



UdA | Université d'Auvergne



Université d'Auvergne

Clermont-Ferrand Aurillac Le Puy-en-Velay

Effet bactéricide photoinduit d'une suspension de nanoparticules de TiO_2 sur une souche d'*Escherichia coli*

Muriel Bonnet¹, Christophe Massard², Philippe Veisseire¹, Yves Sibaud²,
Vincent Raspal², Komla Oscar Awitor²

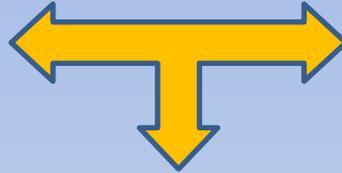
¹Clermont Université, Université d'Auvergne,
Laboratoire de Biologie, 15013 Aurillac

²Clermont Université, Université d'Auvergne,
C-BIOSENS EA-4676, 63000 Clermont-Ferrand



Pluridisciplinarité : pourquoi?

Des physico-chimistes



Des biologistes

Domaines de compétences complètement différents

Besoin de ces deux disciplines pour répondre à une problématique scientifique



Objectifs définis



Plan expérimental

Répartition géographique : 2 sites



Région Auvergne



Puy de Dôme

Rapprochement de deux sites de l'IUT
(Université d'Auvergne)

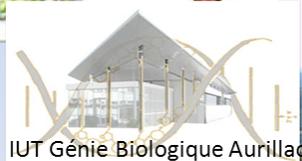
Cantal



Aurillac



Clermont-Ferrand



IUT Génie Biologique Aurillac

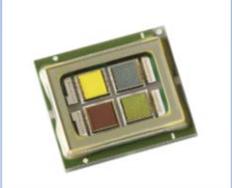


Introduction

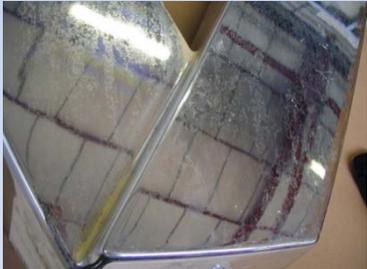
Nanoparticule = nano-objet dont les trois dimensions sont à l'échelle nanométrique, c'est-à-dire une particule dont le diamètre est inférieur à 100 nm environ.

Grands consommateurs d'aujourd'hui :

Oxyde de silicium :
Industrie des pneumatiques (gomme) ;
Ingénierie électronique (stockage de données) ;



Oxyde de titane :
Industrie des cosmétiques (crème solaire, lotions, etc) ;
Industrie du bâtiment (peinture, enduits, etc) ; ...



Milieu médical : nanoparticules de plus en plus utilisées à des fins thérapeutiques mais aussi potentiellement en tant que matière première de dispositifs médicaux pour assurer leur stérilisation.

Introduction

Objectifs de la collaboration entre les deux laboratoires :



Physicochimie :

Elaboration des nanoparticules de dioxyde de titane
Caractérisations physicochimiques (taille, forme, structures de surface)



Biologie :

Démonstration de l'effet bactéricide des nanoparticules
Quantification/détermination des mécanismes responsables



Introduction

Processus d'élaboration de nanoparticules de dioxyde de titane bien maîtrisé.

- formation de nanopoudres de TiO_2
- matériaux pulvérulents, fortement agrégés, donc perte des spécificités liées à la taille nanométrique des entités synthétisées
- Limitation des applications ultérieures envisageables



affranchissement de l'état agrégatif des nanoparticules :

Caractère *in situ* à partir de précurseurs moléculaires en solution (bottom-up), avec obtention de phase cristalline dans des conditions de chimie douce dans une démarche visant à limiter au maximum l'emploi de composants organiques.

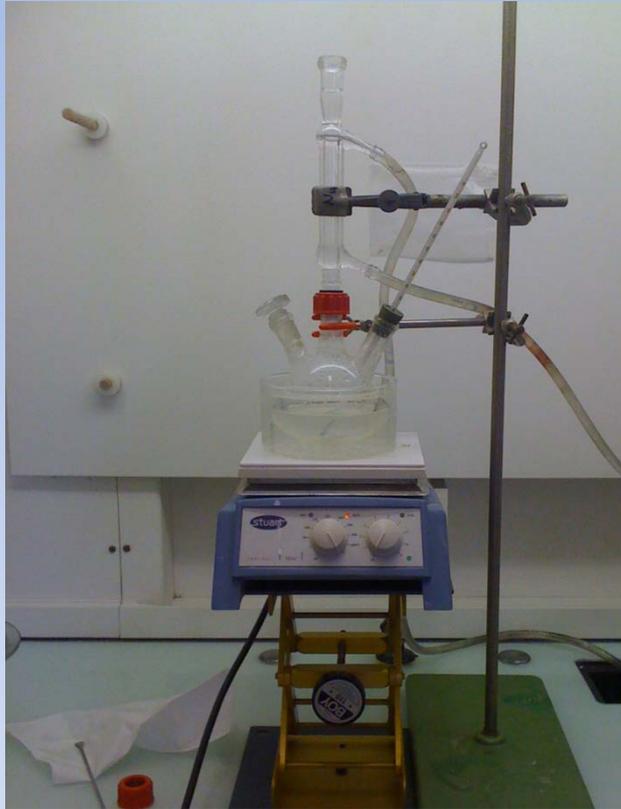
Appel à la fonctionnalisation chimique de surface.

Assure la compatibilité des interfaces.

Garantie d'un état stabilisé de haute dispersion d'entités nanométriques dans un liquide porteur d'intérêt applicatif.

