

Table des matières

Liste des abréviations	4
Table des figures.....	6
Liste des tableaux.....	13
Avant-propos : Présentation du contexte de l'étude	15
Chapitre 1. Introduction générale.....	21
1.1. Les bactéries	21
1.1.1. La forme végétative.....	21
1.1.2. La forme sporulée	24
1.1.3. <i>Escherichia coli</i>	35
1.1.4. <i>Bacillus pumilus</i>	35
1.2. Le faisceau d'électrons pulsés	37
1.2.1. Introduction.....	37
1.2.2. Principe d'un faisceau d'électrons	41
1.2.3. Effet sur les microorganismes	45
1.2.4. Effets sur les matériaux.....	50
1.2.5. Comparaison avec les autres technologies ionisantes.....	52
1.2.6. Présentation du dispositif expérimental.....	52
1.3. Les décharges électriques.....	55
1.3.1. Introduction.....	55
1.3.2. Principe des décharges électriques.....	55
1.3.3. Effets sur les microorganismes	57
1.3.4. Comparaison avec d'autres techniques utilisant des décharges électriques	66
1.3.5. Présentation du dispositif expérimental.....	67
1.4. Conclusion du chapitre	68
Chapitre 2. Matériels et méthodes	69
2.1. Mesure des signaux de courant et de tension	69
2.2. Mesure de la dose délivrée par le faisceau d'électrons.....	69
2.3. Souches étudiées	70
2.4. Préparation des suspensions bactériennes.....	70
2.5. Caractérisation des souches	71
2.6. Evaluation de l'efficacité du traitement.....	72
2.7. Evaluation de l'efficacité en fonction de la phase de croissance après traitement par faisceaux d'électrons	80

2.8. Evaluation de l'efficacité en fonction de l'état de la spore.....	81
2.9. Evaluation de la reprise de croissance après traitement des spores par faisceaux d'électrons	82
2.10. Préparation des échantillons pour l'AFM	82
2.11. Observation par MEB et MET	85
2.12. Evaluation de la perméabilisation de la membrane	87
2.13. Evaluation de l'intégrité de l'ADN génomique	87
2.14. Etude des protéines	94
2.15. Etudes statistiques	99
Chapitre 3. Étude des effets du faisceau d'électrons pulsés.....	100
3.1. Présentation de la problématique.....	100
3.2. Configuration des essais	101
3.3. Mesure des signaux de courant et de tension	101
3.4. Mesure de la pénétration du faisceau	103
3.5. Efficacité du traitement.....	104
3.5.1. Choix de la souche de référence	104
3.5.2. Etude de l'effet de différents paramètres	105
3.6. Détermination des mécanismes responsables de l'inactivation bactérienne	114
3.6.1. Etude des effets au niveau de la paroi bactérienne	114
3.6.2. Etude des effets au niveau de l'ADN	122
3.6.3. Etude des effets au niveau des protéines	134
Chapitre 4. Étude des effets des décharges électriques.....	153
4.1. Présentation de la problématique.....	153
4.2. Configuration des essais	154
4.3. Mesure des signaux de courant et de tension	154
4.4. Efficacité du traitement.....	156
4.4.1. Choix de la souche de référence	156
4.4.2. Etude de l'effet de différents paramètres	157
4.5. Détermination des mécanismes responsables de l'inactivation bactérienne	166
4.5.1. Etude des effets au niveau de la paroi bactérienne	167
4.5.2. Etude des effets au niveau de l'ADN	174
4.5.3. Etude des effets au niveau des protéines	178
Conclusions et perspectives	202
Références bibliographiques	207
Annexes	220
Annexe 1 : Proceeding de l'EAPPC 2016 'Bacteria inactivation by pulsed electron beam'	220

Annexe 2 : Liste des protéines sous-exprimées chez <i>Bacillus pumilus</i> après le traitement par le faisceau d'électrons	224
Annexe 3 : Liste des protéines surexprimées chez <i>Bacillus pumilus</i> après le traitement par le faisceau d'électrons.....	224
Annexe 4 : Liste des protéines sous-exprimées chez les spores de <i>Bacillus pumilus</i> après le traitement par le faisceau d'électrons	225
Annexe 5 : Liste des protéines surexprimées chez les spores de <i>Bacillus pumilus</i> après le traitement par le faisceau d'électrons	225
Annexe 6 : Publication 'Electrical discharges in water induce spores' DNA damage'	226
Annexe 7 : Liste des protéines sous-exprimées chez <i>Bacillus pumilus</i> , d'après l'analyse quantitative à partir des protéines, après le traitement par décharges électriques.....	241
Annexe 8 : Liste des protéines sous-exprimées chez <i>Bacillus pumilus</i> , d'après l'analyse quantitative à partir des peptides, après le traitement par décharges électriques	242
Annexe 9 : Liste des protéines surexprimées chez <i>Bacillus pumilus</i> , d'après l'analyse quantitative à partir des peptides, après le traitement par décharges électriques	243
Annexe 10 : Liste des protéines surexprimées chez les spores de <i>Bacillus pumilus</i> , d'après l'analyse quantitative à partir des protéines, après le traitement par décharges électriques	244
Annexe 11 : Liste des protéines sous-exprimées chez les spores de <i>Bacillus pumilus</i> , d'après l'analyse quantitative à partir des peptides, après le traitement par décharges électriques	245
Annexe 12 : Liste des protéines surexprimées chez les spores <i>Bacillus pumilus</i> , d'après l'analyse quantitative à partir des peptides, après le traitement par décharges électriques	246
Annexe 13 : Définition des termes GO pour la localisation des protéines	250
Annexe 14 : Définition des termes GO pour les processus biologiques des protéines	251
Annexe 15 : Classification des acides aminés, d'après [171]	260

Liste des abréviations

°C : degré Centigrade

A : Ampère

ACN : Acétonitrile

ADN : Acide DésoxyriboNucléique

AF : Acide Formique

AFM : Atomic Force Microscopy - Microscopie à force atomique

AP : APurinique/APirimidique

ARN : Acide RiboNucléique

ATP : Adénosine TriPhosphate

CAP : Covalently Attached Protein - Protéine attachée de manière covalente

Da : Dalton

DPA : DiPicolinic Acid – Acide dipicolinique

DSM : Difco Sporulation Medium - Milieu de sporulation Difco

DO : Densité Optique

EDTA : Ethylène Diamine TétraAcétique

EHD : ElectroHydraulic Discharge - Décharges électrohydrauliques

EtOH : Oxyde d'éthylène

eV : électrons Volt

FWHM : Full Width at Half Maximum – Largeur à mi-hauteur

GO : Gène Ontology

GR : Germination Receptor - Récepteur de la germination

Gy : Gray

•H : Radical hydrogène

Hz : Hertz

H₂O₂ : Peroxyde d'hydrogène

IMP : Integral Membrane Protein – Protéine membranaire intégrale

kb : kilobase

LB : Luria-Bertani

LC : Liquid Chromatography - Chromatographie liquide

LDPE : Low Density Polyethylene - Polyéthylène de faible densité

LMS : Limite de Migration Spécifique

LP : LipoProtéine

LPS : LipoPolySaccharide

LTA : LipoTeichoic Acid - Acide lipotéichoïque

Mb : Mégabase

MEB : Microscopie Electronique à Balayage

MES : Matière En Suspension

MET : Microscopie Electronique en Transmission

min : minute

MS : Mass Spectrometry - Spectrométrie de Masse

NADH : Nicotinamide adénine dinucléotide

NAS : Niveau d'Assurance de Stérilité

•O : Radical oxygène

$^1\text{O}_2$: Singulet de l'oxygène

•OH : Radical hydroxyle

OMP : Outer Membrane Protein - Protéine de la membrane externe

P_{atm} : Pression atmosphérique

PCA : Plate Count Agar - Plaque de gélose pour dénombrement

PEI : PolyEthylène Imine

PFGE : Pulsed Field Gel Electrophoresis - Gel d'électrophorèse en champ pulsé

PI : Propidium Iodide - Iodure de propidium

PPI : Pour Préparation injectable

PVB : PolyVinylButyral

Ra : Rugosité arithmétique

ROS : Reactive Oxygen Species – Espèces réactives de l'oxygène

Rpm : Rotation par minute

s : seconde

SASPs : Small Acid-Soluble Proteins - Petites protéines acido-solubles

SDS-PAGE : Sodium Dodecyl Sulfate - PolyAcrylamide Gel Electrophoresis

TAR : Tour AéroRéfrigérante

TBE : Tris, Borate, EDTA

TE : Tris, EDTA

TES : Tris, EDTA, Sodium

TLE : Transfert Linéique d'Energie

U : Unité enzymatique

UFC : Unité Formant Colonies

UV : UltraViolet

V : Volt

WTA : Wall Teichoic Acid – Acide Téichoïque de la paroi

Table des figures

Figure 1 : Représentation simplifiée d'une bactérie vue en coupe avec des images en microscopie électronique à transmission à droite.....	22
Figure 2 : Schématisation des peptidoglycans constituant la paroi des bactéries, d'après [24]. ..	22
Figure 3 : Agencement des différentes couches de l'enveloppe bactérienne pour les Gram + à gauche et pour les Gram – à droite, d'après [25].	23
Figure 4 : Schématisation des différentes étapes de création de la spore (inspiré des publications [32,33,37]).	26
Figure 5 : Etapes de création du septum, d'après [33].	26
Figure 6 : Création de la préspore, d'après [33].	27
Figure 7 : Réaction en cascade des facteurs de transcription, d'après [38].	28
Figure 8 : Représentation schématique d'une spore vue en coupe (l'échelle des différentes structures n'est pas respectée) avec une image type en microscopie électronique à transmission (MET) à droite (schéma inspiré de [37,39], photo de [40]). Echelle : 200 nm ..	28
Figure 9 : Représentation de l'évolution de la taille d'une spore en fonction de l'humidité relative.....	32
Figure 10 : <i>Escherichia coli</i> observée en microscopie électronique a) à balayage et b) en transmission avec le cytoplasme (Cy), la membrane plasmique (PM) et la paroi (CW), l'échelle est de 5 µm (a), 500 nm (b, image de gauche) et 100 nm (b, image de droite).	35
Figure 11 : <i>Bacillus pumilus</i> observé en microscopie électronique a) à balayage et b) en transmission avec le cytoplasme (Cy), la membrane plasmique (PM) et la paroi (CW), l'échelle est de 500 nm [40].	36
Figure 12 : Classement des rayonnements ionisants.....	38
Figure 13 : Phénomène d'ionisation par une particule chargée, d'après [79].	39
Figure 14 : Phénomène d'excitation et ses conséquences, d'après [78].....	40
Figure 15 : Phénomène d'émission de rayonnements X de freinage ou Bremsstrahlung, d'après [78].	41
Figure 16 : Schéma du fonctionnement des machines à faisceau d'électrons faible énergie. ..	42
Figure 17 : Pouvoir de pénétration des différents rayonnements, d'après [80].....	42
Figure 18 : Notions de parcours et de portée d'un rayonnement particulaire, d'après [78]..	43
Figure 19 : Représentation graphique du TLE des électrons pénétrant la matière en fonction de leur énergie : exemple dans les tissus vivants, d'après [78].....	44
Figure 20 : Evolution de la résistance en fonction du type de bactéries.....	45
Figure 21 : Dépôt d'énergie par des électrons de 75 à 250 keV en fonction de l'épaisseur et de la densité du matériau traversé, d'après [83].....	46

Figure 22 : Dépôt d'énergie par des électrons de 1 à 5 MeV en fonction de l'épaisseur et de la densité du matériau traversé, d'après [83].	47
Figure 23 : Variation du taux de gel de deux échantillons de polymère (LDPE-0030 et LDPE-0200) en fonction de la dose déposée. Le débit de dose est indiqué dans la légende en kGy/min, d'après [93].....	51
Figure 24 : Variation du pourcentage d'élongation de deux échantillons de polymère (LDPE-0030 et LDPE-0200) en fonction de la dose déposée. Le débit de dose est indiqué dans la légende en kGy/min, d'après [93].....	51
Figure 25 : Eclateur sous 12 bars d'azote.....	53
Figure 26 : Schéma des différentes parties constituant le générateur de faisceau d'électrons. Les points de mesure sont indiqués en vert avec U_d pour la tension mesurée au niveau de la diode et I_d , le courant au niveau de la diode.....	54
Figure 27 : Photo de l'équipement de stérilisation par faisceau d'électrons.	54
Figure 28 : Principe de création d'une décharge électrique dans de l'eau (inspiré de [95])... ..	56
Figure 29 : Mécanismes opérant lors de la génération d'un arc électrique dans l'eau, d'après [103].	57
Figure 30 : Effet de la tension et de la distance inter-electrode(s) sur l'effet bactéricide sur <i>Escherichia coli</i> B17 dans un volume d'eau de 1,2 L, d'après [111]. La variable 's' désigne la distance inter-electrodes en mm.	59
Figure 31 : Diagramme de changement d'état de l'eau avec en abscisse la température (T) et en ordonnée la pression (P). Tr désigne le point triple et C, le point critique.....	61
Figure 32 : Phénomène de cavitation d'une bulle d'eau, d'après [119].....	62
Figure 33 : Représentation des différents phénomènes apparaissant suite au phénomène de cavitation, d'après [15].	63
Figure 34 : Répartition des électrons de l'oxygène en fonction de son état dans les différentes couches électroniques, d'après [126].	65
Figure 35 : Principe d'un générateur de Marx.	67
Figure 36 : Photo de l'équipement de décontamination de l'eau par décharge électrique....	68
Figure 37 : Schématisation du protocole d'évaluation de l'efficacité du traitement par le faisceau d'électrons.....	73
Figure 38 : Schématisation de l'expérience avec l'utilisation du papier d'aluminium pour réfléchir les UV émis.....	75
Figure 39 : Temps de demi-vie d'espèces réactives de l'oxygène, d'après [139].	76
Figure 40 : Complexe entre le Fer II et 3 molécules de 1,10-phénanthroline.	79
Figure 41 : Schéma de l'expérience avec le positionnement de la cuvette contenant la solution A.....	79
Figure 42 : Principe général de fonctionnement de l'AFM (inspiré de [143,144]).	83
Figure 43 : Schématisation du mouvement de la pointe lors de son approche et de son éloignement de l'échantillon (JPK Instrument, Technical Note).....	83

Figure 44 : Courbe de force obtenue par AFM (Biophy Research, La microscopie à force atomique (AFM)).	84
Figure 45 : Explication de la mesure de rugosité.	85
Figure 46 : Principe général de la PFGE. Les flèches en bleu montrent le parcours de l'ADN lors de l'application d'un courant entre les paires d'électrodes A-A' et C-C'.....	88
Figure 47 : Electrophorèse CHEF-DR III Chiller System avec à gauche le système de refroidissement, au centre la cuve d'électrophorèse et à droite l'alimentation.	91
Figure 48 : Résumé des différentes étapes de récupération, digestion et migration de l'ADN.	91
Figure 49 : Signaux de courant donnés par les capteurs situés au-dessus de la diode.	102
Figure 50 : Signaux de tension donnés par les capteurs situés au-dessus de la diode.....	102
Figure 51 : Profil de pénétration du faisceau d'électrons dans les films radiochromiques de 20 µm d'épaisseur et de densité 1 après un traitement avec 50 impulsions à 2 cm et 100 Hz. 104	104
Figure 52 : Comparaison de l'efficacité des faisceaux d'électrons.	105
Figure 53 : Différence d'efficacité entre les spores de <i>Bacillus pumilus</i> sur gélose (en vert) et en spot (en rouge). L'analyse statistique a été faite avec un test de Student (** P<0,01) ...	106
Figure 54: Evolution de l'efficacité sur <i>Bacillus pumilus</i> sous forme sporulée en fonction de la distance à la fenêtre d'irradiation.....	107
Figure 55 : Evolution de la dose en fonction de la distance. Les dosimètres ont été placés à côté des dépôts de bactéries. L'analyse statistique a été faite avec un test de Student (** P<0,01 ; *** P<0,0001).....	108
Figure 56 : Evolution de l'efficacité en fonction de la dose déposée et de la distance à la fenêtre d'irradiation. Les losanges représentent une distance de 2 cm, les ronds de 4 cm, les carrés de 7 cm et les triangles de 9 cm.....	108
Figure 57 : Evolution de l'efficacité sur <i>Bacillus pumilus</i> sous forme sporulée en fonction de la fréquence de répétition des impulsions.	109
Figure 58 : Courbe de croissance <i>Bacillus pumilus</i> ATCC 27142 avec le Logarithme népérien de l'absorbance et l'équation correspondant à la tangente à la courbe (en gris) quand les bactéries sont en phase exponentielle de croissance.	110
Figure 59 : Evolution de l'efficacité du traitement en fonction de la phase de croissance de <i>Bacillus pumilus</i> avec la phase exponentielle de croissance à gauche et la phase stationnaire à droite. L'analyse statistique a été faite avec un test de Student (*** P<0,0001).	111
Figure 60 : Suivi de la chute de la DO _{580 nm} de spores de <i>Bacillus pumilus</i> dans du milieu LB.	112
Figure 61 : Evolution de l'efficacité du traitement en fonction de l'état de la spore. A gauche, les spores non incubées et, à droite, les spores incubées 50 min à 37°C. L'analyse statistique a été faite avec un test de Student (NS P>0,05).	113
Figure 62 : Observation des bactéries végétatives par AFM liquide avant et après traitement par le faisceau d'électrons.	115

