 dm ³	4'39''	3'52''	3'06''
9 270,2 dm ³	8'06''	6'45''	5'24''
10 297,7 dm ³	8'56''	7'26''	5'57''
11 163,9 dm ³	4'55''	4'06''	3'17''
12 279,0 dm ³	8'22''	6'58''	5'35''
13 306,5 dm ³	9'12''	7'40''	6'08''
14 333,0 dm ³	9'59''	8'20''	6'40''
15 341,9 dm ³	10'15''	8'33''	6'50''

ANNEXE 6
EVALUATION DE L'ETAT PHYSIOLOGIQUE, PAR CMF, D'UNE POPULATION
BACTERIENNE MISE EN CONTACT AVEC DE L'EAU « TRAITEE » PAR FCA06
AVEC OU SANS AJOUT NI D'INHIBITEURS DE ROS OU D'AGENT NEUTRALISANT
DES IONS ARGENT

L'effet de l'ajout de différents inhibiteurs de ROS et d'un agent neutralisant des ions argent sur l'activité bactéricide vis-à-vis d'*E. coli* de l'eau « traitée » par FCA06 a été analysé par CMF. Les composés sont ajoutés individuellement.

L'eau « traitée » est divisée en 4 aliquots, aucun inhibiteur n'est ajouté dans le premier, le second est additionné de catalase, le troisième de SOD et le quatrième de thioglycolate de sodium. Ces différents inhibiteurs sont ajoutés juste après circulation et juste avant addition des bactéries à une concentration initiale de 10^6 cellules.mL⁻¹. Les prélèvements sont effectués après des temps de contact, entre les bactéries et l'eau « traitée » de 0, 4, 8, 16 et 32 minutes. L'IP est ajouté extemporanément avant chaque analyse par CMF et nous évaluons ainsi l'intégrité membranaire des bactéries dans les différentes conditions.

Pour chaque population étudiée, les cellules endommagées sont séparées en deux populations. La première est celle ayant faiblement marqué l'IP (IP +), elles correspondent à des cellules endommagées mais qui ne sont pas forcément dans un état de létalité, si les cellules réparent leurs dommages elles pourront se revivifier sinon elles mourront ou resteront dans un état non cultivable et finiront par mourir. La seconde population est celle des cellules ayant fortement marqué l'IP (IP ++), ces bactéries sont très endommagées et finiront par mourir. Ce découpage en deux populations est réalisé pour chaque et les fenêtres appliquées sont déterminées à partir du témoin (sans inhibiteurs) et identiques sur chaque cytotogramme.

Les premiers cytotogrammes (Annexe 6, Figure 1) correspondent à la population bactérienne sans ajout d'inhibiteurs, c'est-à-dire en contact avec les substances germicides. A t=0 min, la majorité de la population est faiblement fluorescente (FL3 < 4.10^0), plus les temps

de contact sont longs, plus la valeur de FL3 augmente (allant jusqu'à une valeur de FL3 de 1.10^2) et moins la population cellulaire est dense. Ces résultats confirment la tendance que nous avons remarquée après dénombrements des UFC sur milieux nutritifs solides (Figure 35), où une décontamination totale est observée après 16 minutes de contact entre les bactéries et l'eau « traitée ».

Après ajout de catalase, inhibiteur du peroxyde d'hydrogène. Nous remarquons que le profil est similaire à celui observé pour le témoin (Annexe 6, Figure 2). La population monte en fluorescence, les bactéries intègrent de plus en plus l'IP au cours de la manipulation. La zone la plus dense de la population se trouve à une valeur de FL3 entre 10^1 et 5.10^1 . Nous ne pouvons pas, suite à ces cytogrammes, préjuger d'une quelconque influence de l'ajout de catalase dans la suspension de substances germicides. Ces résultats corroborent les observations faites après revivification des bactéries sur milieu nutritif solide où l'inhibition de l'activité bactéricide était peu importante.

Après ajout de SOD qui est un inhibiteur des ions superoxydes (Annexe 6, Figure 3), nous notons une grosse différence avec le témoin. En effet, les cellules sont très fortement endommagées et après 32 minutes de contact entre les cellules et l'eau « traitée » la majorité des bactéries se trouve dans la partie haute du cytogramme. D'après les résultats obtenus après dénombrements des UFC sur milieu nutritif solide, nous aurions dû nous attendre à observer des cytogrammes similaires à ceux observés après ajout de catalase. Il semble dans ce cas que l'ajout de SOD ait accentué l'effet bactéricide.