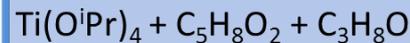
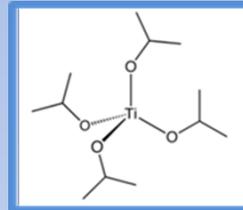
Synthèse d'une suspension de nanoparticules de dioxyde de titane

Synthèse One-pot



Tétraisopropoxyde de titane IV + acétylacétone

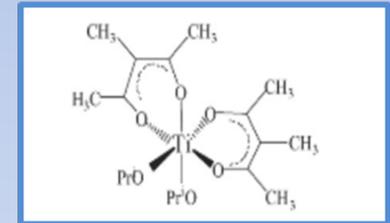
+ liquide porteur { Isopropanol
Eau



Chauffage à reflux
(100°C)

1 - Chélation

Baisse de réactivité
Fonctionnalisation de la surface



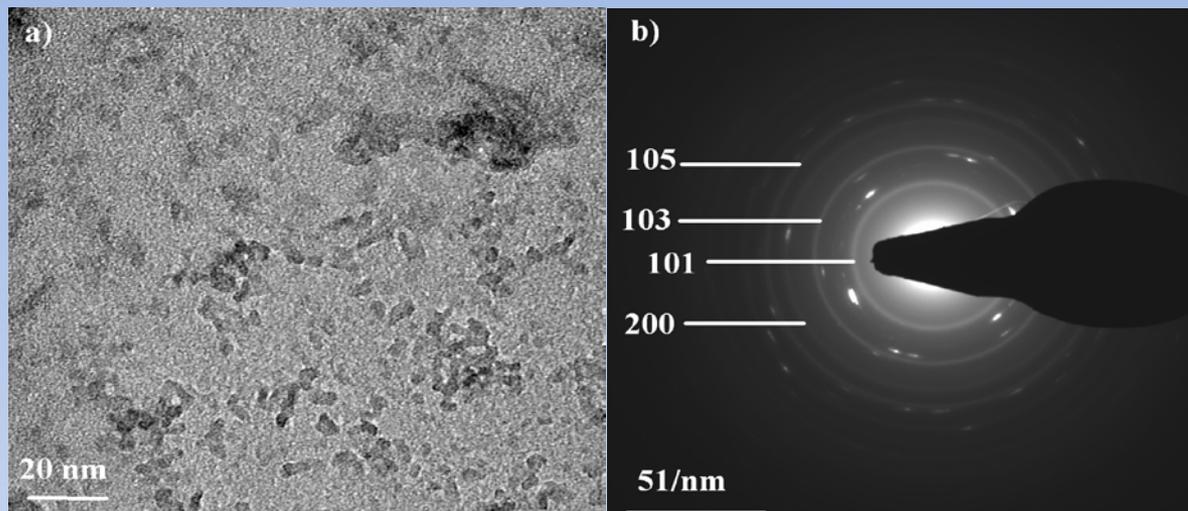
2 - Hydrolyse - Condensation

Suspension de nanoparticules de dioxyde de titane cristallisées dans un liquide porteur



Obtention en une seule étape, à basse température, sans post-traitement thermique.
Hautement modulable par la grande variété des fonctionnalisations chimiques de surface envisageables → Adaptabilité du procédé

Caractérisations physicochimiques de la suspension de TiO_2

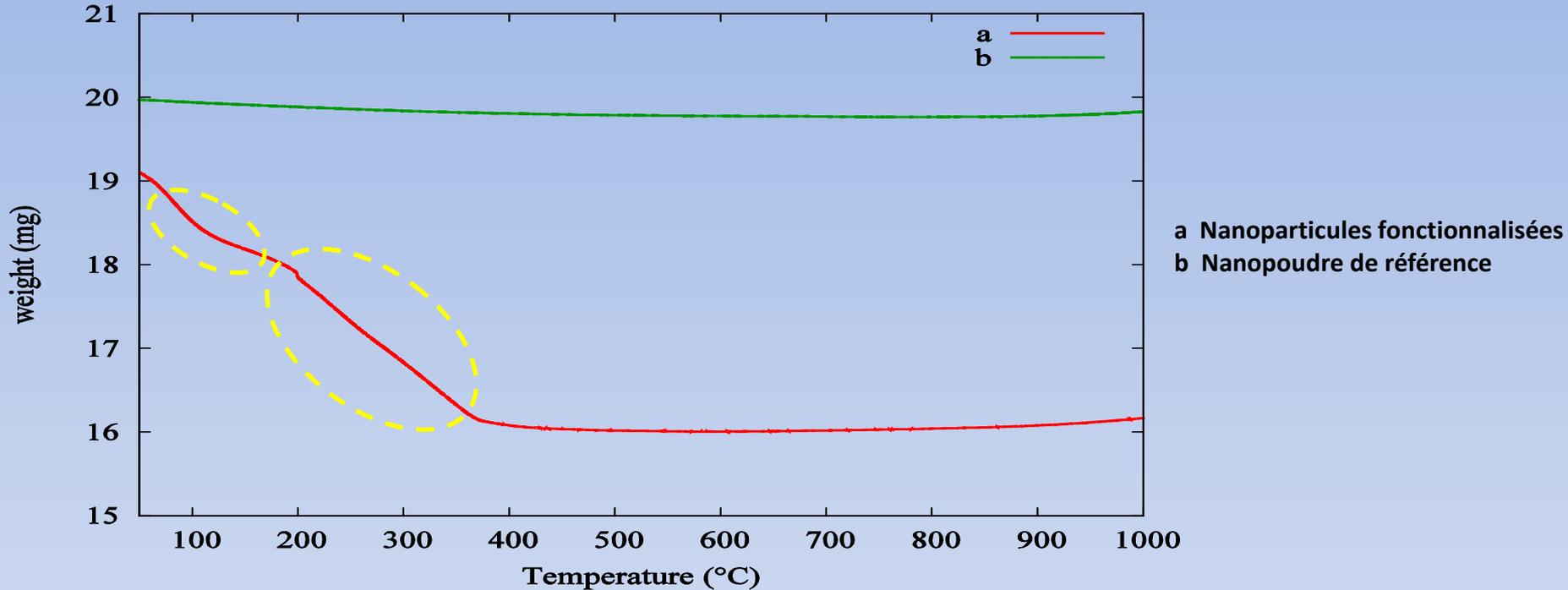


Distance interplanaire déduite du SAED (\AA)	3.57	2.41	1.93	1.70
Distance interplanaire théorique de la phase anatase (\AA)	3.51	2.33	1.89	1.66



Nanoparticules cristallisées sous forme anatase

Thermogravimétrie



Elimination des composés organiques volatils
Pyrolyse des ligands acétylacétonate