Figure 63 : Analyse statistique de la rugosité réalisée sur 13 bactéries par condition. En gris, les bactéries témoins et, en orange, les bactéries traitées. L'analyse statistique a été faite avec un test de Student (NS P>0,05).....	115
Figure 64 : Analyse de l'hydrophobicité des bactéries réalisée sur 10 bactéries par condition. En gris, les bactéries témoins et, en orange, les bactéries traitées. L'analyse statistique a été faite avec un test de Student (** P<0,01).....	116
Figure 65 : Observation de l'enveloppe de <i>Bacillus pumilus</i> par MEB.....	117
Figure 66 : Observation de l'organisation de <i>Bacillus pumilus</i> par MET.....	117
Figure 67 : Observation de la forme végétative de <i>Bacillus pumilus</i> avant (a) et après (b) l'application de 2 impulsions de 10 ns à 2cm et 100 Hz	118
Figure 68 : Observation de la paroi des spores par AFM liquide avant et après traitement par le faisceau d'électrons.....	119
Figure 69 : Analyse statistique de la rugosité réalisée sur 15 spores par condition. En gris, les spores témoins et, en orange, les spores traitées. L'analyse statistique a été faite avec un test de Student (NS P>0,05).	120
Figure 70 : Observation de la paroi des spores de <i>Bacillus pumilus</i> par MEB.	120
Figure 71 : Détermination du volume des spores à l'aide des images de MEB.	121
Figure 72 : Observation de l'organisation des spores de <i>Bacillus pumilus</i> par MET.....	122
Figure 73 : PFGE avec, à gauche, le marqueur de taille Lambda et, à droite, le génome extrait des spores de <i>Bacillus pumilus</i> après digestion par NotI.....	124
Figure 74 : Répartition de la taille des différents fragments du génome de <i>Bacillus pumilus</i> après digestion par NotI obtenus à partir de 3 PFGE différentes.....	125
Figure 75 : Principe de fonctionnement de la Nucléase S1 et des Endonucléases IV et V.	126
Figure 76 : PFGE sur l'ADN extrait de <i>Bacillus pumilus</i> sous forme sporulée n'ayant pas subi de traitement par les faisceaux d'électrons.....	128
Figure 77: PFGE sur <i>Bacillus pumilus</i> sous forme végétative sans traitement (puits 1, 2, 5, 6, 9 et 10) et après 2 impulsions de 10 ns à 100 Hz et 2 cm (puits 3, 4, 7, 8, 11 et 12).	130
Figure 78 : PFGE sur <i>Bacillus pumilus</i> sous forme végétative sans traitement (puits 2 et 3) et après 10 impulsions de 10 ns à 100 Hz et 2 cm (puits 4 et 5).....	131
Figure 79 : PFGE sur les souches de <i>Bacillus pumilus</i> sous forme sporulée sans traitement (puits 2, 3, 6 et 7) et après 10 impulsions de 10 ns à 100 Hz et 2 cm (puits 4, 5, 8 et 9).....	133
Figure 80 : Gel SDS-PAGE de la forme végétative de <i>Bacillus pumilus</i> avant (puits 1, 3 et 5) et après (puits 2, 4 et 6) traitement par les faisceaux d'électrons.	135
Figure 81 : Répartition de la localisation des protéines de <i>Bacillus pumilus</i> dans la base de données QuickGO.....	137
Figure 82 : Répartition des processus biologiques des protéines de <i>Bacillus pumilus</i> dans la base de données QuickGO.	138
Figure 83 : Volcanoplot représentant le ratio entre les protéines révélées sur les échantillons essais et témoin pour <i>Bacillus pumilus</i> sous forme végétative.	139

Figure 84 : Résumé des étapes de l'analyse protéomique quantitative à partir des peptides.	140
Figure 85 : Localisation des protéines sous-exprimées par le traitement après 2 impulsions de 10 ns à 100 Hz et 2 cm sur <i>Bacillus pumilus</i>	141
Figure 86 : Représentation typique des termes GO obtenus avec le logiciel QuickGO. Chaque case représente un terme GO. Les liens entre les différents termes sont matérialisés par une flèche noire. Encadré en rouge, un exemple de trois termes GO obtenus pour une même protéine.....	142
Figure 87 : Processus biologiques des protéines sous-exprimées par le traitement après 2 impulsions à 100 Hz et 2 cm sur <i>Bacillus pumilus</i>	143
Figure 88 : Processus biologiques des protéines surexprimées après le traitement après 2 impulsions à 100 Hz et 2 cm sur <i>Bacillus pumilus</i>	144
Figure 89 : Gel SDS-PAGE des spores de <i>Bacillus pumilus</i> avant (puits 1, 3 et 5) et après (puits 2, 4 et 6) traitement par les faisceaux d'électrons.	146
Figure 90 : Volcanoplot représentant le ratio entre les protéines révélées sur les échantillons essais et témoin pour les spores de <i>Bacillus pumilus</i>	147
Figure 91 : Localisation des protéines sous-exprimées par le traitement après 10 impulsions à 100 Hz et 2 cm sur <i>Bacillus pumilus</i> sporulé.	148
Figure 92 : Processus biologiques des protéines sous-exprimées par le traitement après 10 impulsions à 100 Hz et 2 cm sur <i>Bacillus pumilus</i> sporulé.	149
Figure 93 : Localisation des protéines mieux extraites suite au traitement après 10 impulsions à 100 Hz et 2 cm sur <i>Bacillus pumilus</i> sporulé.	150
Figure 94 : Processus biologiques des protéines mieux extraites par le traitement après 10 impulsions à 100 Hz et 2 cm sur <i>Bacillus pumilus</i> sporulé.	151
Figure 95 : Courbes de courant a), de tension b) données par les capteurs situés en sortie du Marx et zoom sur le signal de tension c).	155
Figure 96 : Efficacité des décharges électriques sur la souche <i>Escherichia coli</i> en fonction du nombre d'impulsions appliquées.	156
Figure 97 : Efficacité du traitement pour les bactéries végétatives (en bleu) et les spores (en vert) de <i>Bacillus pumilus</i> . L'analyse statistique a été faite avec un test de Student (* P<0,05 ; ** P<0,01).	157
Figure 98 : Efficacité sur <i>Bacillus pumilus</i> sous forme sporulée après 500 impulsions à 10 Hz dans de l'eau distillée (à gauche) et de l'eau du robinet (à droite). L'analyse statistique a été faite avec un test de Student (NS P>0,05).	158
Figure 99 : Efficacité sur <i>Bacillus pumilus</i> sous forme sporulée après 500 impulsions à 10 Hz à une concentration de 1×10^6 CFU/ML (à gauche) et 1×10^7 CFU/mL (à droite). L'analyse statistique a été faite avec un test de Student (NS P>0,05).	159
Figure 100 : Evolution de l'efficacité des UV sur <i>Bacillus pumilus</i> sous forme sporulée en fonction du nombre d'impulsions.	160

Figure 101 : Courbe étalon pour la mesure de la quantité de Fer II dans la solution par mesure de la DO _{510 nm}	161
Figure 102 : Evolution de la concentration en Fer II en fonction du nombre d'impulsions. .	162
Figure 103 : Evolution de l'efficacité en fonction du nombre de photons produits.....	163
Figure 104 : Courbe de la gamme étalon représentant la valeur de fluorescence à 590 nm en fonction de la concentration en peroxyde d'hydrogène. ..	164
Figure 105 : Concentration en H ₂ O ₂ en fonction du milieu testé après l'application de 500 impulsions à 10 Hz : l'eau du robinet (en vert), l'eau distillée (en bleu) et l'eau distillée contenant du pyruvate à 1 mM (en rouge). L'analyse statistique a été faite avec un test de Student (** P<0,01).....	165
Figure 106 : Différence d'efficacité sur les spores de <i>Bacillus pumilus</i> après 500 impulsions à 10 Hz entre un milieu composé uniquement d'eau distillée (à gauche) et un milieu contenant du pyruvate à 1 mM (à droite). L'analyse statistique a été faite avec un test de Student (** P<0,01).....	165
Figure 107 : Efficacité du traitement du traitement en fonction de l'état de la spore. A gauche, les spores non stimulées thermiquement et, à droite, les spores incubées 50 min à 37°C. L'analyse statistique a été faite avec un test de Student (NS P>0,05).....	166
Figure 108 : Observation de la paroi de <i>Bacillus pumilus</i> par MEB. ..	167
Figure 109 : Observation d'une espèce marine de <i>Vibrio</i> avant (à gauche) et après (à droite) l'application d'une onde de choc en solution ayant pour vitesse 266 m/s, d'après [167]....	167
Figure 110 : Détermination de la longueur de <i>Bacillus pumilus</i> avant le traitement (à gauche) et après 500 impulsions à 10 Hz (à droite) dans un volume de 8 L d'eau distillée. L'analyse statistique a été faite avec un test de Student (** P<0,01).....	168
Figure 111 : Détermination de la largeur de <i>Bacillus pumilus</i> avant le traitement (à gauche) et après 500 impulsions à 10 Hz (à droite) dans un volume de 8 L d'eau distillée. L'analyse statistique a été faite avec un test de Student (*** P<0,0001).....	168
Figure 112 : Observation de l'organisation de <i>Bacillus pumilus</i> par MET.....	169
Figure 113 : Observation de la forme végétative de <i>Bacillus pumilus</i> avant (a) et après (b) l'application de 500 impulsions à 10 Hz.....	170
Figure 114 : Observation de la paroi des spores par AFM liquide avant et après l'application des décharges électriques.....	171
Figure 115 : Rugosité des bactéries témoins (en gris) et traitées (en orange). ..	172
Figure 116 : Force d'adhésion de la pointe à la surface des bactéries témoins (en gris) et traitées (en orange). ..	172
Figure 117 : Observation de la paroi des spores de <i>Bacillus pumilus</i> par MEB. ..	173
Figure 118 : Comparaison du volume des spores à l'aide des images de MEB. ..	173
Figure 119 : Observation de l'organisation des spores de <i>Bacillus pumilus</i> par MET. ..	174
Figure 120 : PFGE sur <i>Bacillus pumilus</i> sous forme végétative sans traitement (puits 1 et 2) et après 500 impulsions à 10 Hz (puits 3 et 4). ..	175

Figure 121 : PFGE sur les souches de <i>Bacillus pumilus</i> sous forme sporulée sans traitement (puits 1, 2, 5, 6, 9 et 10) et après 500 impulsions à 10 Hz (puits 3, 4, 7, 8, 11 et 12).	177
Figure 122 : PFGE sur <i>Bacillus pumilus</i> sous forme sporulée dans une cuvette en Quartz sans traitement (puits 1, 2, 5 et 6) et après 500 impulsions à 10 Hz (puits 3, 4, 7 et 8).	178
Figure 123 : Gel SDS-PAGE de la forme végétative de <i>Bacillus pumilus</i> avant (puits 1, 3 et 5) et après (puits 2, 4 et 6) traitement par les décharges électriques.	180
Figure 124 : Volcanoplot représentant le ratio entre les protéines révélées sur les échantillons essais et témoin (500 impulsions à 10 Hz) pour <i>Bacillus pumilus</i>	181
Figure 125 : Répartition de la localisation des protéines d'intérêt par la stratégie de quantification à partir des protéines sur <i>Bacillus pumilus</i>	182
Figure 126 : Processus biologiques des protéines d'intérêt avec T, le témoin, et E, l'essai (500 impulsions à 10 Hz), sur <i>Bacillus pumilus</i>	183
Figure 127 : Localisation des protéines sous-exprimées par le traitement après 500 impulsions à 10 Hz sur <i>Bacillus pumilus</i>	185
Figure 128 : Processus biologiques des protéines sous-exprimées par le traitement après 500 impulsions à 10 Hz sur <i>Bacillus pumilus</i>	186
Figure 129 : Localisation des protéines surexprimées par le traitement après 500 impulsions à 10 Hz sur <i>Bacillus pumilus</i>	187
Figure 130 : Processus biologiques des protéines surexprimées par le traitement après 500 impulsions à 10 Hz sur <i>Bacillus pumilus</i>	188
Figure 131 : Gel SDS-PAGE des spores de <i>Bacillus pumilus</i> avant (puits 1, 3 et 5) et après (puits 2, 4 et 6) traitement par les décharges électriques.	190
Figure 132 : Volcanoplot représentant le ratio entre les protéines quantifiées sur les échantillons essais et témoin (ayant subi 500 impulsions à 10 Hz) pour les spores de <i>Bacillus pumilus</i>	191
Figure 133 : Répartition de la localisation des protéines révélées par la stratégie de quantification à partir des protéines sur les spores de <i>Bacillus pumilus</i>	192
Figure 134 : Processus biologiques des protéines révélées sur les spores de <i>Bacillus pumilus</i>	193
Figure 135 : Localisation des protéines sous-exprimées par le traitement après 500 impulsions à 10 Hz sur <i>Bacillus pumilus</i> sporulé.	195
Figure 136 : Processus biologiques des protéines sous-exprimées par le traitement après 500 impulsions à 10 Hz sur <i>Bacillus pumilus</i> sporulé.....	196
Figure 137 : Localisation des protéines mieux extraites suite au traitement après 500 impulsions à 10 Hz sur <i>Bacillus pumilus</i> sporulé.....	197
Figure 138 : Processus biologiques des protéines surexprimée chez l'essai après 500 impulsions à 10 Hz pour le critère 'E/T' sur <i>Bacillus pumilus</i> sporulé.	198
Figure 139 : Processus biologiques des protéines surexprimée chez l'essai après 500 impulsions à 10 Hz pour le critère 'T absent' sur <i>Bacillus pumilus</i> sporulé.	199
Figure 140 : Schéma de la synthèse d'une protéine à partir de l'ADN.	199

Liste des tableaux

Tableau 1 : Les exigences de dose pour différents procédés industriels [14].	17
Tableau 2 : Différents types de systèmes de filtration existants.....	18
Tableau 3 : Composition du milieu DSM.....	71
Tableau 4 : Composition du mélange de réaction.	77
Tableau 5 : Composition de la solution A.....	78
Tableau 6 : Composition de la solution B.....	78
Tableau 7 : Composition de la solution C (tampon acétate).....	78
Tableau 8 : Solution de dénaturation TUDSE.....	92
Tableau 9 : Tampon TES	92
Tableau 10 : Tampon de lyse 2X.....	92
Tableau 11 : Tampon de déprotéinisation	92
Tableau 12 : Tampon TE	93
Tableau 13 : Tampon NEB 3 10X	93
Tableau 14 : Tampon T4 PDG 10X	93
Tableau 15 : Tampon Nucléase S1 5 X	93
Tableau 16 : Tampon TAE 50X.....	93
Tableau 17 : Tampon Laemmli 5X	95
Tableau 18 : Composition des gels pour la SDS-PAGE.	95
Tableau 19 : Composition du tampon de migration TG-SDS 10X (Euromedex).	95
Tableau 20 : Valeurs moyennes de tension et de courant pour chaque distance testée.	107
Tableau 21 : Evaluation de l'évolution de la vitesse spécifique maximale de croissance et de la reprise de croissance des spores de <i>Bacillus pumilus</i> après traitement.	113
Tableau 22 : Résultats de la mesure d'absorbance à 260 nm pour l'ADN et 280 nm pour les protéines.	119
Tableau 23 : Résultats de la simulation de digestion du génome de <i>Bacillus pumilus</i> SAFR-032 par l'enzyme de restriction NotI.....	123
Tableau 24 : Taille des fragments de <i>Bacillus pumilus</i> obtenus après digestion avec NotI... ..	125
Tableau 25: Enzymes utilisées pour révéler les différents types de dommages en utilisant la PFGE.....	127
Tableau 26 : Dosage des protéines contenues dans les échantillons à partir de différentes cultures de <i>Bacillus pumilus</i> végétative avant et après le traitement avec 2 impulsions de 10 ns à 2 cm et 100 Hz.....	135

Tableau 27 : Résumé des quatre critères considérés pour l'analyse quantitative à partir des peptides. Le T représente les valeurs obtenues pour témoin et le E celles pour l'essai.....	140
Tableau 28 : Nombre de protéines quantifiées après l'application de 2 impulsions de 10 ns à 2 cm et 100 Hz pour <i>Bacillus pumilus</i>	141
Tableau 29 : Dosage des protéines contenues dans les échantillons à partir d'une solution de spores de <i>Bacillus pumilus</i>	145
Tableau 30 : Nombre de protéines quantifiées après l'application de 10 impulsions à 2 cm et 100 Hz pour <i>Bacillus pumilus</i> sporulé	148
Tableau 31 : Résultats de la mesure d'absorbance à 260 nm pour l'ADN et 280 nm pour les protéines dans le milieu.	170
Tableau 32 : Dosage des protéines contenues dans les échantillons à partir de différentes cultures de <i>Bacillus pumilus</i> végétative avant et après le traitement avec 500 impulsions et 10 Hz.....	179
Tableau 33 : Nombre de protéines quantifiées après l'application de 500 impulsions et 10 Hz pour <i>Bacillus pumilus</i>	184
Tableau 34 : Dosage des protéines contenues dans les échantillons à partir d'une solution de spores de <i>Bacillus pumilus</i> après le traitement par décharges électriques avec 500 impulsions et 10 Hz.....	189
Tableau 35 : Nombre de protéines quantifiées après l'application de 500 impulsions et 100 Hz pour <i>Bacillus pumilus</i> sporulé	194

Avant-propos : Présentation du contexte de l'étude

Dans la société actuelle, il est demandé aux industriels de répondre à des normes d'hygiène de plus en plus strictes.