Enfin après ajout de thioglycolate de sodium, agent neutralisant des ions Ag^+ (Annexe 6, Figure 4) l'évolution de l'état physiologique des bactéries est totalement différente de celle du témoin (Annexe 6, Figure 1). D'après les cytogrammes obtenus, il semblerait que les cellules n'incorporent plus du tout l'IP, elle reste dans la partie inférieure du cytogramme. La valeur de FL3 reste inférieure à 7.10^0 tout au long de l'expérimentation. Après l'addition du thioglycolate de sodium, l'effet bactéricide est fortement inhibé par le neutralisant des ions argent. Ceci corrobore les résultats obtenus après dénombrement des UFC sur milieu nutritif solide.

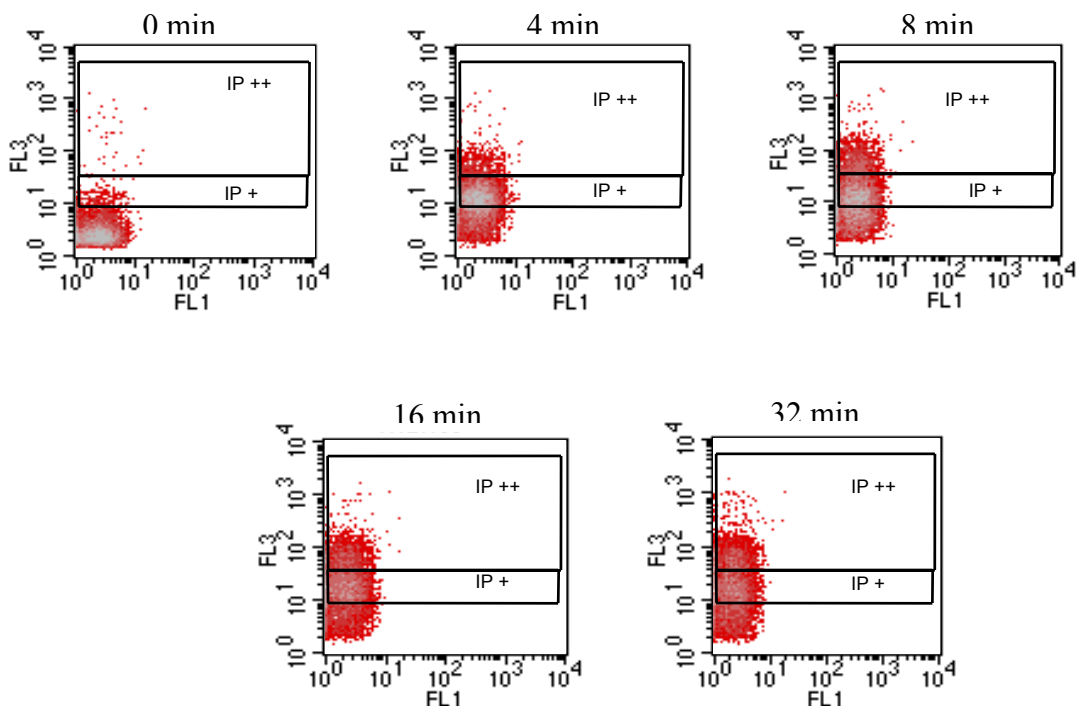


Figure 1 : Suivi au cours du temps de l'état physiologique, par CMF, d'une population bactérienne mise en contact avec de l'eau « traitée » par FCA06 sans ajout d'inhibiteurs de ROS ni d'agent neutralisant de l'argent.