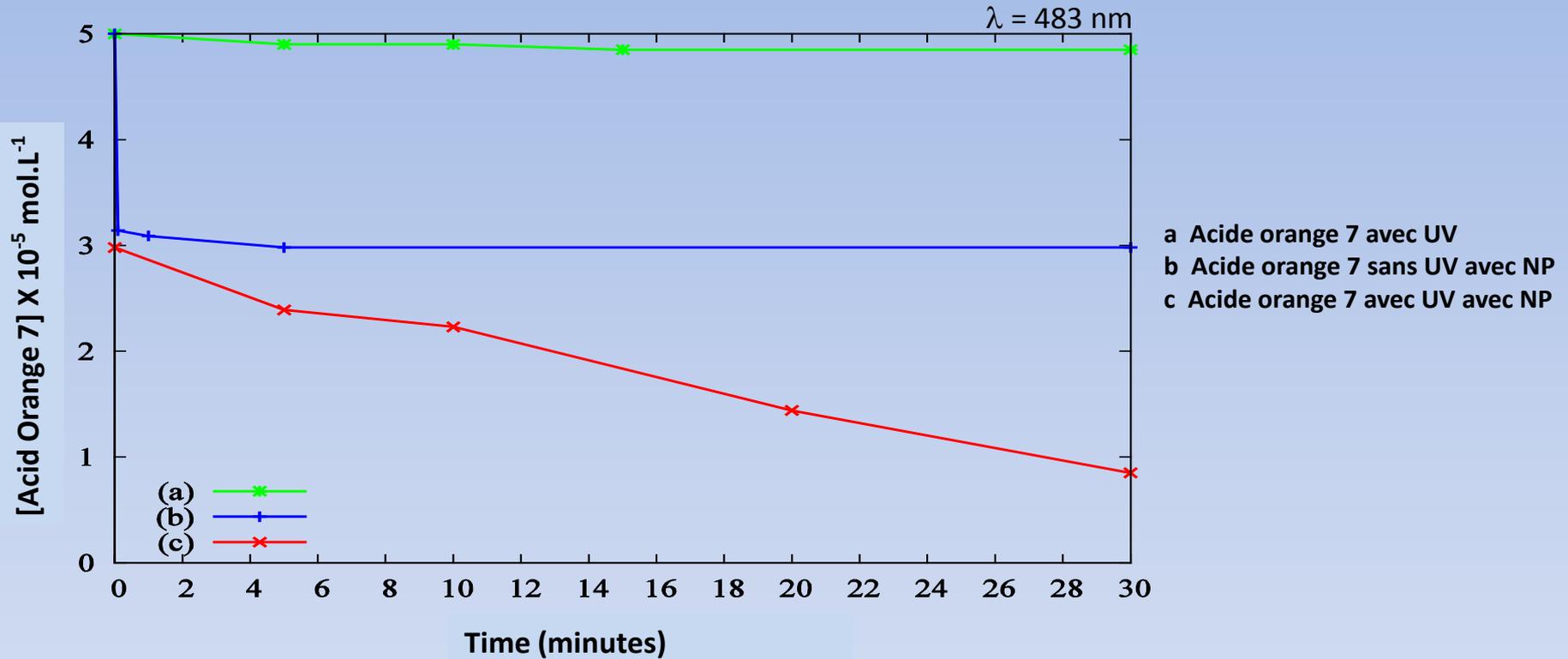


Ancrage de la fonctionnalisation chimique organique de surface



Obtention de l'extrait sec de la suspension
Evaluation de la concentration en nanoparticules dans la suspension

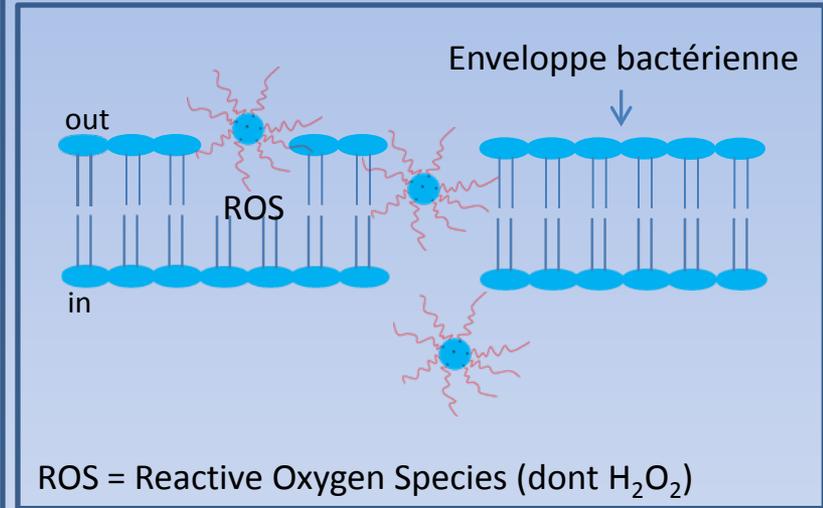
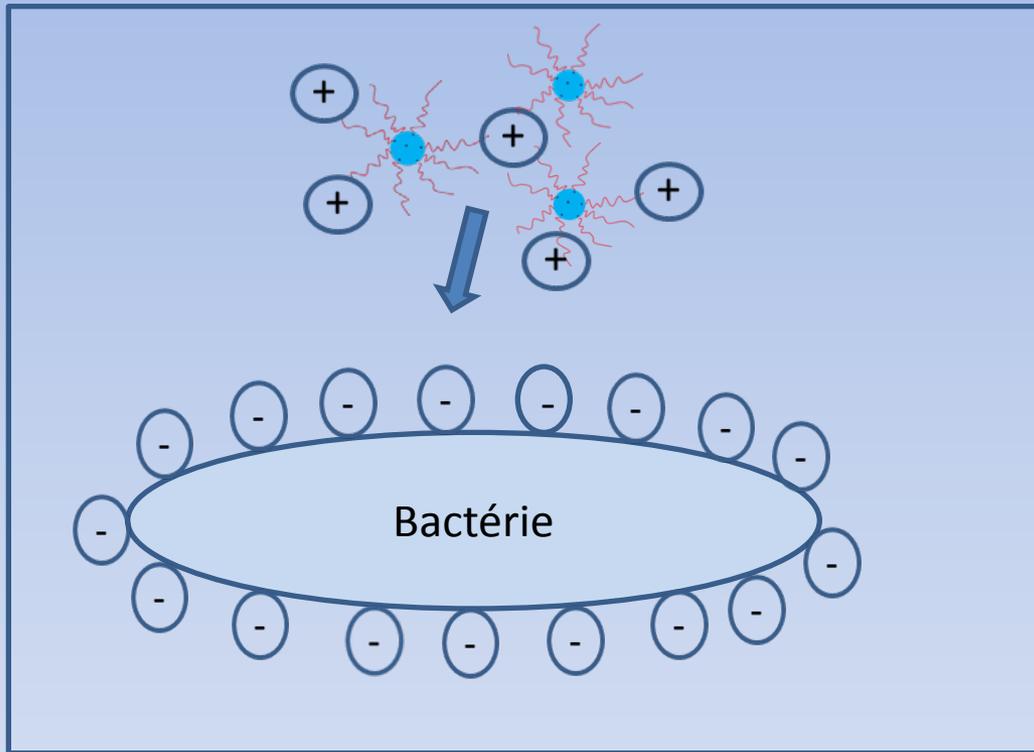
Activité photocatalytique