Les moyens utilisés pour la stérilisation des emballages, par exemple, sont constamment remis en cause, notamment concernant les produits chimiques dont l'utilisation peut être interdite par Bruxelles.

L'emploi de produits chimiques représente également un problème pour la décontamination des tours aéroréfrigérantes (TAR). En effet, leur action corrosive sur les conduites d'eau peut conduire à l'apparition de fuites.

Par conséquent, les besoins en technologies innovantes ne nécessitant pas l'utilisation de produits chimiques sont une réalité. Dans le cadre de cette étude, deux technologies sont utilisées : les faisceaux d'électrons pulsés pour la décontamination d'emballages et les décharges électriques dans l'eau pour le traitement de l'eau des TAR.

Les travaux menés ont pour objectif de mieux comprendre l'influence des différents paramètres des générateurs sur l'efficacité de décontamination des procédés et également de pouvoir expliquer les mécanismes qui conduisent à la mort des bactéries.

Techniques utilisées pour la stérilisation d'emballages

Il existe actuellement sur le marché de nombreuses techniques de stérilisation chimique et physique. L'oxyde d'éthylène (EtO), le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) ou l'acide peracétique sont couramment employés par les industriels du milieu de l'alimentaire ou de la pharmaceutique pour stériliser les emballages. Des méthodes physiques sont également utilisées depuis les années 1895, comme les rayonnements ionisants (rayons X et gamma). Ce type de technologie permet de traiter le produit, son emballage voire même le produit dans son emballage. L'utilisation de rayons gamma est limitée dans l'industrie de transformation des aliments car ce type de stérilisation est mal accepté par le consommateur du fait de l'utilisation d'une source radioactive ^{60}Co (Cobalt). Il est cependant régulièrement utilisé pour la stérilisation d'emballage alimentaire ou de produits pharmaceutiques [1,2].

De nouvelles technologies émergent comme l'utilisation de lumière ultraviolette pulsée [3], de système de filtration ou de faisceaux d'électrons.

Le choix de la technologie est dépendant, tout d'abord, du produit à traiter. Par exemple, la lumière pulsée n'ayant pas de pouvoir pénétrant ne pourra être utilisée que pour la décontamination de surface sans aspérité (emballage ou alimentaire).

De plus, l'efficacité de chaque moyen de stérilisation dépend de différents facteurs comme le nombre de microorganismes et de leurs caractéristiques (type, composition en protéines, lipopolysaccharides). Ces points sont à prendre en considération par l'industriel dans le choix de la technique de stérilisation qu'il souhaite utiliser [2].

Emploi des faisceaux d'électrons

Les applications de ce type de technologie concernent la modification de la surface de matériaux, le traitement de gaz toxique, de courriers suspects ou la décontamination chimique ou biologique. C'est ce dernier point qui nous intéresse. Les faisceaux d'électrons sont efficaces sur les champignons, les bactéries et les virus mais pas sur les prions [2]. Dans le cadre de cette étude, le générateur de faisceaux d'électrons est destiné à la stérilisation d'emballages pour les industries alimentaires, pharmaceutiques ou cosmétiques. La stérilisation rapide de surface sans dommage physique ou chimique du matériau est l'une des applications possibles des faisceaux d'électrons qui ne peut pas être atteint avec d'autres techniques [4-6].

Cependant, compte tenu du règlement (UE) N° 10/2011 de la commission du 14 janvier 2011, les emballages plastiques destinés à être mis au contact de denrées alimentaires doivent être contrôlés pour vérifier que des espèces chimiques ne se retrouvent pas dans le produit final à des concentrations trop importantes. Il existe pour cela une liste positive qui répertorie tous les composés chimiques autorisés avec une limite de migration spécifique (LMS, en mg/kg) et des conditions d'essais normalisées qui simulent le futur produit destiné à être mis en contact avec l'emballage et les conditions de contact prévues.

De plus, des analyses sensorielles sont effectuées afin de s'assurer que les propriétés de l'aliment emballé ne sont pas affectées. En effet, une modification des propriétés organoleptiques du produit est rédhibitoire à l'utilisation de la technologie. La migration de substances non identifiées dans les denrées alimentaires n'est pas seulement un problème de l'irradiation mais concerne toutes les techniques de décontamination ou stérilisation. Une norme, acceptée à l'échelle européenne, pour l'évaluation des impuretés non identifiées dans des matériaux d'emballage est donc nécessaire. Une limite de migration spécifique générique est par ailleurs fixée à 0,01 mg/kg pour les substances qui n'ont pas de LMS [7-9].

En fonction du produit à traiter, l'énergie des électrons est différente. L'énergie des faisceaux d'électrons est exprimée en électron Volt (eV) et correspond à l'énergie cinétique des électrons. Classiquement, les faisceaux d'électrons ayant une énergie inférieure à 500 keV sont classés parmi les faisceaux dits de basse énergie, alors que ceux avec une plus forte énergie sont dits de haute énergie [10].

Les faisceaux d'électrons de haute énergie sont couramment utilisés pour l'élimination des microorganismes pathogènes dans l'industrie alimentaire. Cependant, l'application de haute énergie dans l'industrie alimentaire est limitée en raison de la grande taille des unités, dues notamment aux exigences de tension et à un blindage complexe. Cela contraint les industriels à sous-traiter cette étape de stérilisation à un organisme ce qui pose un problème de gestion des stocks [1]. De plus, ce type de faisceaux va induire une augmentation de la température du produit traité. Par exemple, avec un faisceau de 10 MeV, la température au début des essais est de 22°C pour atteindre 30°C, après 12 kGy [11]. Cette augmentation de température peut avoir une incidence sur le produit traité que ce soit une denrée ou un emballage.

Par conséquent, des technologies de faible énergie ont été développées pour avoir un moyen implantable sur une ligne de production et avec un blindage plus léger. Des technologies de faisceau d'électrons pulsés (de l'ordre de la μ s) permettent également d'avoir moins d'effet thermique [1].

Une fois implantée sur une ligne de production, il est demandé que chaque produit ou lot de produits soit certifié stérile. Pour ce faire, une grandeur physique propre aux technologies ionisantes a été choisie. Elle est nommée dose et correspond à l'énergie déposée par unité de masse (J/kg) et s'exprime en Gray (Gy). Il est admis que c'est la dose reçue, et non l'énergie des électrons, qui détermine le niveau d'efficacité sur les microorganismes. D'après la norme NF EN ISO 11137-1:2006, relative à la stérilisation des produits de santé, 25 kGy (ou 15 kGy si la charge bactérienne moyenne est inférieur à 1,5) est définie comme la dose de référence qui garantit un niveau de stérilité (Sterility Assurance Level ou SAL) de 10^{-6} [12].

Les faisceaux d'électrons de faible énergie sont plus adaptés pour le traitement de surfaces en raison, comme expliqué plus loin, de leur faible profondeur de pénétration et des doses plus élevées délivrées à la surface [13].

En fonction de l'application souhaitée, la dose requise n'est pas la même car les effets recherchés sont différents. Le Tableau 1 récapitule les doses fréquemment retrouvées en fonction du milieu industriel ou de l'objectif à atteindre.

Tableau 1 : Les exigences de dose pour différents procédés industriels [14].

Inhibition de la croissance	0,1-0,2 kGy	Stérilisation	10-30 kGy
Désinfection contre les insectes	0,3-0,5 kGy	Polymérisation	20-50 kGy
Contrôle des parasites	0,3-0,5 kGy	Greffé de monomères	20-50 kGy
Retardement du mûrissement	0,5-1 kGy	Réticulation de polymères	50-150 kGy
Contrôle des champignons	1,5-3 kGy	Dégradation de polymères	500-1500 kGy
Contrôle des bactéries	1,5-3 kGy	Coloration de pierres précieuses	>>> 1500 kGy

Techniques utilisées pour la décontamination de l'eau

Une autre problématique de santé est le contrôle de la qualité de l'eau et particulièrement dans des installations où elle est à une température idéale de prolifération des microorganismes. Les TAR sont un bon exemple avec la prolifération des légionnelles dans l'environnement. Il a été recensé 1 389 cas de légionellose en 2015 en France. Les principales zones d'expositions à risque recensées parmi les cas de légionelloses sont la catégorie voyage (22%), les hôtels/campings (13%) et les hôpitaux (8%) (source : Santé publique France (<http://invs.santepubliquefrance.fr/Dossiers-thematiques/Maladies-infectieuses/Infections-respiratoires/Legionellose/Donnees/Bilan-des-cas-de-legionellose-survenus-en-France-en-2015>)). Actuellement, la décontamination des TAR utilise des méthodes chimiques en ajoutant du chlore dans les circuits. Cependant, lorsque les légionnelles se trouvent sous forme de biofilms l'efficacité est quasi-nulle. De plus, la rouille au niveau des canalisations est également un point qui ne joue pas en la faveur de l'utilisation de produits chlorés. Le développement par la société ITHPP d'un générateur électrique produisant des arcs électriques dans l'eau avec la génération d'ondes de choc essaye de répondre à la problématique de traitement de l'eau notamment celle des TAR. Le but de l'étude est donc de voir si ce type de technologie est suffisamment efficace pour traiter l'eau en circulation mais également de comprendre les mécanismes entrant en compte dans l'élimination de la contamination.

Différentes techniques sont couramment employées pour la décontamination de l'eau. La méthode la plus courante est l'utilisation d'agents oxydants à base de chlore, comme l'hypochlorite de sodium ou eau de Javel. Cependant, il a été montré que ces agents pouvaient interagir avec des matières organiques présentes dans l'eau et produire des espèces indésirables (par exemple, le trihalométhanes). Un traitement des effluents est donc nécessaire pour limiter ce risque [15]. Par conséquent, de nouvelles méthodes ont été développées et sont implantées au niveau industriel.

Une méthode, toujours chimique, utilisant l'ozone comme agent oxydant est ainsi utilisée. L'ozone a l'avantage de permettre des actions complémentaires dans la destruction d'un grand nombre de micropolluants et dans l'amélioration des goûts, des odeurs et dans la destruction des couleurs. Il se décompose en oxygène ce qui évite d'avoir à traiter l'eau, comme c'est le cas pour les produits chlorés. Par contre, le coût d'investissement de cette méthode est relativement important (entre 40-1 500 k€) et n'est pas compatible avec tous les matériaux [16].

Pour ce qui est des méthodes physiques, l'une des solutions est la filtration.

Il existe différents types de filtration résumés dans le Tableau 2.

Tableau 2 : Différents types de systèmes de filtration existants.

Type de filtration	Taille des pores	Pression nécessaire	Consommation
Microfiltration	0,1 - 10 µm	0,1 à 4 bars	0,4 – 0,9 kWh/m ³
Ultrafiltration	0,01 – 0,1 µm	0,5 à 9 bars	0,9 – 1,5 kWh/m ³
Nanofiltration	0,001 – 0,01 µm	4 à 20 bars	1,2 – 2,5 kWh/m ³
Osmose inverse	0,0001 – 0,001 µm	10 à 80 bars	4 - 5 kWh/m ³

Pour l'élimination des bactéries, la microfiltration est suffisante. Le principal avantage est que les bactéries ne sont pas simplement inactivées par le système mais entièrement retirées du circuit d'eau. Par contre, les membranes peuvent vieillir naturellement et ce vieillissement peut être accéléré lors de lavages chimiques ou de rétrolavages. Ces vieillissements vont venir affecter les capacités de désinfection. En unité de filtration, on a une diminution de 6 voire de 7 \log_{10} pour les bactéries. Lorsqu'il y a une fibre de cassée, il y a une perte d'efficacité de l'ordre de 2 \log_{10} . Par conséquent, le contrôle de l'intégrité se fait une fois par jour et un lavage des membranes une fois par semaine est nécessaire. Un autre inconvénient est le coût de l'installation (300 à 500 k€).

Une dernière méthode physique est l'utilisation des UV à une longueur d'onde de 254 nm. Le traitement de l'eau par les UV utilise des lampes de différentes puissances en fonction du volume ou du débit à traiter. Le coût d'un équipement est très faible en comparaison à l'ozonisation et à la filtration. Le prix d'une lampe est de l'ordre de la dizaine de milliers d'euros. Cependant, il y a une perte de l'intensité des UV liée à l'absorption des photons dans la lame d'eau. Le problème des UV est qu'il faut mettre un filtre en amont lorsque l'on a des matières en suspension (MES). Pour un bon traitement UV, il faut moins de 10-15 mg de MES/litre. De plus, il y a un système de brosse au niveau des tubes des lampes UV pour les

nettoyer car il peut y avoir création de biofilms au niveau de la lampe ainsi que des dépôts. Le Quartz de la lampe doit ainsi être nettoyé.

Récemment, pour le traitement de l'eau, plusieurs procédés sont employés en combinant plusieurs types de désinfectants pour la réduction des coûts et des sous-produits de désinfection. L'utilisation des décharges électrohydrauliques (EHD) est un exemple de ce mode d'approche. Les EHD génèrent de la chaleur, un plasma localisé qui émet des UV très intenses, des ondes de choc et des radicaux hydroxyles pendant la photodissociation de l'eau [17].

Emploi des décharges électriques

Les décharges électriques peuvent avoir plusieurs utilisations. Tout d'abord, la génération d'ondes de choc suite à l'application d'EHD peut permettre de détruire des objets solides (pierre, calculs rénaux) ou d'éradiquer des cellules tumorales par la fragmentation de ces dernières [18,19]. La création d'un plasma isothermique est utilisée pour synthétiser des molécules (par exemple, l'hydrogène à partir d'une solution de méthanol/eau) [20] ou des nanoparticules [21]. Enfin, la création d'espèces réactives connaît des applications pour le traitement de surface de différents matériaux. La technologie permet également de dégrader des composés organiques présents dans l'eau et dangereux pour l'environnement (une oxydation des composés par les espèces réactives permet leur élimination [22]). Enfin, l'utilisation de l'ensemble des phénomènes induits par les décharges électriques dans l'eau (plasma, espèces réactives, UV, augmentation de la température et ondes de chocs) permet l'inactivation, l'élimination et la destruction des microorganismes pathogènes [23].

Ainsi, il existe de nombreuses solutions permettant de pallier à l'utilisation des produits chimiques. Il est donc important de bien comprendre l'influence des paramètres machine afin de proposer une solution efficace et sûre pour l'éradication des bactéries tout en limitant le coût de l'équipement et sa consommation énergétique. Un autre élément particulièrement important pour son utilisation est la compréhension des mécanismes qui conduisent à l'effet bactéricide et qui peuvent différer d'un microorganisme à l'autre.

Pour répondre à cette problématique, les travaux menés durant la thèse ont eu plusieurs objectifs :

- (1) *Il a fallu, tout d'abord, choisir le microorganisme de référence qui sera le plus résistant aux technologies développées par ITHPP. Deux types de microorganismes ont été testés : Escherichia coli, bactérie Gram négative et référente dans les laboratoires et les industries, et Bacillus pumilus, bactérie Gram positive et reconnue comme référence pour les procédés de stérilisation par rayonnement. Cette dernière peut se présenter sous deux formes, végétative et sporulée, qui ont une organisation différente.*
- (2) *L'efficacité des technologies a été évaluée sur ces deux formes. Différents paramètres ont été testés en fonction de la technologie étudiée pour trouver les optima de fonctionnement. En fonction de l'application visée la diminution logarithmique recherchée est différente. Elle est de $6 \log_{10}$ pour les faisceaux d'électrons et de $2 \log_{10}$ pour les décharges électriques.*

(3) La compréhension des mécanismes responsables de l'éradication des bactéries a été réalisée en utilisant différents outils. Des techniques de microscopie ont été employées pour observer la paroi des bactéries et leur organisation. L'extraction et l'analyse de l'ADN et des protéines de la bactérie ont permis de trouver une explication à l'efficacité des systèmes.