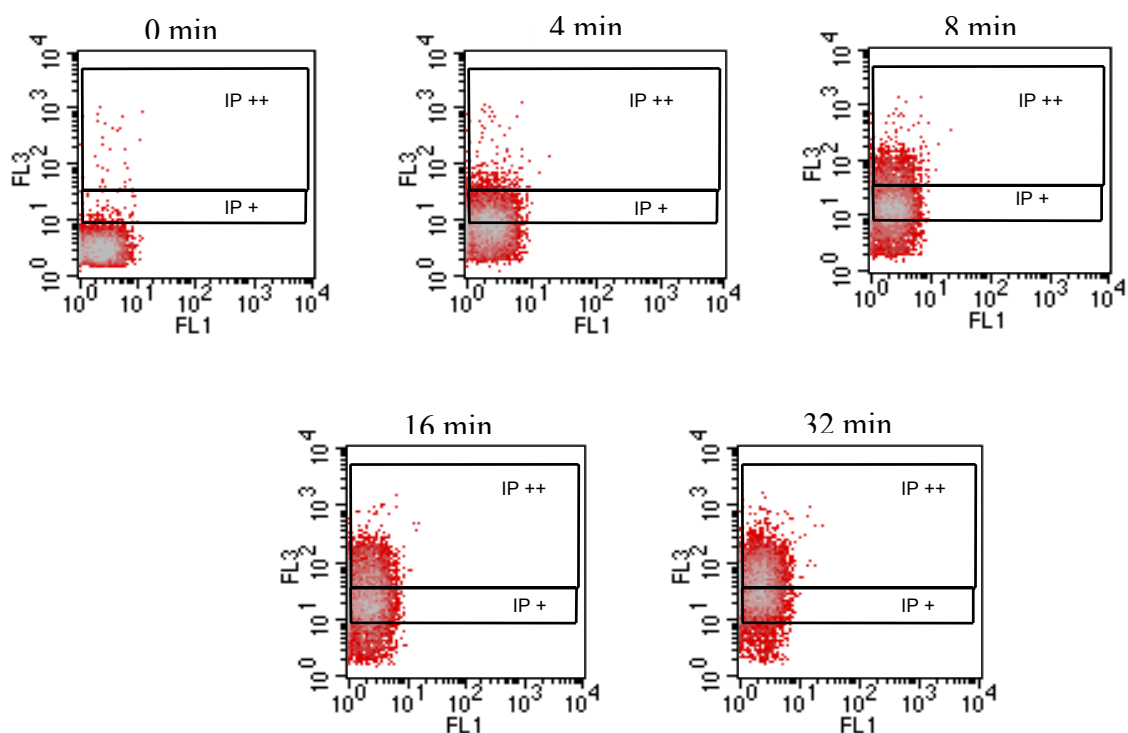


Figure 2 : Suivi au cours du temps de l'état physiologique, par CMF, d'une population bactérienne mise en contact avec de l'eau « traitée » par FCA06 après ajout de catalase.

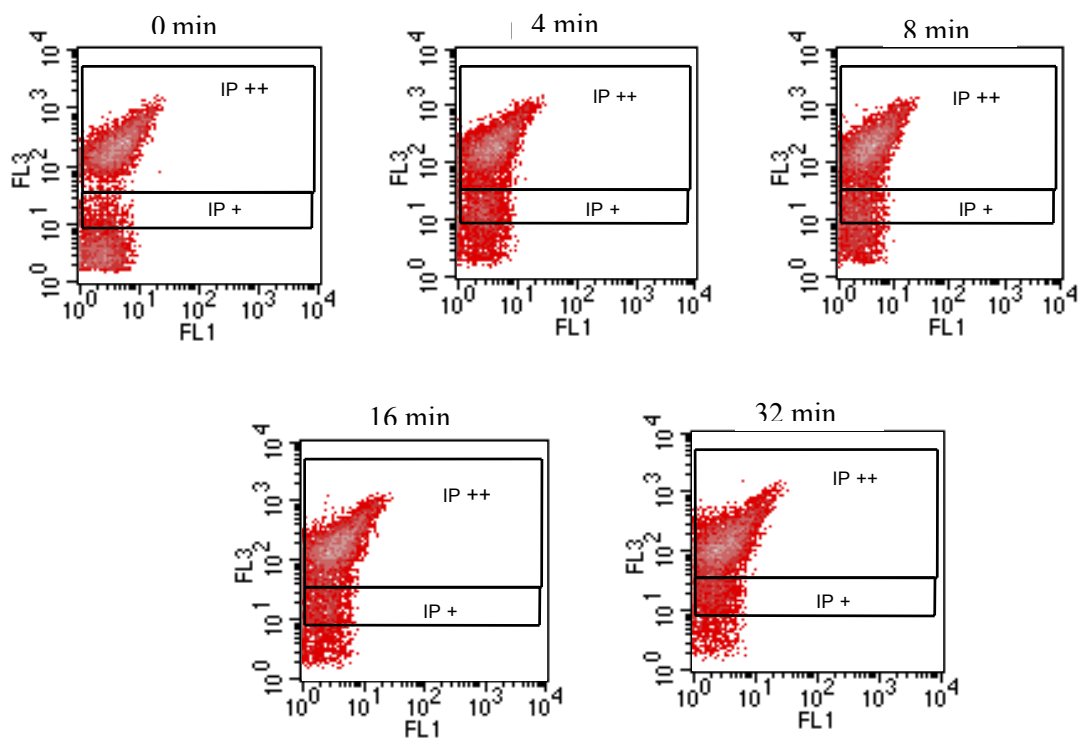


Figure 3 : Suivi au cours du temps de l'état physiologique, par CMF, d'une population bactérienne mise en contact avec de l'eau « traitée » par FCA06 après ajout de SOD.