Mise en évidence de l'activité photocatalytique de la suspension

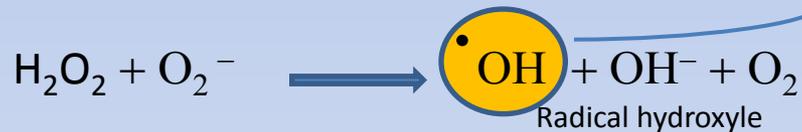
Efficacité antibactérienne photoinduite

Mode d'action des nanoparticules sur les micro-organismes :



Phénomène accentué en présence d'UV

Réactions photochimiques en présence de nanoparticules de dioxyde de titane et d'irradiation UV



Espèces réactives de l'oxygène (ROS)

Espèces toxiques, responsables de la mort du micro-organisme

Mécanismes de détoxification existants, dans une certaine mesure

Hypothèse : effet bactéricide des nanoparticules de dioxyde de titane sous UV

Trouver un système qui permette de travailler :

- en conditions stériles : s'affranchir de toute contamination possible
- sous UV : stimuler l'effet bactéricide des nanoparticules, *via* la production des ROS

 Monter un dispositif sous un Poste de Sécurité Microbiologique, qui permette d'éclairer aux UV par dessus de façon homogène avec une puissance suffisante

 Tubes polychromatiques (100 à 400 nm) avec une puissance de $1,5\text{mW}\cdot\text{cm}^{-2}$ au niveau de la suspension bactérienne

Mise au point du protocole

Deux exigences supplémentaires :

S'assurer de la répartition homogène des NP au sein de la culture bactérienne

S'assurer de la production des ROS

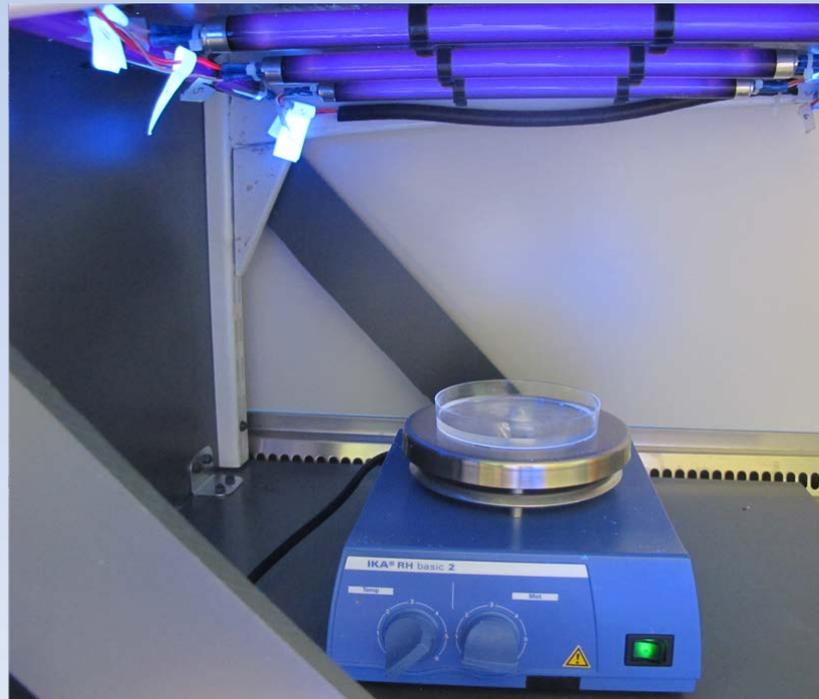


Agitation de la suspension bactérienne

—————> homogénéisation des NP, oxygénation du milieu



20 ml suspension bactérienne dans une boîte de Petri, agitée avec un barreau aimanté sur un agitateur magnétique, irradiée par-dessus par les UV, en conditions stériles :



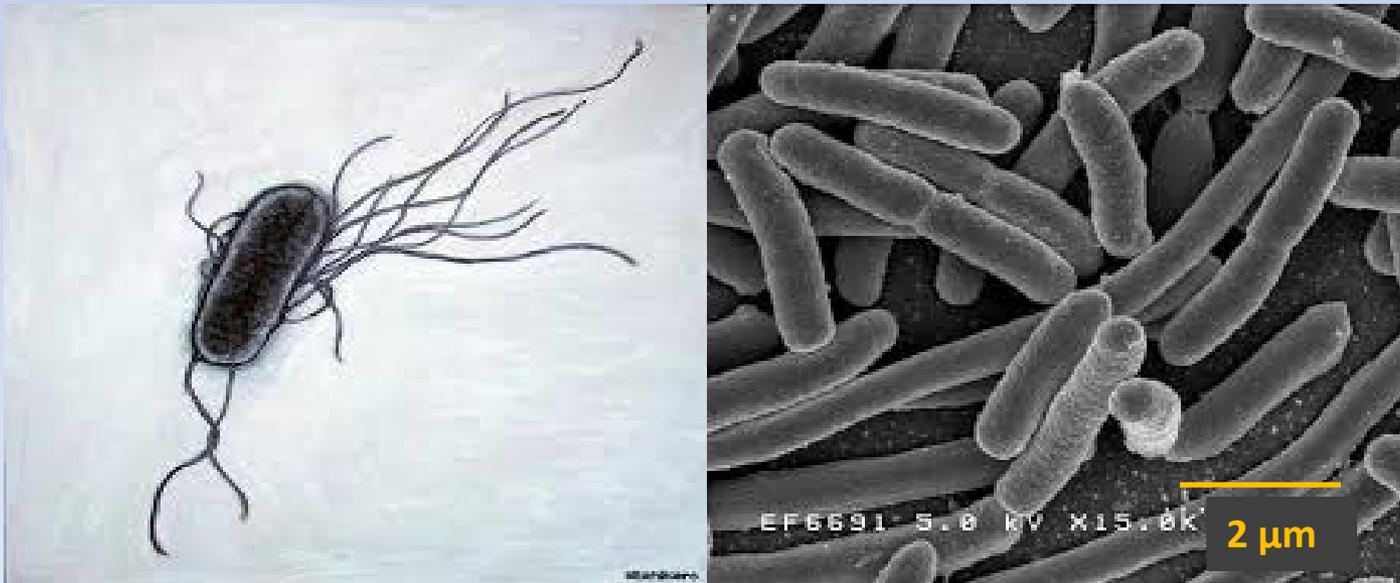
Choix de la bactérie à tester

Escherichia coli : famille des *Enterobacteriaceae*, colibacille, bactérie commune du microbiote intestinal, chez les mammifères, très commune chez l'être humain.