Chapitre 1. Introduction générale

Ce chapitre présente les différentes bactéries utilisées au cours de cette étude (*Escherichia coli* et *Bacillus pumilus*) ainsi que l'état de l'art sur les deux technologies employées (faisceau d'électrons et décharges électriques). Une description des équipements est également faite afin de comprendre leur fonctionnement global.

1.1. Les bactéries

1.1.1. La forme végétative

Une bactérie est un être unicellulaire dont la taille est comprise entre 1 (*Escherichia coli*) et 10 μm (*Candidatus Magnetobacterium bavaricum*). Contrairement aux eucaryotes, les bactéries (procaryotes) ne disposent pas d'enveloppe nucléaire protégeant l'acide désoxyribonucléique (ADN), porteur de l'information génétique. Ce dernier se trouve directement dans le cytoplasme. Afin de les protéger, les bactéries possèdent une enveloppe qui isole le cytoplasme et empêche la pénétration non-contrôlée de molécules. Cette enveloppe permet également de transférer des nutriments dans la bactérie et d'expulser les déchets contenus dans le cytoplasme.

L'enveloppe bactérienne est constituée d'une paroi et d'une membrane (Figure 1). La paroi est composée de peptidoglycane. C'est elle qui donne la rigidité à la bactérie. Le peptidoglycane est un hétéropolymère formé d'unités répétitives :

- une épine dorsale composée d'une alternance de N-acétyl Glucosamine et d'acide N-Acéthyl Muramique
- de chaînes peptidiques composées à minima de quatre acides aminés
- de ponts interpeptidiques.

La schématisation de ces peptidoglycane est présentée en Figure 2 et permet de comprendre que la rigidité et la forme des bactéries sont assurées par ce composé et sont fonction de l'agencement des éléments. Lorsque le peptidoglycane est endommagé par des enzymes ou des antibiotiques, les cellules sont lysées à cause de la pression de turgescence du cytoplasme.

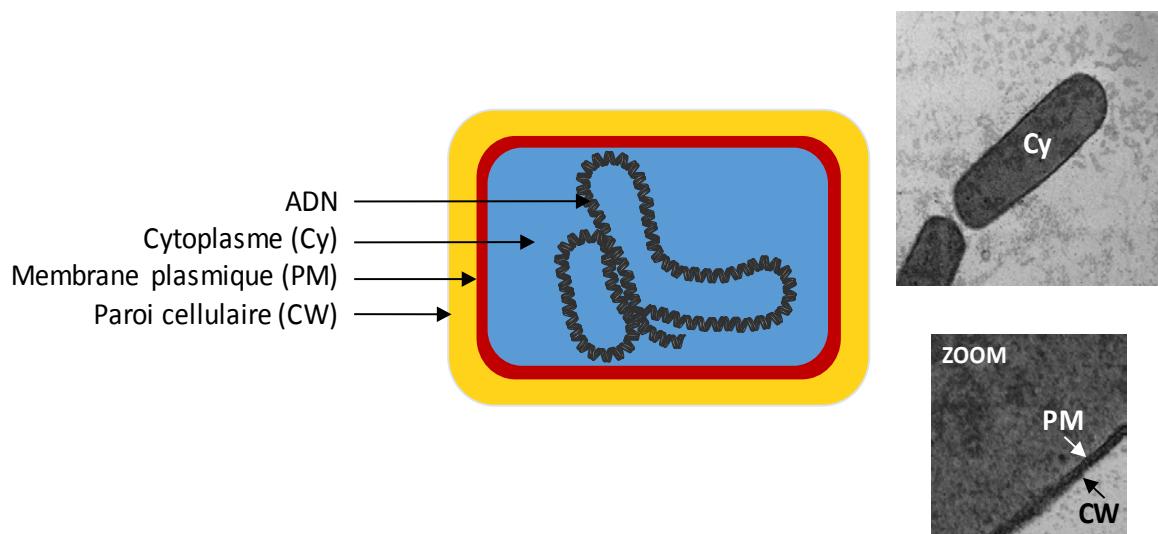


Figure 1 : Représentation simplifiée d'une bactérie vue en coupe avec des images en microscopie électronique à transmission à droite.

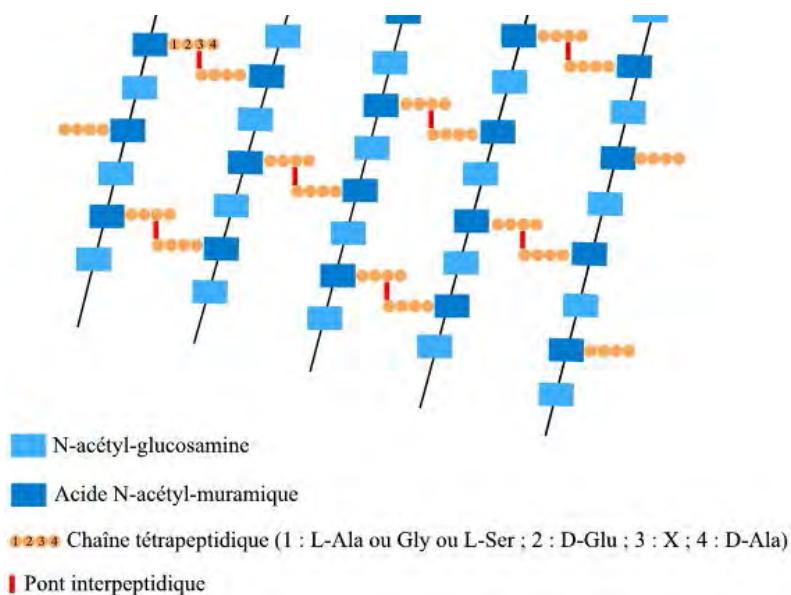


Figure 2 : Schématisation des peptidoglycans constituant la paroi des bactéries, d'après [24].

La membrane cytoplasmique est une structure interne se situant à l'interface entre le cytoplasme et la paroi. Elle est formée d'une double couche lipidique incluant des protéines. Les protéines de la membrane ont différentes fonctions. Elles peuvent notamment jouer un rôle dans la biosynthèse du peptidoglycane ou dans la production d'énergie (ATPase). Elles ont également une fonction respiratoire (avec les pompes à protons ou la phosphorylation oxydative pour les bactéries aérobies) ou d'échanges avec le milieu extérieur. Les protéines confèrent son caractère unique à la cellule.

En 1884, Christian Gram développe une méthode permettant de classifier les bactéries en deux grands groupes en fonction de la composition de leur enveloppe, les bactéries à Gram positif et celles à Gram négatif (Figure 3) [25].

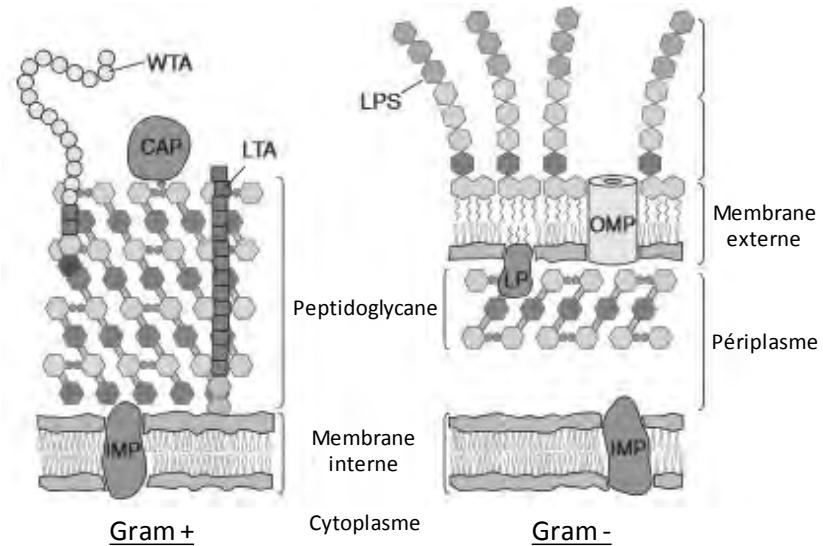


Figure 3 : Agencement des différentes couches de l'enveloppe bactérienne pour les Gram + à gauche et pour les Gram – à droite, d'après [25].

CAP : Protéines attachées de manière covalente (Covalently Attached Protein) ; IMP : Protéines intégrale de membrane (Integral Membrane Protein) ; LP : LipoProtéine ; LPS : LipoPolySaccharide ; LTA : Acide Lipotéichoïque (LipoTeichoic Acid) ; OMP : Protéines de la membrane externe (Outer Membrane Protein) ; WTA : Acide téichoïque de paroi (Wall Teichoic Acid).

Les bactéries à Gram positif

L'enveloppe des bactéries à Gram positif ne possède pas de membrane externe. Afin de pouvoir contenir la pression de turgescence du cytoplasme, une couche épaisse de peptidoglycane, composé d'un nombre important de feuillets superposés, est retrouvée chez ce type de bactéries. L'épaisseur de ce dernier est de 30 - 100 nm. Des polymères anioniques, nommés acides teichoïques, se situent au sein des feuillets de peptidoglycane. Il existe deux types d'acides teichoïques :

- Les acides teichoïques attachés de manière covalente au peptidoglycane (WTA). La plupart des WTAs est composée d'une unité de fixation faite de disaccharides liés à une chaîne de phosphate polyribitol (polyRboP) ou de phosphate polyglycérol (polyGroP) contenant jusqu'à 60 répétitions. Les WTAs se positionnent de manière perpendiculaire aux peptidoglycane et sont dirigés vers l'extérieur de la bactérie.
- Les acides lipoteichoïques ancrés au niveau des têtes des lipides membranaires (LTA). Ce composé est constitué de répétition de phosphate glycérol. En plus d'être liés au peptidoglycane, les LTAs sont liés aux glycolipides intégrés dans la membrane [26–28].

Ces polymères constituent 60% de la masse de l'enveloppe des bactéries Gram positives faisant d'eux les contributeurs majeurs de la fonction et de la structure de l'enveloppe. A la surface des bactéries Gram positives se trouvent des protéines dont certaines sont analogues à celles retrouvées dans le périplasme des Gram négatives.

Les bactéries à Gram négatif

Elles sont composées de deux membranes, une interne et une externe. Entre ces deux membranes, une fine couche de peptidoglycane est retrouvée.

La membrane cytoplasmique comprend de nombreux transporteurs transmembranaires de métabolites, ainsi que des complexes de transport d'électrons. Contrairement aux cellules eucaryotes, les bactéries ne disposent pas d'organelles pour produire de l'énergie, synthétiser les lipides ou sécréter des protéines. Les protéines présentes dans la membrane interne vont permettre à ces synthèses d'être effectuées.

Le périplasme est un compartiment aqueux dont la viscosité est plus importante que celle du cytoplasme. Il est délimité par la membrane interne et la membrane externe. Cette compartimentation permet aux bactéries d'emprisonner des enzymes de dégradation comme les RNases ou les phosphatases alcalines. Le périplasme contient également une fine couche de peptidoglycane, de quelques nanomètres, conférant sa rigidité à la bactérie.

La membrane externe est constituée de glycolipides, principalement des lipopolysaccharides (LPS), qui permettent de créer une barrière hydrophobe. De plus, les protéines constituant la membrane externe peuvent être classées en deux catégories :

- Les lipoprotéines qui sont composées d'une partie lipidique attachée à un résidu cystéine terminal et qui sont présentes dans la partie interne du feuillet de la membrane. Par exemple, la bactérie *Escherichia coli* a, dans sa membrane externe, 100 lipoprotéines dont la fonction, pour la plupart, est inconnue.
- Les tonneaux β qui ont une structure en feuillets β enroulés pour former un tube. Contrairement à la première classe de protéines, les tonneaux β sont transmembranaires. Par conséquent, ils permettent de laisser passer les petites molécules comme les anions phosphates, les mono- ou di-saccharides et les acides aminés à travers la membrane. De plus gros canaux existent (en moins grande quantité) qui permettent de faire circuler les ligands comme les vitamines ou le Fer chelaté. Un exemple de tonneaux β est la porine qui laisse passer des molécules de moins de 1 500 Da (Dalton) [25,29,30].

1.1.2. La forme sporulée

Certaines bactéries Gram positives mettent en place un système de défense lorsqu'elles rencontrent un stress environnemental. Elles forment ainsi une structure dormante nommée spore qui peut leur permettre de survivre plusieurs années [31]. Les principales espèces capables de sporuler appartiennent aux genres *Bacillus* et *Clostridium*.

Comparativement aux bactéries sous forme végétative, la structure et la composition chimique des spores bactériennes diffèrent. Ces différences expliquent la plus grande résistance de ces spores aux stress environnementaux [32]. Le principal stimulus pour la sporulation est le manque de nutriments. Une densité importante de population bactérienne est également un facteur important [33].

Bacillus subtilis est l'espèce la plus étudiée, et donc la mieux comprise, pour ce qui est des mécanismes de sporulation. Pour cette espèce, la complexité avec laquelle l'initiation de la sporulation est régulée reflète en partie le fait que, dans son environnement naturel (sol), cette bactérie est fréquemment confrontée à un manque de nutriments. Par conséquent, un certain nombre de stratégies de survie sont disponibles, comme la motilité et la chimiotaxie. La sporulation semble être la réponse ultime à un environnement hostile, peut-être parce qu'elle est le processus le plus long et le plus énergivore [33].

Etapes de la création de la spore

La sporulation est un exemple simple de différenciation [34]. Le procédé de sporulation peut être divisé en huit étapes (Figure 4). Pour les Bacilles, genre étudié dans cette thèse, il comprend :

- 1) La croissance des bactéries sous forme végétative qui peut être assimilée au stade 0 au regard de la sporulation.
- 2) S'en suit, l'étape I et II où les cellules végétatives procèdent à une division asymétrique pour former deux compartiments séparés par un septum. Le plus petit est nommé préspore [32]. La plus grande cellule, ou la cellule mère, contribue au processus de différenciation [35]. L'étape I est la présentation de l'ADN de la cellule comme un filament axial. Une copie du génome est répartie entre chaque cellule.
- 3) Pendant l'étape III, la cellule mère initie la migration membranaire et un processus de fusion, assimilable à de la phagocytose, englobe la préspore, l'isolant grâce à une double membrane dérivée du septum. Dans le processus, la préspore est aussi isolée du milieu extérieur [33,36].
- 4) Durant l'étape IV, le cortex est formé, composé de peptidoglycans, entre la membrane interne et externe de la préspore.
- 5) La formation du manteau de la spore s'en suit (étape V).

Durant les étapes IV et V, la cellule mère synthétise une quantité importante de molécules spécifiques à la spore, comme l'acide pyridine-2,6-dicarboxylique (DPA). Cette dernière s'accumule dans la préspore et s'accompagne d'une déshydratation et d'une minéralisation de la préspore [32]. La quantité d'eau présente dans le cœur est tellement faible que même les protéines habituellement mobiles sont immobiles [37].

- 6) La maturation de la spore prend place à l'étape VI, où la densité du manteau augmente. Le plus petit des deux compartiments, la préspore, développe une spore mature capable de protéger le génome [33].
- 7) La dernière étape (VII) est la lyse de la cellule mère et le relargage de la spore mature. Cette dernière protège le microorganisme dormant des attaques externes jusqu'à ce que les conditions redéviennent favorables [32]. Quand la spore se retrouve dans l'environnement, elle peut soit persister soit germer pour rentrer dans le cycle végétatif [33].