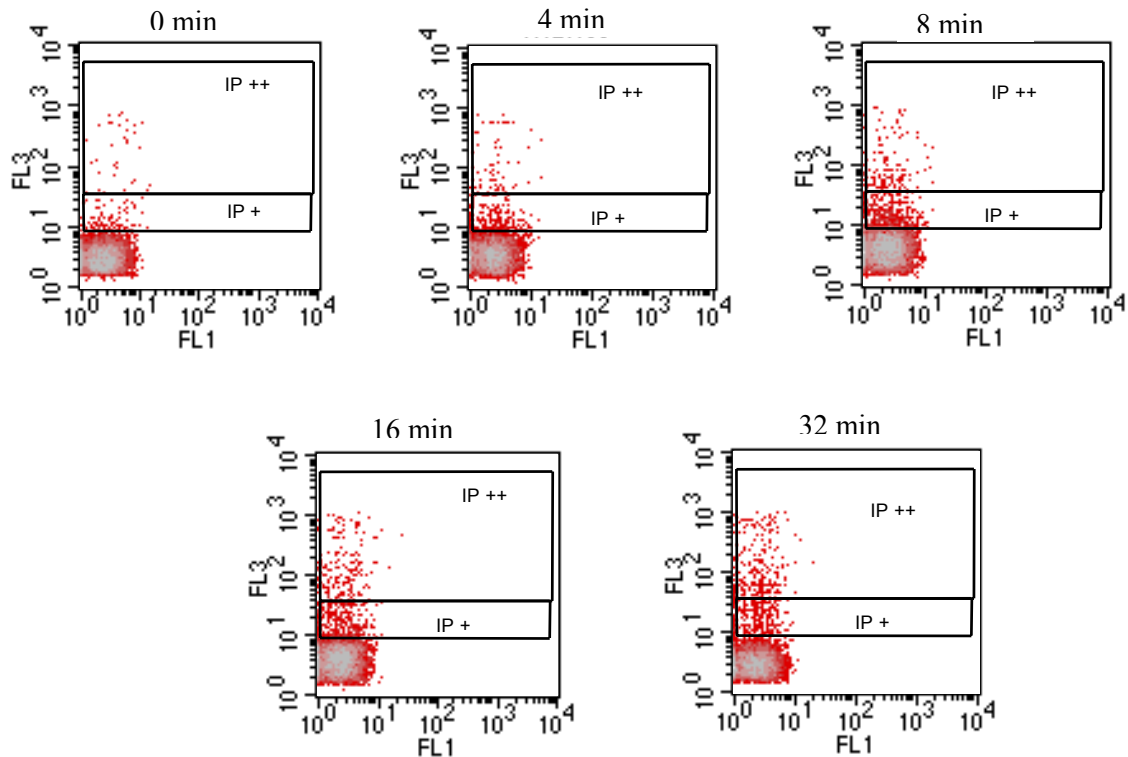


Figure 4 : Suivi au cours du temps de l'état physiologique, par CMF, d'une population bactérienne mise en contact avec de l'eau « traitée » par FCA06 après ajout de thioglycolate de sodium.

ANNEXE 7
DETERMINATION DE LA QUANTITE D'EAU A NEBULISER POUR OBTENIR UNE
HR DE 20 % A 20°C ET POUR UN DEBIT D'AC DE 50L.MIN⁻¹

- Tension de vapeur à 20°C = 2,34 kPa (correspondant à 100 % d'HR)

Une HR de 20 % correspond donc une tension de vapeur de 0,47 kPa à 20°C.

- Pourcentage volumique (% vol) de la tension de vapeur à 20 % de HR:

$\%_{\text{vol}} = (\text{Tension de vapeur} * 100) / \text{Pression atmosphérique}$

$$\%_{\text{vol}} = (0,47 * 10^3 * 100) / 10^5$$

$$\%_{\text{vol}} = 0,47 \%$$

- Le débit d'AC appliqué est de 50 L.min⁻¹, et compte tenu du pourcentage volumique il faudra donc un volume de vapeur d'eau égal à :

$$V = (50 * 0,47) / 100 = 0,23 \text{ L de vapeur d'eau pour un volume d'air de 50 L}$$

Soit un nombre de moles de :

$$PV = nRT \text{ d'où } n = PV/RT$$

$$n = (10^5 * 0,234 * 10^{-3}) / (8,32 * 293)$$

$$n = 0,0096 \text{ mol}$$

soit un poids d'eau : $m = 0,0096 * 18$

$$m = 0,17 \text{ g d'eau}$$

soit 0,17 mL d'eau pour obtenir une HR de 20 % à 50 L d'AC et pour 1 minute.