Organisme vivant le plus étudié à ce jour : ancienneté de sa découverte et culture aisée (division cellulaire toutes les 20 minutes à 37 °C dans un milieu riche).

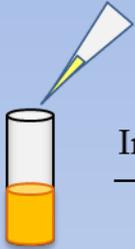
Existe des formes pathogènes pour l'homme.

—————> outil d'étude de choix

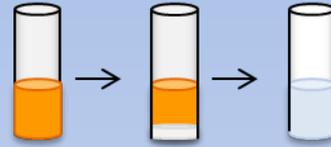


Préparation de la culture bactérienne

100 μl de souche
cryoconservée dans 10 ml de
BNO (Broth Nutrient Ordinary)

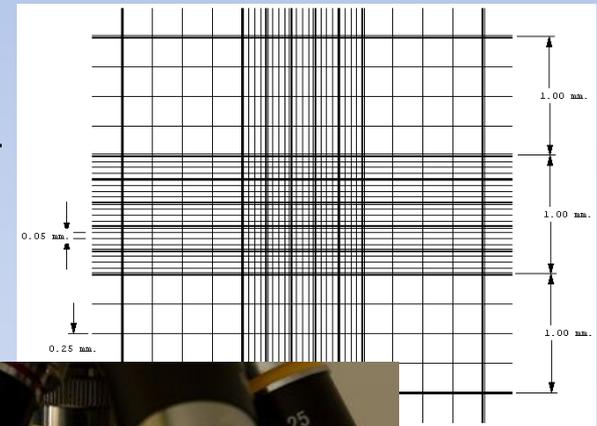


Incubation à 37°C, 12h



Centrifugation
Lavage H₂O ultrapure

Dénombrement sur cellule
de Petroff-Hausser



10^9 cellules.mL⁻¹



Matériel biologique de départ

Différentes conditions testées

Différents temps d'expérimentation : 0h, 1h et 3h

	Obscurité	UV	L	L + UV	NP	NP + UV
<i>E. coli</i> (10^6 cellules.mL ⁻¹)	X	X	X	X	X	X
UV		X		X		X
Liquide porteur*			X	X		
NP (1g.L ⁻¹)					X	X

n = 3

* Isopropanol/eau

Obscurité = témoin

UV = irradiation seule

L = 1 g.L⁻¹ liquide porteur*

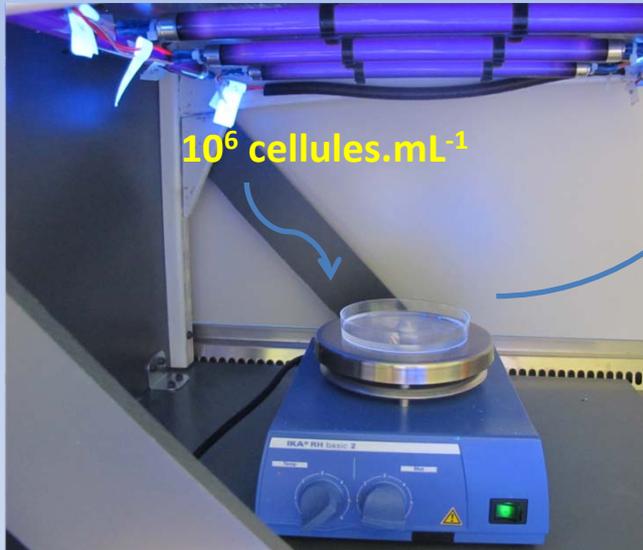
L + UV = 1 g.L⁻¹ liquide porteur* + irradiation