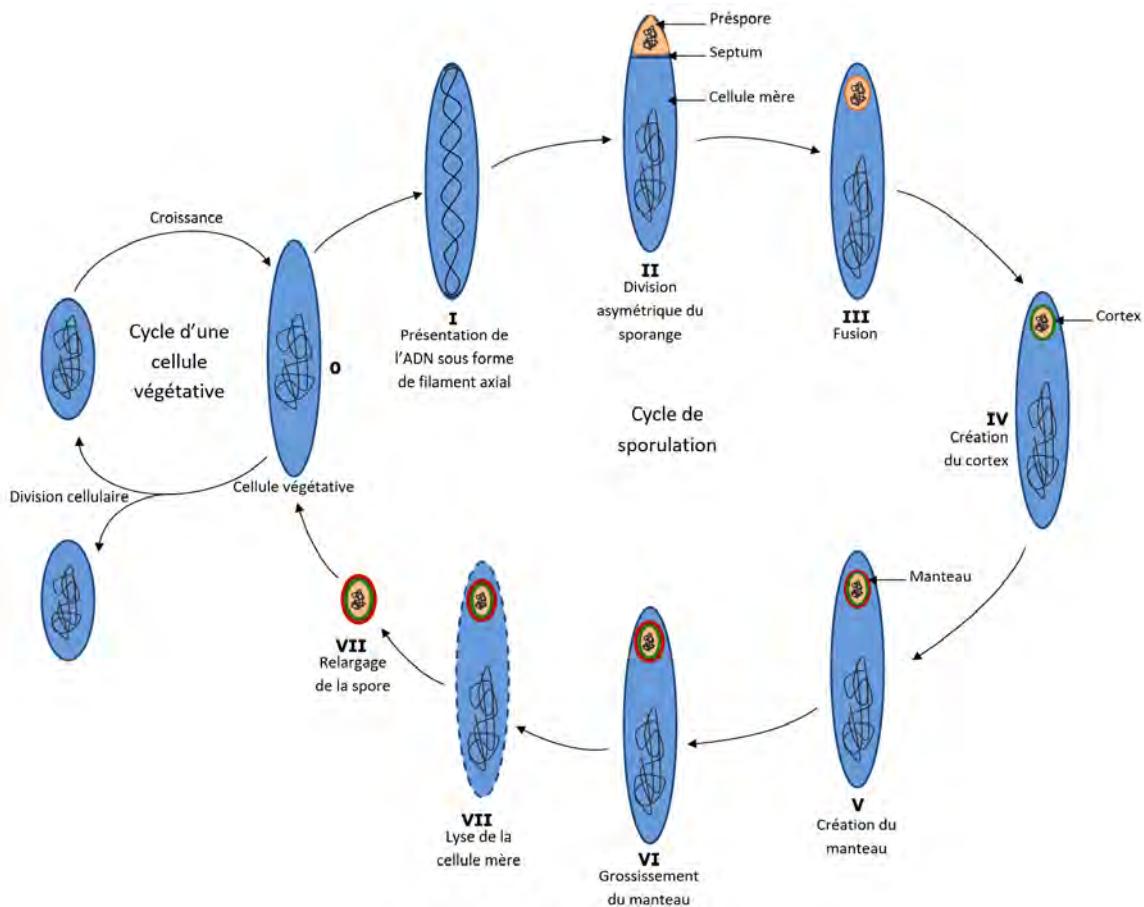


Figure 4 : Schématisation des différentes étapes de création de la spore (inspiré des publications [32,33,37]).

Lors d'une division cellulaire classique, le septum se positionne au centre de la cellule. Lors du mécanisme de sporulation, le septum est repositionné. C'est l'augmentation de la concentration de FtsZ, protéine qui forme un anneau à l'endroit de la future division chez les cellules non-sporulée (Z-ring), combinée à la synthèse de la protéine SpolIE qui permet ce repositionnement. Deux Z-ring sont ainsi créés mais un prendra le dessus sur l'autre pour former le futur septum (Figure 5) [33].

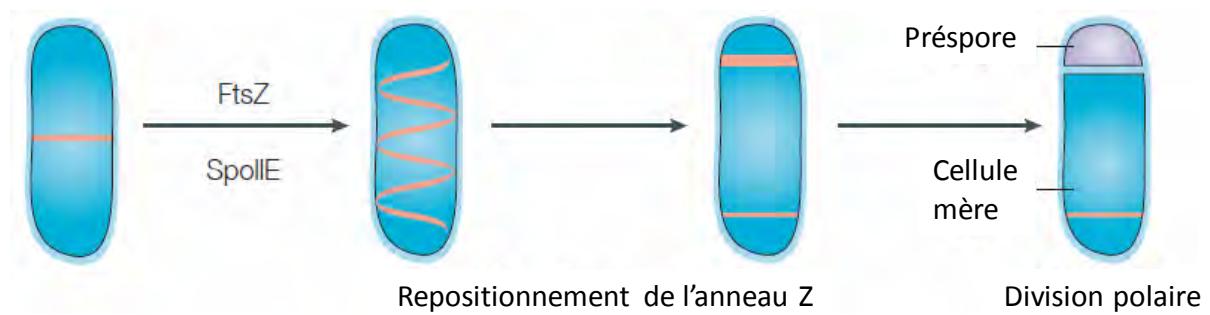


Figure 5 : Etapes de création du septum, d'après [33].

Le génome, quant à lui, se positionne sous la forme d'un filament axial grâce à la fixation d'une protéine, Spo0J, sur une région du génome, OriC. Ce complexe va ensuite venir se fixer sur une protéine d'ancrage située au niveau des pôles de la cellule, DivIVA grâce à la fixation de RacA sur le génome à proximité de OriC. La formation du septum se produit et emprisonne un tiers du chromosome dans le compartiment de la préspore. La partie restante du chromosome (la plus éloignée d'OriC) est transférée à travers le septum grâce à l'action d'une protéine (DNA transporter), SpolIIIE (Figure 6) [33].

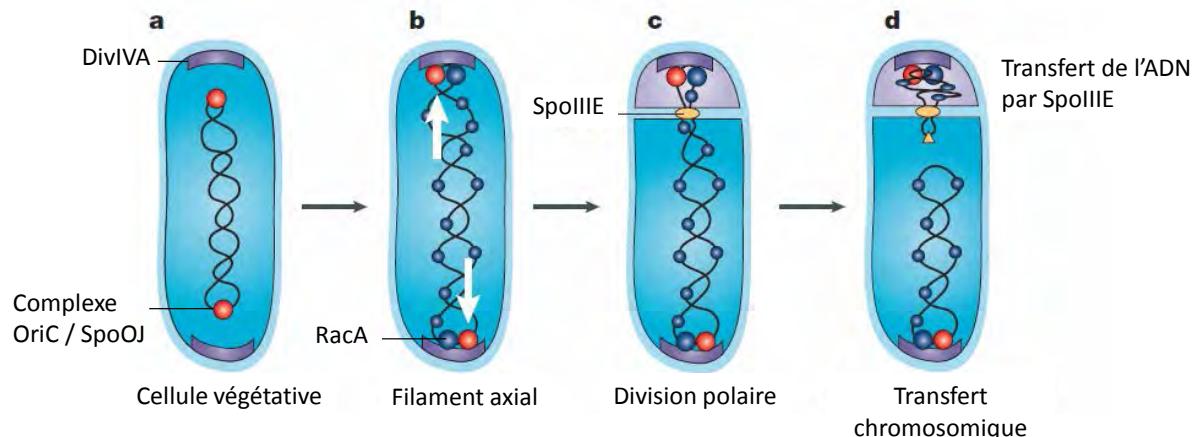


Figure 6 : Création de la préspore, d'après [33].

Le matériel constituant la membrane du septum est dégradé au moment de l'engloutissement, étape III de la sporulation, en commençant par la partie centrale où la fermeture du septum s'est effectuée. Les extrémités du septum migrent autour du cytosol de la préspore. Les membranes se rencontrent au niveau du sommet de la cellule où elles fusionnent, relâchant la préspore complètement refermée dans le cytoplasme de la cellule mère. La préspore est séparée de la cellule mère par deux membranes. L'achèvement de l'engloutissement gouverne les étapes suivantes de la formation de la spore [33].

Chez *Bacillus subtilis*, l'expression des gènes est gouvernée par cinq facteurs de transcription qui guident le procédé de formation de la spore dans la cellule mère. Une communication entre la cellule mère et la préspore se met en place pour réguler l'expression de ces gènes. Dans la cellule mère, il y a deux facteurs sigma qui interagissent avec une RNA polymérase, σ^E et σ^K , trois protéines de liaison à l'ADN, GerE, GerR et SpolIID. Ces facteurs de transcription agissent en cascade où σ^E est le premier facteur opérant dans la régulation de l'expression des gènes dans la cellule mère.

Le facteur σ^E est dérivé d'une pro-protéine inactive, pro- σ^E , dont la synthèse commence avant la division asymétrique. La conversion de pro- σ^E en protéine active se fait directement après la division asymétrique et est déclenchée par une protéine 'signal' produite dans la préspore et dirigé par σ^F , un facteur de transcription spécifique de la préspore [37]. Immédiatement après l'activation du facteur σ^F dans le compartiment de la préspore, σ^E est activé dans la cellule mère [33]. Le facteur σ^E conduit à la transcription de plusieurs centaines de gènes dont SpolIID et GerR. Ces protéines de liaison à l'ADN bloquent la transcription des gènes activés par σ^E . SpolIID peut également agir en conjonction avec σ^E pour activer d'autres transcriptions

de gènes incluant ceux impliqués dans la production d'une pro-protéine, pro- σ^K . Comme pour la pro- σ^E , la maturation de cette pro-protéine en σ^K est gouvernée par un signal de transduction intercellulaire comportant une protéine 'signal' sécrétée par la préspore sous le contrôle d'un facteur de transcription spécifique σ^G . Le facteur σ^K active un autre ensemble de gènes dont GerE, une protéine de liaison à l'ADN qui est responsable de l'activation d'une autre classe de gènes dans la cellule mère pour finir la création de la spore [38].

Le procédé complet de création de la spore prend entre 7 et 8 heures et les étapes suivant la séparation asymétrique de la cellule environ 5 heures [37].

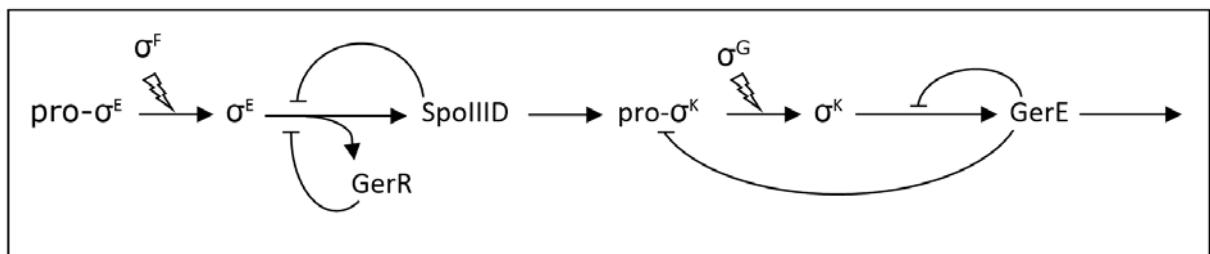


Figure 7 : Réaction en cascade des facteurs de transcription, d'après [38].

Composition de la spore

La spore est composée de différents éléments présentés en Figure 8.

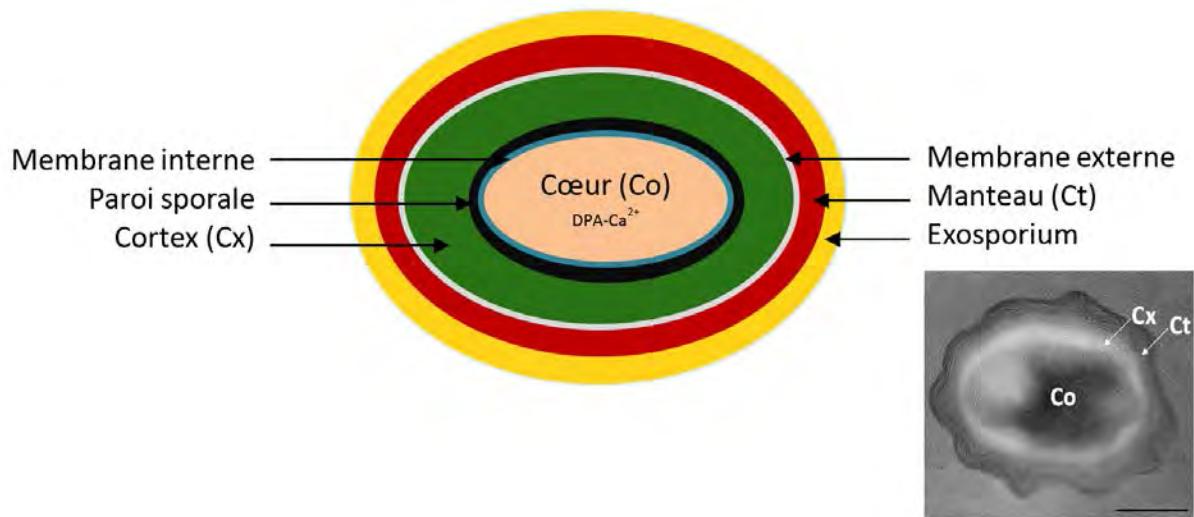


Figure 8 : Représentation schématique d'une spore vue en coupe (l'échelle des différentes structures n'est pas respectée) avec une image type en microscopie électronique à transmission (MET) à droite (schéma inspiré de [37,39], photo de [40]).
Echelle : 200 nm.

Ces différents éléments présentés de l'intérieur vers l'extérieur sont :

- Au centre de la spore, le cœur contient l'ADN, l'ARN, les ribosomes et la plupart des enzymes de la spore. Le cœur de la spore a un pH d'environ 1 unité de pH plus faible que la cellule végétative qui a un pH compris entre 7 et 7,2 [37]. De plus, le cœur est relativement déshydraté. En effet, l'eau représente, en fonction des espèces, 27-55% du poids du cœur de la spore contre plus de 80% pour les cellules végétatives. Le génome se trouve dans le cœur dans lequel la plupart de l'eau est remplacée par du DPA [41]. Cette molécule est seulement synthétisée dans le compartiment de la cellule mère de la cellule sporulante et confère sa résistance à la spore. Elle représente 5-20% du poids sec des spores de *Bacillus* ou *Clostridium* et se situe uniquement dans le cœur où elle est le plus souvent liée à des cations divalents, notamment Ca^{2+} [37,42]. L'accumulation d'une grande quantité de DPA est responsable en partie de la réduction de la quantité d'eau présente dans le cœur pendant la sporulation [43]. Les petites protéines acido-solubles (SASPs) de type α/β sont synthétisées seulement pendant le développement de la spore, après la troisième heure de sporulation [44]. Ces protéines sont extrêmement abondantes, elles représentent 3-6% des protéines totales de la spore et 5-10% des protéines totales contenues dans le cœur de la spore. Les SASPs de type α/β se trouvent exclusivement dans le cœur de la spore où elles saturent l'ADN. La liaison de ces protéines modifie la structure de l'ADN et ses propriétés [37,45]. Les SASPs de type α/β sont dégradées tôt pendant la germination par une endoprotéase nommée GPR, offrant une source indispensable d'acides aminés pour le développement de la spore [44,46] et si ce n'est pas le cas, leur présence interfère avec le développement et bloque la transcription de l'ADN [47].
- La membrane interne de la spore est composée de lipides et de protéines. La surface de la membrane interne de la spore est le lieu d'assemblage d'une fine couche de peptidoglycane appelée paroi sporale. La membrane interne est extrêmement imperméable même aux petites molécules comme l'eau et c'est cette propriété qui protège le cœur de la spore des dommages dus à des produits chimiques pouvant atteindre l'ADN [48].
- Le cortex est composé de peptidoglycane qui, malgré leur similitude avec les peptidoglycane des cellules végétatives, ont une structure spécifique aux spores. On remarque notamment l'absence totale d'acide teichoïque provenant des résidus d'acides *N*-acetylmuramic [48]. Le cortex est essentiel pour la réalisation et le maintien d'une spore déshydratée, pour la minéralisation de la spore et pour la dormance [49].
- La membrane externe, dont la composition exacte demeure mal connue, est une membrane fonctionnelle lors de la création de la présore. Mais, une fois la spore formée, elle peut ne pas garder son intégrité. Son rôle n'est donc pas de maintenir une imperméabilité de la spore ni d'augmenter sa résistance aux stress environnementaux [41]. Cependant, elle contient du matériel qui permet la liaison entre le manteau et le cortex.
- Le manteau est une structure complexe composé de plusieurs couches dont la plupart est spécifique de la spore. Certaines sont impliquées dans l'assemblage du manteau et de l'exosporium [50]. Sa composition est très variable entre les espèces mais également en fonction des souches au sein d'une même espèce. La proportion des protéines présentes dans le manteau représente 40-80% des protéines totales de la spore [51] mais il contient également des carbohydrates (6%) [32]. Le manteau de l'endospore est fait de couches successives qui protègent le génome de la bactérie lors

de conditions de stress. Le modèle pour l'architecture d'une spore est donné par *Bacillus subtilis* qui est constitué d'au moins 70 protéines différentes réparties en trois couches [33].

Les spores qui ont été isolées à un temps intermédiaire et qui n'avaient donc pas leur manteau totalement synthétisé sont instables et germent spontanément. Ainsi, le manteau a un rôle de suppression de la germination spontanée et non-souhaitée [52]. Le manteau est indispensable pour conférer une résistance à la spore lors d'un stress environnant [33].

- L'exosporium est la partie la plus à l'extérieur de la spore. La présence d'un exosporium est loin d'être universelle et sa structure peut être soit absente soit diminuée chez certaines espèces [53]. L'exosporium est constitué d'une couche basale de paracrystalline et, chez certaines espèces, de pili ressemblants à des filaments [54]. D'après des études menées sur *Bacillus cereus*, l'exosporium est composé principalement de protéines (43-52% du poids sec), mais contient également des lipides (15-18% du poids sec) et des carbohydrates (20-22% du poids sec). En très faible quantité (autour de 4%), des composés comme le calcium et le magnésium sont présents. Certains composés ne sont pas identifiés [55]. Chez *Bacillus pumilus*, l'exosporium est proche de la sous-couche externe du manteau et est formé par un matériel dense qui semble légèrement poreux et avoir des pili de courte projection [56].

Phénomène de résistance et de réparation de l'ADN

Comme les spores doivent survivre une longue période sans nutriment, elles sont métaboliquement dormantes, ne contenant pas ou peu de composés apportant de l'énergie comme l'ATP (Adénosine TriPhosphate) ou le NADH (Nicotiamide Adénine Dinucléotide) [57]. Les spores dormantes ne peuvent pas réparer les dommages faits à l'ADN ou aux protéines. Le mécanisme de réparation de l'ADN se déroule quand la spore germe et se développe et que l'activité métabolique reprend [39]. Si les dommages accumulés pendant la dormance de la spore sont trop importants, les mécanismes de réparation ne seront pas suffisants et cela conduira à la mort de la bactérie. Il arrive que les bactéries restent des années sous forme sporulée, par conséquent, pour leur survie, il faut qu'elles acquièrent une multitude de mécanismes qui les protège des dommages pendant une période de dormance potentiellement longue. Ces mécanismes qui évoluent probablement pour protéger la spore contre des stress modérés, permettent également de protéger la spore des dommages créés par un traitement agressif [41], comme les produits chimiques ou les radiations.

Il y a deux moyens pour minimiser l'effet des dommages à l'ADN pour la spore :

- 1) Prévenir les dommages à l'ADN dans un premier temps
- 2) Réparer rapidement les dommages à l'ADN lors du développement [46]

Le premier moyen est le plus favorable pour la spore car la réparation de l'ADN peut induire des mutations et, dans le cas d'une spore, la bactérie doit attendre la fin de la germination pour activer ce mécanisme [37].

Les dommages à l'ADN peuvent être réparés de trois façons. La première, à l'aide d'une lyase, *Spl*, qui dégrade les photoproducts. Cette enzyme est produite seulement pendant le développement de la spore. Les deux autres sont des réparations par recombinaison et excision et sont dépendantes de *RecA* mais peuvent également dépendre de quelques protéines de réparations spécifiques à la spore [41].

Il a été démontré *in vitro* que les SASPs de type α/β protègent l'ADN d'attaques chimiques au peroxyde d'hydrogène, très probablement en protégeant directement les brins de l'ADN et plus particulièrement le squelette, de l'attaque des radicaux d'hydroxyle. Ceci est soutenu par une résistance additionnelle aux DNases et à beaucoup d'enzymes de restriction. Cependant, les SASPs de type α/β jouent un faible rôle lors d'attaques ionisantes mais sont impliquées dans la protection contre les UV [57].

La faible teneur en eau dans le cœur est un facteur prédominant qui contribue à la fois à la dormance enzymatique de la spore et à la résistance à la chaleur et aux composés chimiques. Les conditions à l'intérieur du cœur sont étroitement liées aux propriétés de résistance de la spore, dont beaucoup se trouvent, dans une certaine mesure, dans la protection de l'ADN contre les dommages de la spore [32]. Cependant, les UV et les rayonnements gamma tuent les bactéries en causant des dommages à l'ADN. Les spores sont beaucoup plus résistantes aux irradiations gamma que les cellules végétatives. Les raisons de cette plus grande résistance ne sont pas claires mais il est possible que l'un des facteurs soit la faible présence d'eau dans le cœur qui limite la production de radicaux hydroxyles [41,57].

Ensuite, le DPA est important pour la résistance des spores. Il n'y a pas d'informations quant au rôle possible du DPA dans la résistance aux rayonnements gamma des spores. Cependant, le DPA participe à la résistance des spores aux UV [58].

Les agents oxydants comme le peroxyde d'hydrogène sont connus pour créer des mutations chez les cellules végétatives. Chez les spores, le mécanisme d'élimination de ces microorganismes est différent. En effet, il semblerait que les agents oxydants causent des dommages au niveau des différentes couches constituant la spore, et principalement au niveau de la membrane interne. La membrane interne joue un rôle majeur en limitant les échanges entre le milieu extérieur et le cœur ce qui lui confère un rôle essentiel dans la résistance des spores à de nombreux composés chimiques [59,60]. L'incroyable imperméabilité de la membrane interne est due à l'état des lipides la constituant. Dans la publication de Cowan *et al.*, il a été montré que les lipides sont en grande partie immobiles chez les spores de *Bacillus subtilis* avec un coefficient de diffusion D de $1,1 \pm 0,98 \times 10^{-9} \text{ cm}^2/\text{s}$ et une fraction de mobilité R de $0,31 \pm 0,16$. Au moment de la germination, la membrane gagne en mobilité avec un D de $1,85 \pm 1,24 \times 10^{-9} \text{ cm}^2/\text{s}$ et un R de $0,75 \pm 0,07$ [61]. Un des facteurs qui peut contribuer à l'immobilité des lipides est la déshydratation de la cellule au moment de la sporulation qui conduit à une diminution du volume du cœur qui peut être accompagné d'un changement au niveau de la membrane conduisant à une proportion importante de lipide en phase gel. Ainsi ce n'est pas la nature des lipides de la membrane interne qui lui confère son imperméabilité mais leur état d'organisation.

La membrane externe ne permet pas d'augmenter la résistance aux irradiations, à la chaleur ou aux composés chimiques.

Les couches de la spore (manteau et exosporium) contribuent à une résistance élevée de la spore à des stress chimiques et physiques. Même si la spore est métaboliquement inactive, les spores interagissent activement avec leur environnement. Ces interactions semblent être modulées principalement par le manteau et l'exosporium. Les couches de la spore sont flexibles, extensibles ou rétractables en réponse à l'environnement comme l'humidité (Figure 9) [62].

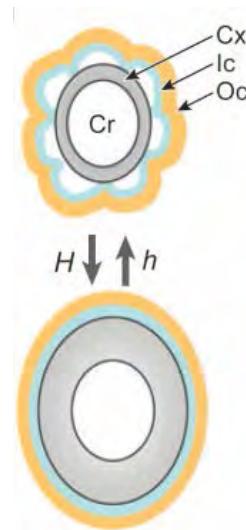


Figure 9 : Représentation de l'évolution de la taille d'une spore en fonction de l'humidité relative. Le h correspond à une humidité relative faible et le H à une humidité relative élevée. Cr est le cœur de la spore, Cx , le cortex, Ic et Oc l'intérieur et l'extérieur du manteau, respectivement [35].

A la fois le manteau et l'exosporium contiennent différentes enzymes qui permettent la protection de la spore, modulent la germination et sont susceptibles d'affecter l'environnement. Les variations de structure et de composition des couches entre les espèces et au sein d'une même espèce existent et peuvent refléter les conditions environnementales de formation des spores et les conditions actuelles dans lesquelles se trouvent les spores [58,63–65].

Le manteau protège aussi le cortex qui est susceptible d'être attaqué par des enzymes destructrices de peptidoglycans comme les lysozymes et dont l'hydrolyse conduit à la mort des spores ou à la germination. Le manteau permet également de contrôler la germination [35]. Le manteau de la spore est d'une importance capitale pour la résistance à de nombreux composés chimiques. Il permet de protéger la spore contre les attaques par des agents oxydants (O_3 , H_2O_2 , ClO_2 , ...) [63]. Pour l'ozone, il semblerait que l'élimination des spores soit due à des dommages au niveau des couches externes de la spore, principalement au niveau du manteau [59]. Les enzymes constituant le manteau ont un rôle potentiel de protection contre certaines molécules toxiques spécifiques [35]. La forte présence de réticulation (comme les ponts disulfures) au sein du manteau confère probablement à la spore sa

résistance mécanique et chimique [66]. Le manteau est la première barrière aux molécules et sa principale fonction est la protection de la spore et, indirectement, la préservation du génome de la spore.

Quant à l'exosporium, il peut induire une résistance aux composés chimiques et aux traitements enzymatiques. Il dispose d'une surface hydrophobe lui permettant d'avoir des propriétés adhérentes [67,68].

Pour résumer, la plupart des facteurs impliqués dans la résistance des spores à la chaleur, aux radiations et aux composés chimiques sont :

- 1) la faible concentration en eau dans le cœur, cruciale dans la protection contre la chaleur humide et probablement les irradiations gamma et qui joue un rôle important dans la photochimie de l'ADN et donc contre les UV
- 2) la saturation de l'ADN des spores par les SASPs de type α/β qui protège la spore de la chaleur sèche ou humide et de quelques composés chimiques génotoxiques
- 3) la réparation de l'ADN qui est importante dans la résistance aux dommages créés sur l'ADN par les traitements tels que les radiations, la chaleur sèche et les composés chimiques génotoxiques
- 4) la minéralisation du cœur qui protège contre la chaleur humide
- 5) le DPA contenu dans le cœur qui influence l'hydratation du cœur et la quantité de minéraux et donc la résistance à la chaleur humide et aux UV
- 6) la membrane interne, dont la faible perméabilité retarde l'arrivée de composés chimiques dans le cœur
- 7) le manteau qui crée une barrière contre les enzymes lyases, les composés chimiques toxiques et peut-être les radiations UV
- 8) la stabilité intrinsèque des protéines de la souche qui contribue à la résistance à la chaleur humide [41].

Pour conclure, la résistance des spores est clairement due à une accumulation d'effets de structure et de caractéristiques chimiques et biochimiques [32].

Germination

Pour que l'état de dormance reste une stratégie viable, il faut que la spore soit capable de germer rapidement dès que des nutriments sont de nouveau disponibles dans l'environnement. La germination des spores bactériennes dans l'environnement est généralement déclenchée par des molécules de faible poids moléculaire qui sont spécifiques des espèces et des souches. Ces molécules viennent se fixer sur les récepteurs de la germination (GRs). Elles peuvent être des acides aminés, des dérivés de purine et des sucres. Le mécanisme de germination inclut le relargage de cations monovalents comme H^+ , Na^+ et K^+ . Il est à noter que d'autres molécules non nutritives peuvent conduire à la germination de la spore, comme le complexe DPA- Ca^{2+} [48].

Les GRs sont localisés dans la membrane interne des spores et sont présents en très faible quantité. Par conséquent, les activateurs de la germination doivent traverser la paroi du manteau et du cortex pour se fixer sur leur récepteur, le manteau doit être à la fois protecteur et perméable aux molécules. Il peut être imaginé comme un filtre à molécules qui ne laisse passer que les petites molécules qui permettent la germination et qui exclut les grosses molécules comme les lysozymes [48].

La transition entre la spore dormante et la cellule végétative se déroule en trois étapes : l'activation, la germination et le développement. L'activation est un procédé réversible, elle ne conduit pas forcément à la germination de la spore et à la croissance du microorganisme. L'activation conserve la plupart des propriétés de la spore dormante [69]. *A contrario*, si le procédé de germination débute, la spore ne pourra pas retourner à son état dormant.

Les différentes étapes de la germination peuvent être résumées en cinq étapes :

- 1) Le relargage de cations monovalent et Zn^{2+} provenant du cœur. Le relargage de H^+ élève le pH du cœur à 6,5-7,7, un changement essentiel pour le métabolisme de la spore une fois que le cœur aura retrouvé le niveau d'hydratation pour l'activation des enzymes.
- 2) Le relargage du DPA associé au relargage de cations divalent, majoritairement Ca^{2+} [37]. Il est ainsi possible que le relargage de ce complexe par une spore stimule la germination des spores alentours [39].
- 3) Le remplacement du DPA par de l'eau (à ce niveau le taux d'hydratation n'est pas suffisant pour activer les enzymes)
- 4) L'hydrolyse des peptidoglycans constituant le cortex
- 5) Le gonflement du cœur dû à une absorption plus importante d'eau et l'expansion de la paroi sporale.

A l'issue de cette dernière étape, les enzymes deviennent actives ce qui permet au métabolisme de la spore de se mettre en place, suivie par la synthèse de macromolécules qui convertissent la spore germinante en cellule en croissance : c'est le développement [37]. Il inclut l'émergence et la croissance de la nouvelle cellule et il représente le passage de la spore à la cellule végétative [70].

La paroi sporale devient la membrane cellulaire quand la spore passe en phase de germination et de développement [32].

Le manteau et l'exosporium ont également le potentiel d'affecter enzymatiquement la germination. Une propriété intrinsèque de la surface de la spore est sa possibilité de convertir la *L*-alanine en *D*-alanine en utilisant une alanine racémase. La *L*-alanine étant un germinatif potentiel, la conversion de la *L*-alanine en *D*-alanine par le manteau peut supprimer la germination. Le manteau influence la germination en séquestrant les enzymes requises pour la dégradation des peptidoglycans du cortex [71].

Après l'initiation de la germination, le manteau doit être ouvert pour permettre le développement de la cellule végétative dans l'environnement.

1.1.3. *Escherichia coli*

Découverte en 1885 par Théodore Escherich, *Escherichia coli* est la bactérie référente dans les laboratoires. C'est une bactérie Gram-négative qui ne peut pas sporuler. Elle se présente sous la forme de bâtonnets et a des fimbriae adhésifs (Figure 10). *E. coli* est la bactérie anaérobie facultative la plus abondante dans l'intestin des humains et des animaux à sang chaud. Elle est responsable de différentes maladies comme la diarrhée, la dysenterie ou le syndrome hémolytique et urémique. La température optimale de croissance est de 37°C [72].

Une souche tient une place toute particulière dans les laboratoires expérimentaux de biologie moléculaire et de microbiologie. Il s'agit d'*Escherichia coli* K-12 (ATCC 29425). Cette souche a été isolée en 1922 [72] et est une souche non pathogène, plus radio-résistante qu'*E. coli* O157: H7 [73]. *Escherichia coli* K-12 (ATCC 29425) sera utilisée pour nos essais.

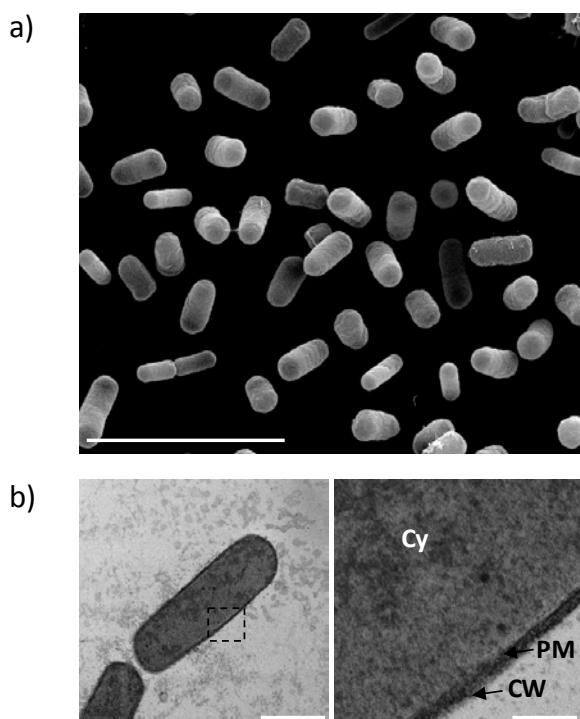


Figure 10 : *Escherichia coli* observée en microscopie électronique a) à balayage et b) en transmission avec le cytoplasme (Cy), la membrane plasmique (PM) et la paroi (CW), l'échelle est de 5 µm (a), 500 nm (b, image de gauche) et 100 nm (b, image de droite).

1.1.4. *Bacillus pumilus*

Bacillus pumilus est une bactérie Gram-positive et aérobie. Elle se présente sous forme de bâtonnets (Figure 11). Une autre propriété de *Bacillus pumilus* est sa capacité à sporuler. Cette capacité à se différencier en une endospore lui permet d'être très résistante à des stress environnementaux comme la désinfection par produits chimiques, par le peroxyde d'hydrogène ou d'autres conditions drastiques. Elle est retrouvée dans le sol, l'eau ou pour

certaines dans les racines de certaines plantes où *Bacillus pumilus* a un rôle antifongique et antibactérien.

Les spores de *Bacillus pumilus* sont parmi les plus résistantes des nombreuses souches de spores aérobies et anaérobies étudiées. Elle est maintenant acceptée comme indicateur biologique pour les procédés de stérilisation par rayonnement [74,75]. Dans le cadre de notre étude, il a été décidé de travailler sur la souche *Bacillus pumilus* E601 (ATCC 27142).