NP = 1 g.L⁻¹ nanoparticules

NP + UV = 1 g.L⁻¹ nanoparticules + irradiation

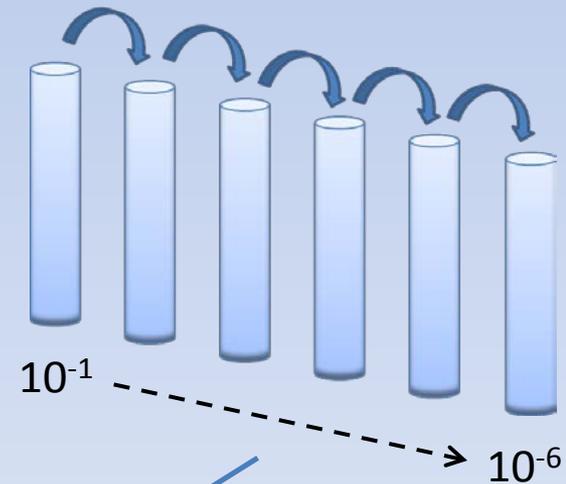
Déroulement expérimental

Irradiation de la suspension bactérienne
0h – 1h – 3h



Prélèvements de 1 ml

Dilutions successives au 1/10

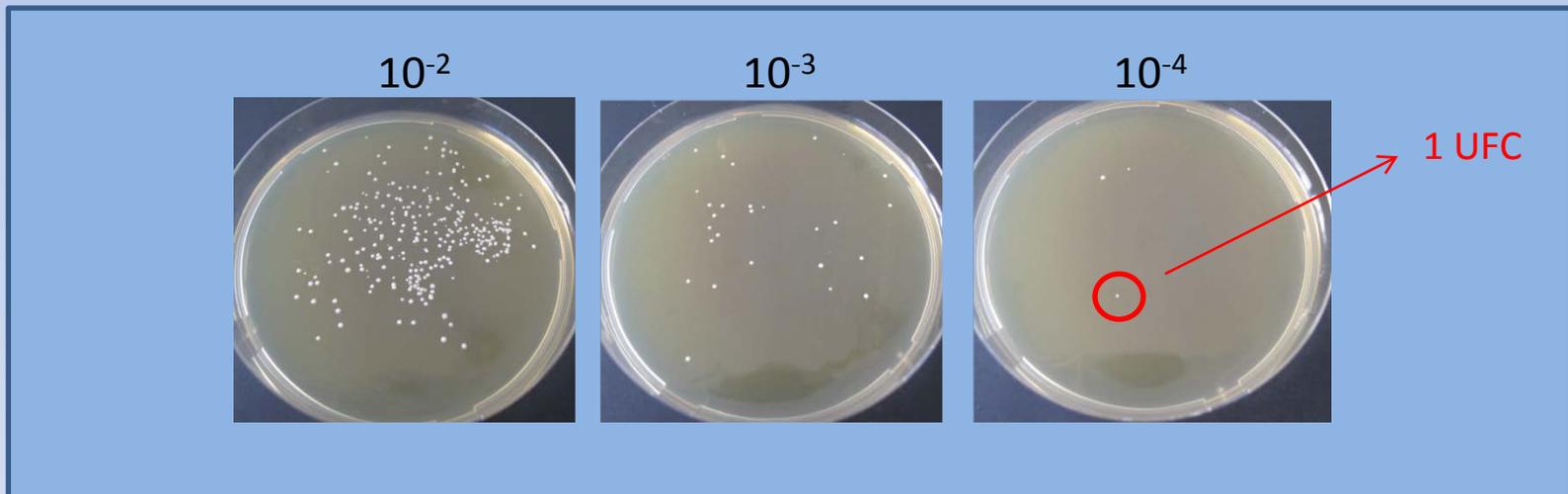


Etalements sur milieu nutritif (boîte de Petri avec gélose)
Incubation à 37°C pendant 12h

Déroulement expérimental

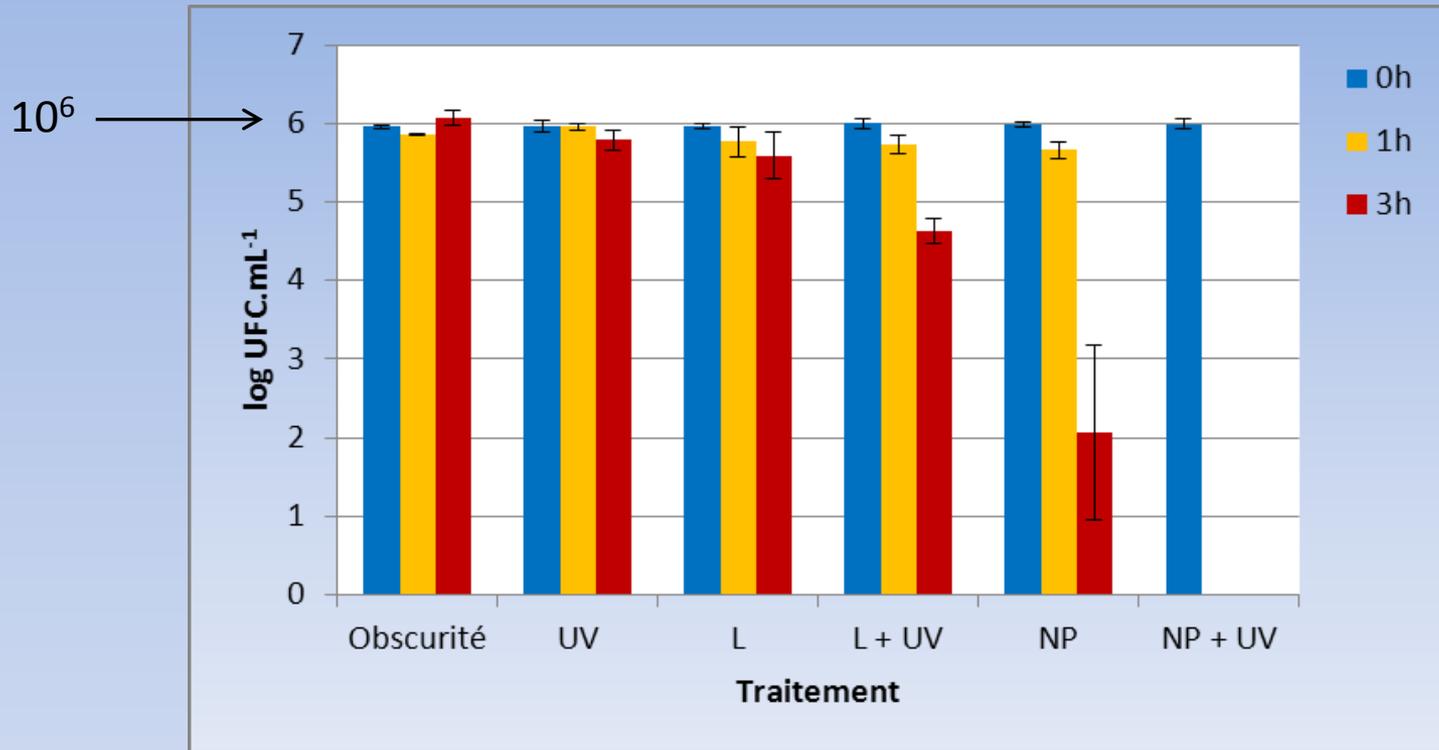
➔ Observation des cellules capables de division

➔ Dénombrements des colonies sur les boîtes de Petri exploitables (30 à 300 colonies (Unités Formant Colonies) par boîte)