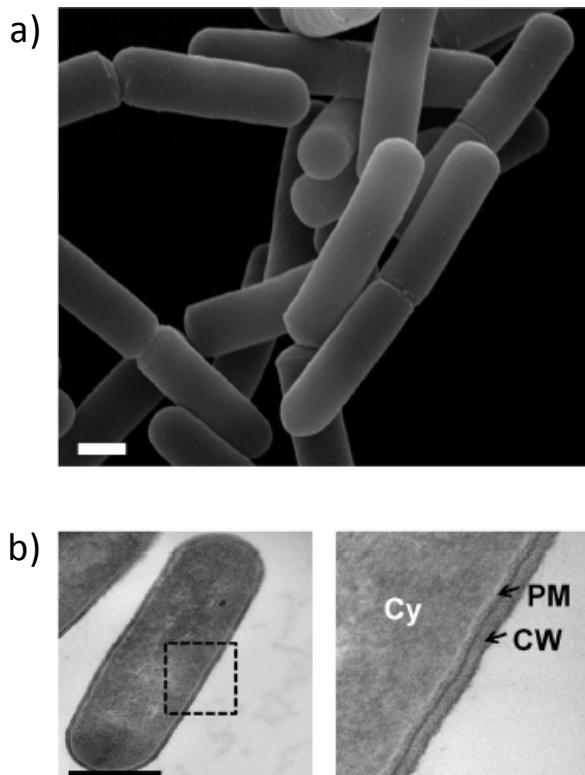


Figure 11 : *Bacillus pumilus* observé en microscopie électronique a) à balayage et b) en transmission avec le cytoplasme (Cy), la membrane plasmique (PM) et la paroi (CW), l'échelle est de 500 nm [40].

En résumé, il existe une grande diversité de bactéries classées en deux grands groupes : Gram négatif et Gram positif. La composition de leur enveloppe est différente et donc leur résistance aux stress également. Il est donc important, dans le choix du modèle, de tester une bactérie de chaque groupe. Le choix d'*Escherichia coli* s'est fait assez simplement de par sa notoriété au sein des laboratoires. Pour la bactérie Gram positive, *Bacillus pumilus*, c'est sa capacité à sporuler et le fait qu'elle soit considérée comme référence pour la stérilisation par rayonnement qui a orienté le choix de travailler avec cette souche.

1.2. Le faisceau d'électrons pulsés

1.2.1. Introduction

Les faisceaux d'électrons pulsés font partie de la catégorie des rayonnements, et plus particulièrement des rayonnements ionisants.

Définition des rayonnements ionisants

Globalement, un rayonnement désigne un processus d'émission ou de transmission d'énergie sous forme d'ondes électromagnétiques ou de particules.

Un rayonnement est ionisant lorsqu'il va modifier les atomes ou les molécules en leur arrachant ou ajoutant des électrons. Ces molécules vont alors être chargées positivement ou négativement [76,77]. Son interaction avec la matière est due à la transmission de tout, ou partie, de son énergie à cette dernière qui subit alors des modifications.

Il existe différents types de rayonnements ionisants :

- Les particules, aussi appelées rayonnements directement ionisants. Elles possèdent une masse au repos. On retrouve les rayonnements de particules chargées légères : globalement désignés par le terme de rayonnement de type bêta (β). Il s'agit des négatons (ou électrons) et des positons constituant respectivement les rayonnements β^- et β^+ . Dans le cadre de cette étude, nous utiliserons les rayonnements β^- [78].
- Les rayonnements électromagnétiques de longueurs d'ondes inférieures à 100 nm, aussi appelés rayonnements indirectement ionisants. Ils sont composés d'un flux de photons. Ces photons n'ont pas de masse. On retrouve :
 - o les rayons gamma (γ) qui correspondent à la désexcitation du noyau de l'atome qui libère de l'énergie. Dans le cadre des applications de stérilisation, c'est l'atome de Cobalt, ^{60}Co (^{59}Co , à l'état de repos). Deux photons γ sont émis avec une énergie de 1,17 MeV et 1,33 MeV.
 - o les rayons X sont issus d'interaction d'électrons avec la matière. Plus le numéro atomique (Z) de la matière est important, plus le rayonnement X qui en résulte sera intense.

La Figure 12 présente un classement de ces rayonnements ionisants.

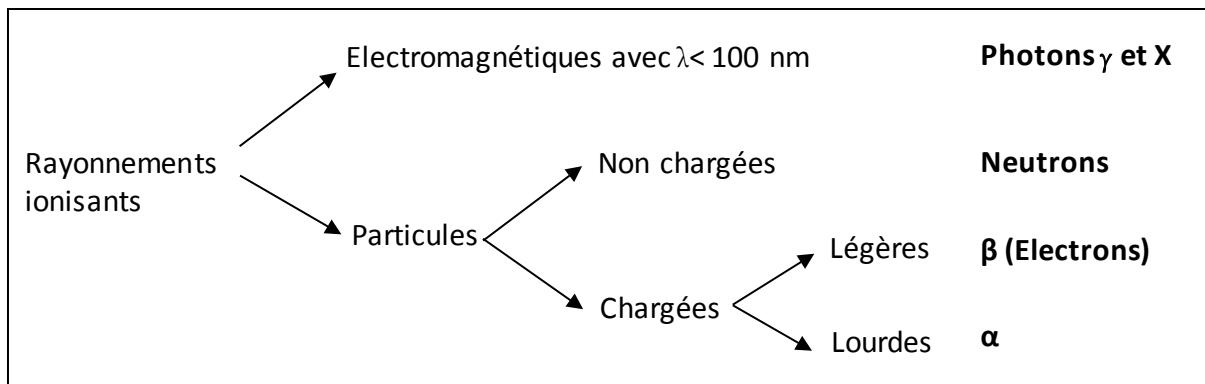


Figure 12 : Classement des rayonnements ionisants.

Par la suite, nous nous intéresserons au comportement des rayonnements β , objet de l'étude.

Interactions des particules chargées avec la matière

Les particules chargées possèdent une masse et, de ce fait, leurs interactions avec la matière qu'elles pénètrent sont très probables.

Lorsque des particules β^- en mouvement pénètrent un matériau, une partie de leur énergie cinétique est perdue en interagissant avec les atomes du milieu traversé. Deux possibilités peuvent alors se présenter :

- une interaction entre les électrons incidents et les électrons du milieu, appelée collision. Il en existe deux types : l'ionisation et l'excitation. Ce sont les plus probables. C'est la quantité d'énergie cinétique transférée à la matière par l'électron incident qui va favoriser un phénomène par rapport à l'autre.
- une interaction entre électrons incidents et un noyau du milieu : il y a alors freinage [78,79].

Le phénomène d'ionisation

Il a lieu dans le cas où l'électron incident transfère une énergie supérieure à l'énergie de liaison de l'électron de la matière. Dans ce cas, ce dernier est éjecté, comme illustré en Figure 13.

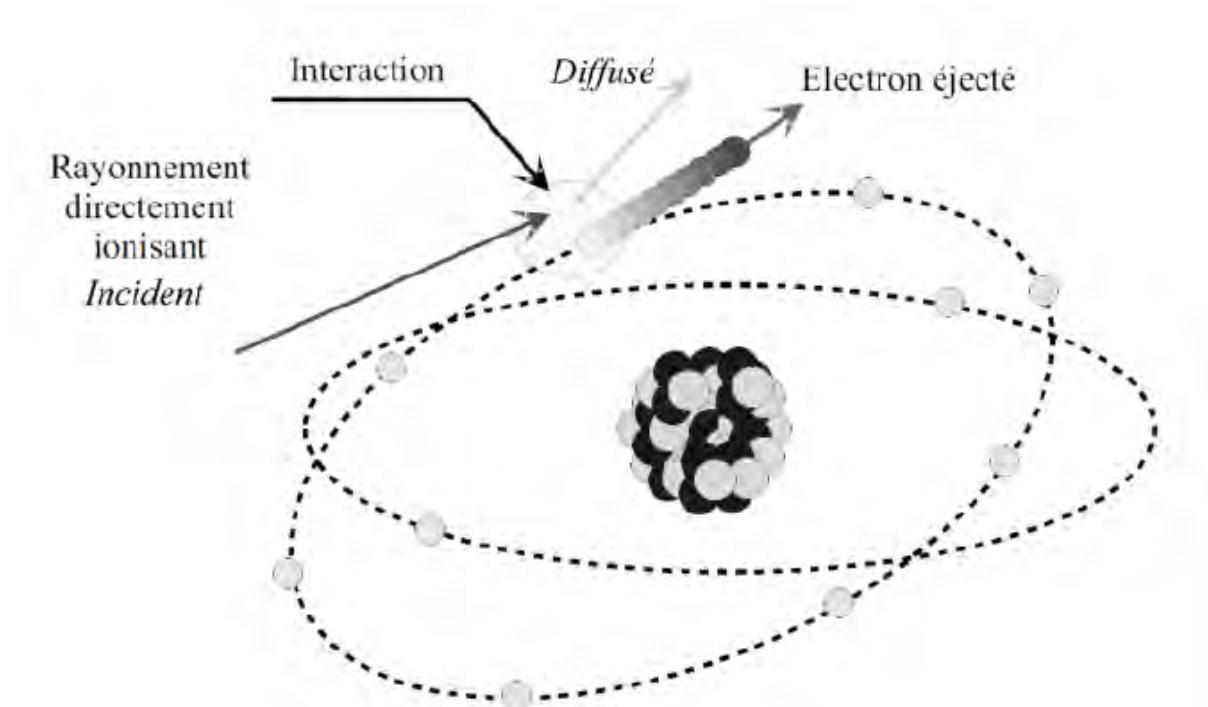


Figure 13 : Phénomène d'ionisation par une particule chargée, d'après [79].

En général, lors d'une ionisation, l'énergie cédée par l'électron incident est faible en comparaison à son énergie cinétique totale. Par conséquent, de nombreuses interactions peuvent avoir lieu avant que l'énergie cinétique totale de l'électron incident soit insuffisante pour pénétrer plus loin dans la matière.

Le phénomène d'excitation

Il a lieu quand l'électron incident transfère une énergie égale à la différence entre les énergies de liaison de deux couches électroniques de l'atome de la matière. Comme l'illustre la Figure 14, l'électron de la matière qui subit l'interaction va migrer vers une couche électronique moins liée et plus énergétique : il y a excitation de l'atome. L'état excité est instable car le cortège électronique dans son ensemble est alors dans un état énergétique plus important qu'il ne devrait l'être. La lacune créée par le déplacement de l'électron va être comblée par un électron d'une couche de niveau supérieur grâce à un réarrangement du cortège électronique. Cela donne lieu à l'émission d'un photon dont l'énergie dépend de la différence entre les niveaux énergétiques des deux couches en question, c'est-à-dire de l'énergie de transition. Ce processus est appelé désexcitation ou relaxation de l'atome. Si la valeur de l'énergie de transition est modérée, la relaxation engendre l'émission d'un photon de faible énergie (visible ou ultraviolet). Si cette valeur est élevée, la relaxation peut engendrer :

- l'émission d'un photon X, résultant de la réorganisation du cortège électronique qui fait suite à l'ionisation de couches proches du noyau. Il est intéressant de remarquer que cela définit l'une des deux origines du rayonnement X.
- la recapture du photon X, par l'atome lui-même, provoquant l'expulsion d'un électron périphérique. Cet électron est appelé électron Auger (cf. Figure 14).

Dans le cadre de l'excitation d'un atome, l'énergie que cède l'électron incident à l'électron de la matière, comparativement à son énergie cinétique, est moins importante que dans le cas de l'ionisation.

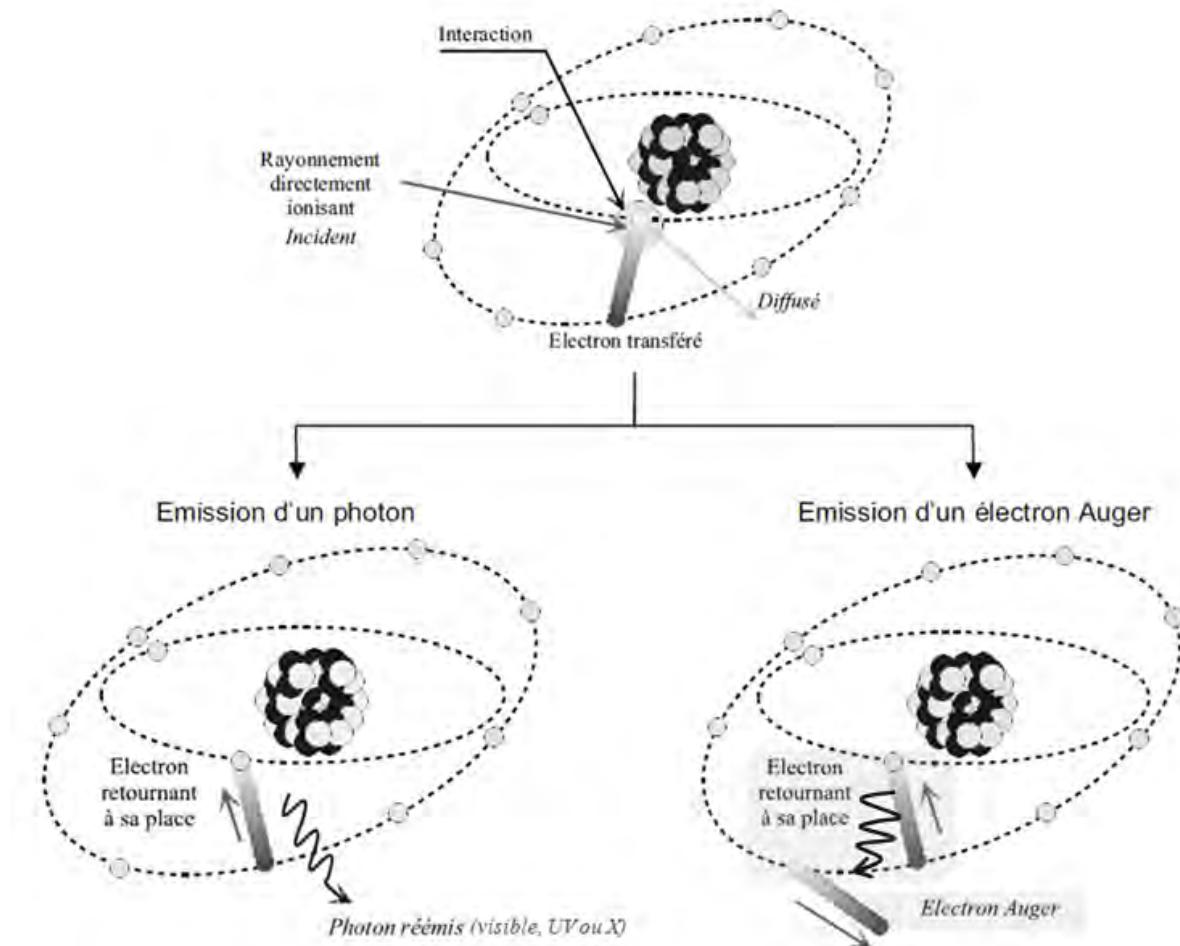


Figure 14 : Phénomène d'excitation et ses conséquences, d'après [78].

Le phénomène de freinage

Plus minoritairement, les électrons qui pénètrent dans un milieu matériel peuvent interagir avec les noyaux atomiques de la matière. Cette interaction est d'autant plus probable que l'énergie de l'électron incident est grande (supérieur à 1 MeV) et que le numéro atomique du noyau de la matière traversée est important. Quand ces conditions sont réunies, un électron passant près d'un noyau peut, sous l'influence du champ électrique (champ coulombien du noyau, d'autant plus fort que le noyau est lourd), lui céder une partie de son énergie et être dévié. Un ralentissement ou un freinage de l'électron en est la conséquence. L'énergie perdue par l'électron est alors émise sous forme de rayonnements X dits de freinage ou Bremsstrahlung. Il s'agit du deuxième phénomène pouvant donner naissance au rayonnement X (cf. Figure 15).

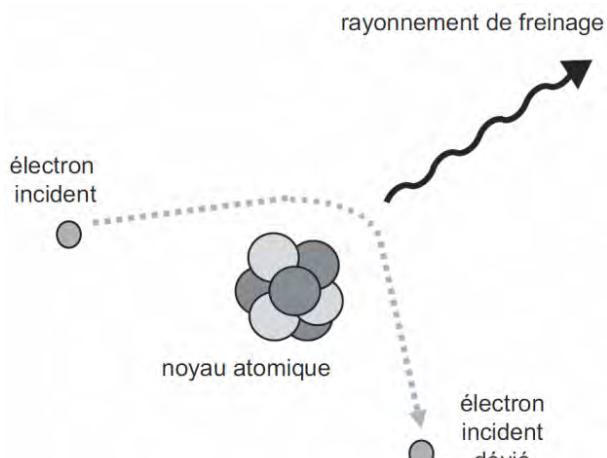


Figure 15 : Phénomène d'émission de rayonnements X de freinage ou Bremsstrahlung, d'après [78].

La compréhension de l'interaction des particules chargées, et notamment des électrons, avec la matière permet de mieux comprendre les différents phénomènes qui apparaissent lorsqu'un faisceau d'électrons arrive à la surface d'un produit : modification des composés chimiques, création d'espèces réactives, énergie déposée dans le produit.