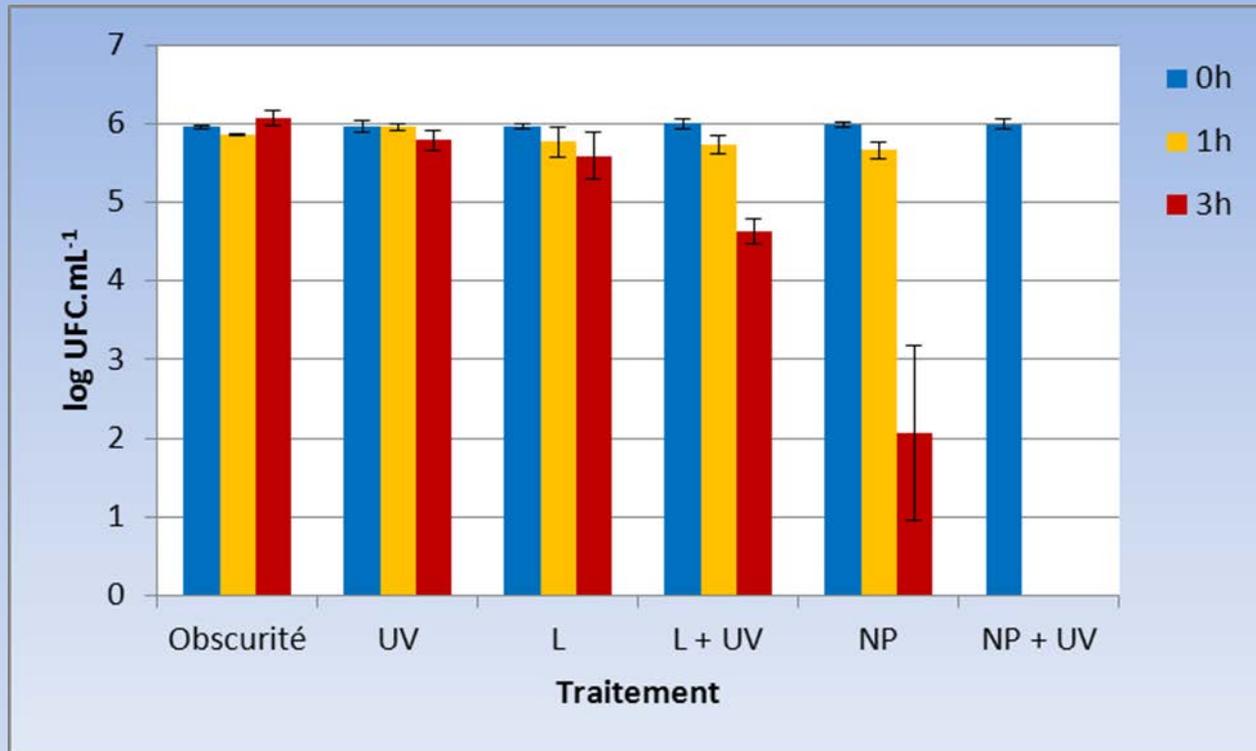
Détermination du nombre de colonies (UFC).mL⁻¹ en fonction du traitement imposé à la suspension bactérienne

Résultats



- ★ Obscurité : survie bactérienne dans le temps
- ★ UV : pas d'effet négatif des UV sur les bactéries
- ★ L : pas d'effet significatif du liquide porteur

Résultats



- ★ L + UV : Diminution de la population bactérienne de 25% au bout de 3h, en présence du liquide porteur avec UV (hypothèse : photoisomérisation, → espèces toxiques).
- ★ NP : Perte de 65% (en log) de la population bactérienne après 3h en présence de NP.
- ★ NP + UV : Disparition totale de la population bactérienne dès 1h d'irradiation en présence de NP.



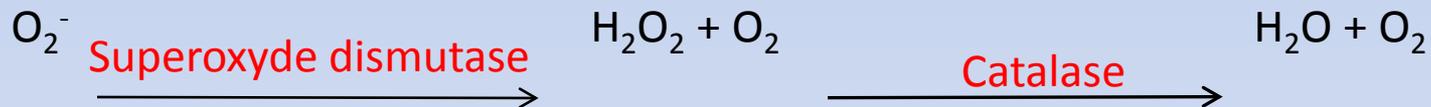
Effet bactéricide photoinduit de la suspension de nanoparticules de dioxyde de titane

Conclusions

- Synthèse de nanoparticules de dioxyde de titane cristallisées en une seule étape dans des conditions de chimie douce, sans traitement énergivore ;
- Fonctionnalisation de surface des nanoparticules, adaptable à de nombreuses applications ;
- Effet bactéricide photoinduit d'une suspension de nanoparticules sur une souche *d'Escherichia coli*  Validation du processus de synthèse
Perspectives d'applications confirmées

Perspectives

- Etudier ce phénomène d'inhibition chez d'autres types de bactéries (dont des pathogènes pour l'homme)
 - au niveau de l'enveloppe bactérienne : paroi gram+ (*Escherichia coli* = paroi gram-).
- Déterminer les mécanismes d'inhibition induits par la présence de nanoparticules : quantification des ROS, et particulièrement H₂O₂.
 -
- Etudier le mécanisme de résistance chez différents type de bactéries au niveau du système de détoxification : catalase - (*Escherichia coli* = catalase +).
 -



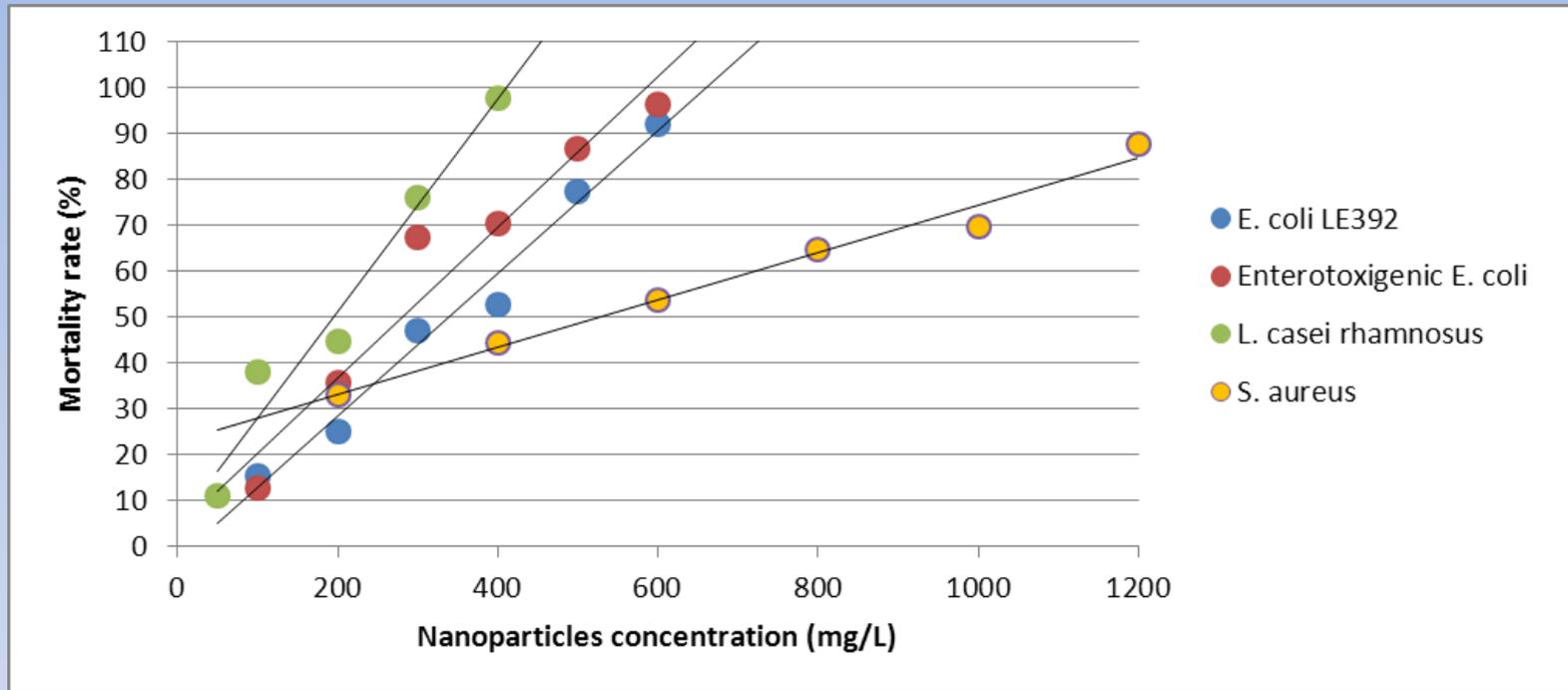
- Suivi d'expression des gènes bactériens impliqués dans le système de détoxification.
- Généraliser l'effet bactéricide des nanoparticules à des surfaces constituées de plaques de titane pour d'autres applications.

Je vous remercie pour votre attention



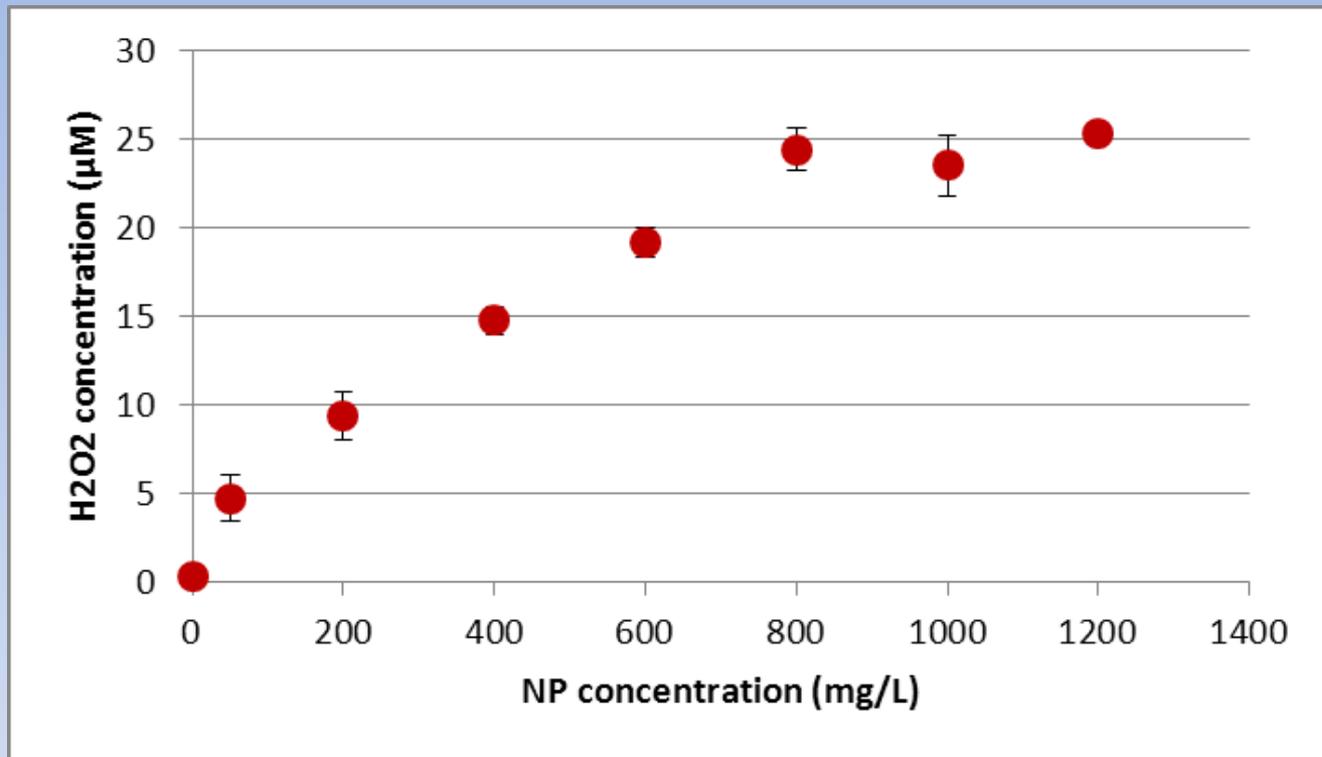
2^{ème} Congrès National de la Recherche en IUT
12,13,14 juin 2013 à Corte





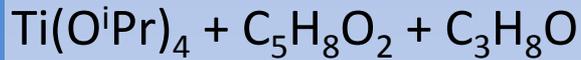
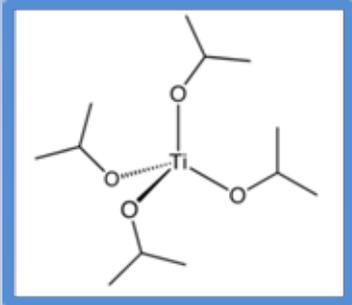
	<i>LE392</i>	<i>ETEC</i>	<i>L.rhamnosus</i>	<i>S. aureus</i>
Paroi	-	-	+	+
Catalase	+	+	-	+

Bacteria		gram	catalase	LC50 (mg/L)
E. coli LE392		negative	positive	340
Enterotoxigenic E. coli		negative	positive	281
L. casei rhamnosus		positive	negative	195
S. aureus		positive	positive	530



Tétraisopropoxyde de titane IV + acétylacétone

+ liquide porteur { Isopropanol
Eau

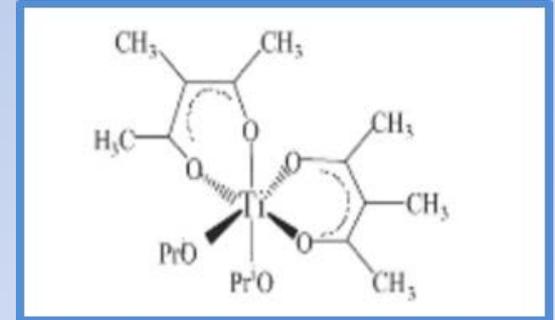


1 - Chélation

Baisse de réactivité
Fonctionnalisation de la surface

**Chauffage à reflux
(100°C)**

2 - Hydrolyse - Condensation



Suspension de nanoparticules de dioxyde de titane cristallisées dans un liquide porteur



Ligand acétylacétonate ancré sur la NP