1.2.2. Principe d'un faisceau d'électrons

La génération d'un faisceau d'électrons

L'étude se portant sur un faisceau d'électrons de faible énergie (250 keV), la description qui suit ne s'applique qu'à ce type de faisceau.

Pour la génération d'un faisceau continu ou pulsé, le principe général est identique. C'est la réalisation des différentes parties qui est différente. Au paragraphe 1.2.6, les différents éléments constituant le générateur pulsé seront décrits.

Dans un premier temps, il faut générer une forte tension à partir d'une alimentation industrielle (triphasé 380 V).

Ensuite, le courant créé va être transmis jusqu'à la diode. Une diode est composée d'une cathode au potentiel (dans notre cas) et d'une anode (feuille métallique) reliée à la terre. L'ensemble est sous vide secondaire pour limiter l'érosion de la cathode et les interactions des électrons avec les molécules de l'air. C'est à ce niveau que le faisceau d'électrons va être généré. En fonction de l'impédance de la diode, une certaine tension va se trouver aux bornes de celle-ci qui constituera l'énergie cinétique des électrons. La quantité de charge par unité de temps au niveau de la diode est le courant. Pour extraire et accélérer les électrons, une différence de potentiel est appliquée entre la cathode et l'anode. Ces électrons accélérés ont suffisamment d'énergie pour traverser la feuille servant d'anode et venir traiter le produit. Le produit étant à la pression atmosphérique (P_{atm}), la feuille permet de faire étanchéité entre le vide et la P_{atm} [10,76]. L'épaisseur est donc calculée afin d'être suffisamment solide mécaniquement pour résister aux forces de pression. Cependant, il faut aussi qu'elle soit suffisamment fine pour que les électrons puissent la traverser sans perdre trop d'énergie. En

effet, la pénétration des électrons dans la matière est limitée et dépendante de l'énergie de ces derniers.

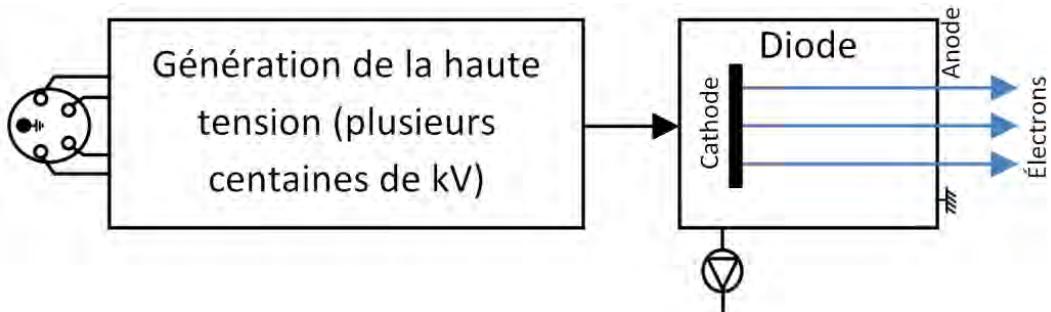


Figure 16 : Schéma du fonctionnement des machines à faisceau d'électrons faible énergie.

La pénétration des électrons

Il est assez intuitif de comprendre que la masse des particules influe sur la pénétration de ces dernières dans la matière. De même, les rayonnements électromagnétiques, qui n'ont pas de masse, ont un pouvoir pénétrant plus important que les rayonnements mettant en jeu des particules. Le schéma ci-dessous résume ce propos.

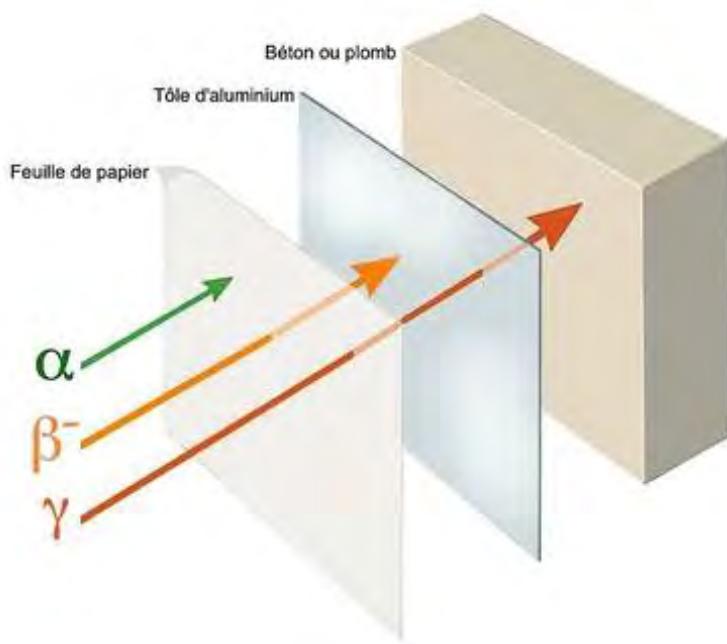


Figure 17 : Pouvoir de pénétration des différents rayonnements, d'après [80].

La masse des particules va influer sur leur capacité d'interaction avec les molécules constitutives du milieu. Ces interactions vont être à l'origine de trajectoires différentes dans

la matière et donc de pénétrations différentes. Pour caractériser la trajectoire des rayonnements particulaires, deux grandeurs sont utilisées :

- le parcours : c'est la longueur du chemin parcouru dans la matière. Il s'exprime généralement en unité métrique.
- la portée : c'est la profondeur de pénétration que les particules ont atteint. L'unité de masse surfacique [g.cm^{-2}] et l'unité de masse volumique [g.cm^{-3}] sont les plus couramment employées (Figure 18).

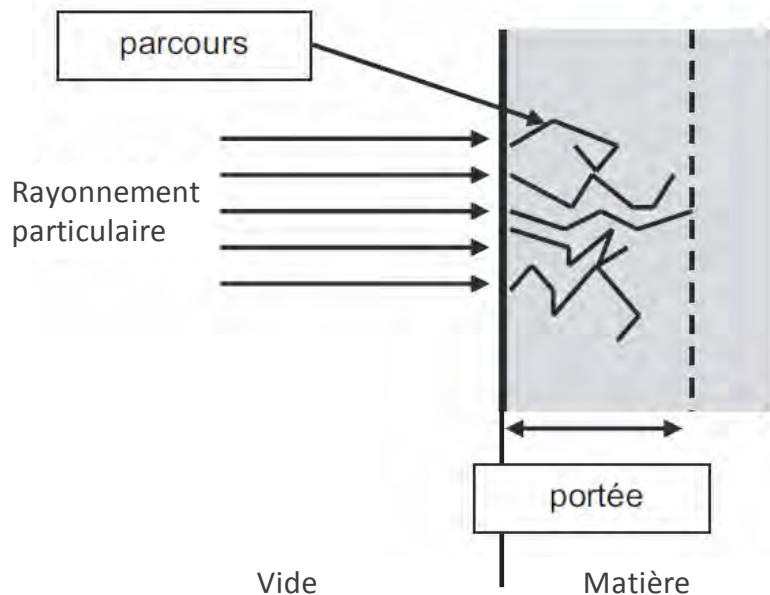


Figure 18 : Notions de parcours et de portée d'un rayonnement particulaire, d'après [78].

Les électrons, de masse très faible ($9,10938356 \times 10^{-28} \text{ g}$), vont avoir un parcours très sinueux car sujets aux déviations de trajectoire. La valeur de la portée des électrons sera donc toujours moins importante que leur parcours.

La relation de Katz et Penfold permet d'évaluer, pour des énergies de faisceaux comprises entre 0,01 MeV et 2,5 MeV, la portée des électrons (t_l) [6].

$$t_l = \frac{0,412 \times E^{1,265 - 0,0954 \ln E}}{\rho} \quad (\text{équation 1})$$

Avec t_l : valeur de pénétration maximale en cm

E : énergie maximale d'un électron en MeV

ρ : masse volumique du milieu en g/cm^3 .

Cette formule nous indique que plus le milieu à une masse volumique importante, moins le faisceau va pouvoir pénétrer la matière. Pour compenser cette perte de pénétration, il faut augmenter l'énergie du faisceau. A chaque interaction l'électron va perdre de l'énergie jusqu'à

atteindre une valeur quasi nulle d'environ 0,025 eV, correspondant à l'agitation thermique. Il est estimé qu'à partir de cette énergie l'électron s'arrête.

La représentation graphique du TLE (Transfert Linéique d'Energie) des électrons en fonction de leur énergie permet d'observer la façon caractéristique dont ils cèdent leur énergie en fonction de leur ralentissement dans la matière. En effet, le TLE représente l'énergie transférée localement par les particules à la matière pour un élément de parcours (en MeV/cm). Le TLE d'une particule chargée d'énergie E dans un matériau est :

$$TLE = \frac{dE_l}{dx} \quad (\text{équation 2})$$

Avec dE_l : énergie transférée localement en MeV
 dx : élément de parcours en cm.

Un exemple de ce type de représentation est donné en Figure 18 dans le cas d'un milieu de tissus vivants.

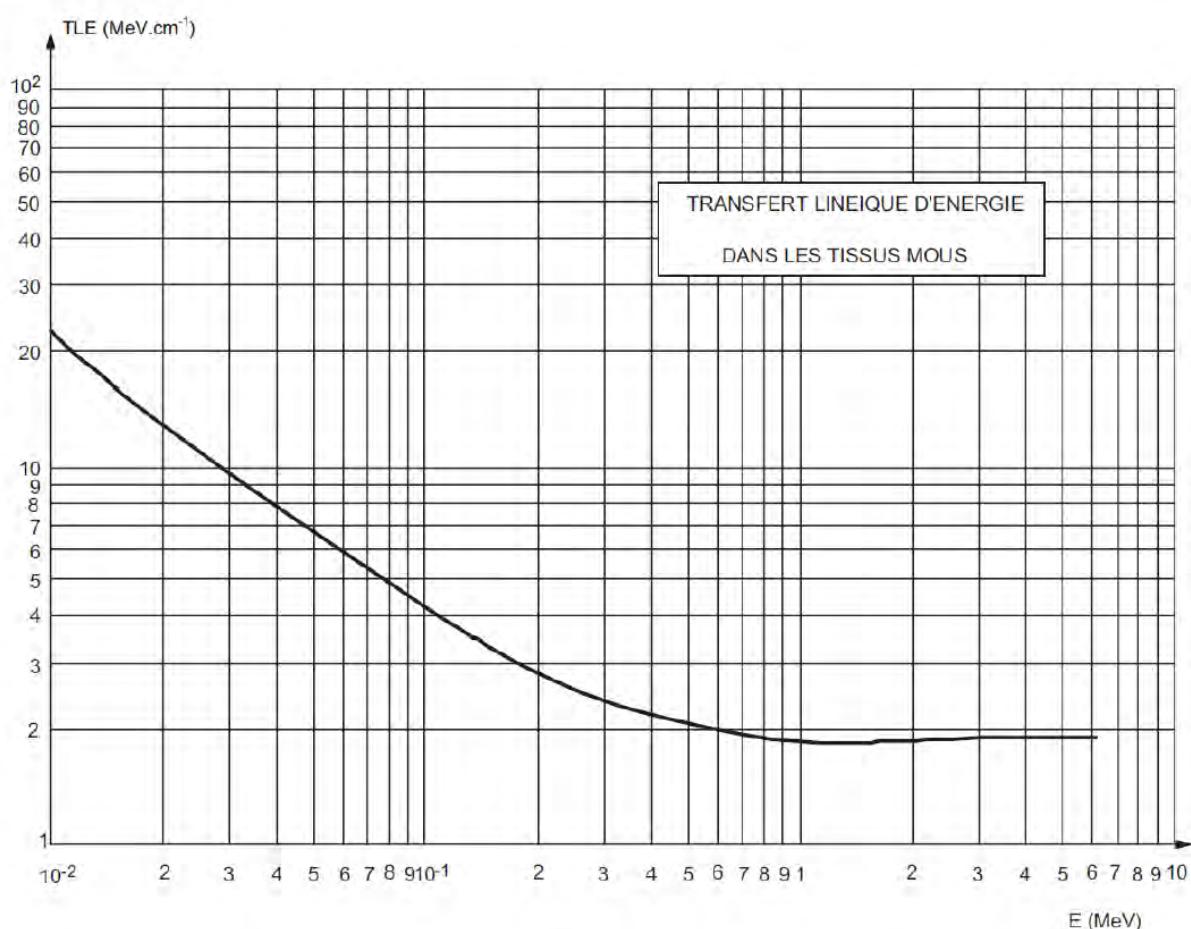


Figure 19 : Représentation graphique du TLE des électrons pénétrant la matière en fonction de leur énergie : exemple dans les tissus vivants, d'après [78].

La courbe ci-dessus permet de faire deux observations intéressantes sur la façon dont les électrons ralentis cèdent leur énergie à la matière. D'une part, pour des basses énergies jusqu'à 500 keV, plus les électrons sont ralentis par leurs interactions avec la matière, plus l'énergie qu'ils cèdent par interaction est importante. Autrement dit, les électrons cèdent plus d'énergie à la matière à la fin de leur parcours. D'autre part, pour des énergies comprises entre 500 keV et 5 MeV, il apparaît que l'énergie transférée par les électrons à la matière par unité de longueur de la trajectoire parcourue, est relativement identique quelle que soit l'énergie considérée.

1.2.3. Effet sur les microorganismes

En fonction du type de microorganismes, la résistance aux rayonnements ionisants est différente. Par exemple, les virus sont moins sensibles aux radiations que les bactéries [2]. Au sein même des bactéries, suivant la souche, l'efficacité du traitement ne va pas être la même. De manière générale, les bactéries Gram positives sont moins sensibles que les bactéries Gram négatives aux radiations [81]. La couche de peptidoglycane confère une rigidité naturelle plus importante aux organismes Gram positifs. En effet, il faut une énergie plus importante pour inactiver *Bacillus subtilis* sous forme végétative comparativement à *Escherichia coli* [82].

De plus, parmi les bactéries Gram positives, les spores bactériennes montrent une plus grande résistance à ce type de traitement. Le graphique ci-dessous illustre l'évolution de la résistance en fonction du type de bactéries.

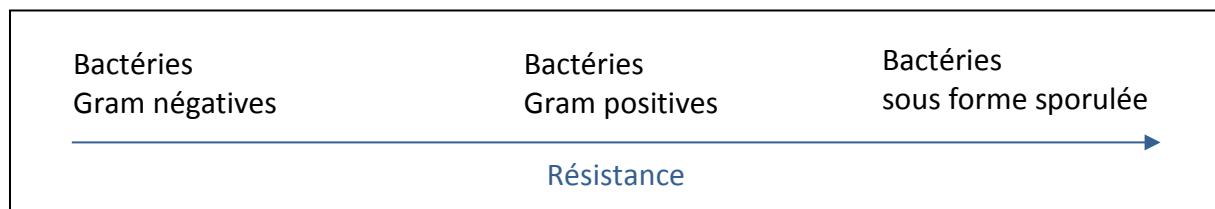


Figure 20 : Evolution de la résistance en fonction du type de bactéries.

En plus de la souche sélectionnée, certains paramètres peuvent influencer l'efficacité du faisceau d'électrons. Ils sont de deux types :

- Propre aux propriétés électriques du générateur d'électrons
- Fonction de l'environnement de la bactérie (milieu aqueux ou non, par exemple).

Tout d'abord, l'énergie des électrons (en électron Volt, eV) détermine la profondeur de pénétration de ces derniers. Il est donc facile de comprendre que les électrons de faible énergie (<500 keV) sont plus adaptés pour le traitement des surfaces. En effet, les électrons vont déposer leur énergie dans les premiers micromètres qu'ils vont rencontrer. Une augmentation de l'énergie permet de traverser des surfaces et donc de pouvoir traiter des produits dans leur ensemble (extérieur et intérieur). Cependant, il est intéressant de se demander si un changement d'énergie peut avoir une influence sur l'efficacité du traitement. D'après Tallentire *et al.*, les résultats obtenus sur *B. pumilus* montrent que la décontamination bactérienne est la même pour les deux technologies de faisceau d'électrons : basse énergie

(80 et 100 keV) et haute énergie (10 MeV) [11]. Cependant, il faut remarquer qu'ils comparent l'efficacité en termes de dose et non de durée d'exposition. La dose est effectivement la référence pour la stérilisation de produits pharmaceutiques dans la norme EN ISO 11137-2 (Stérilisation des produits de santé — Irradiation — Partie 2 : Établissement de la dose stérilisante). Cependant, en considérant les courbes de pénétration des électrons à différentes énergies (Figure 21 et Figure 22), il en ressort que la quantité d'énergie déposée en surface est plus importante avec la diminution de l'énergie. La dose souhaitée est donc atteinte plus rapidement en surface avec des électrons de faible énergie pour un même courant délivré.

DEPTH DOSE DISTRIBUTIONS IN POLYETHYLENE

Titanium Window Thickness - 6 mcm

Air Space Thickness - 2.5 cm

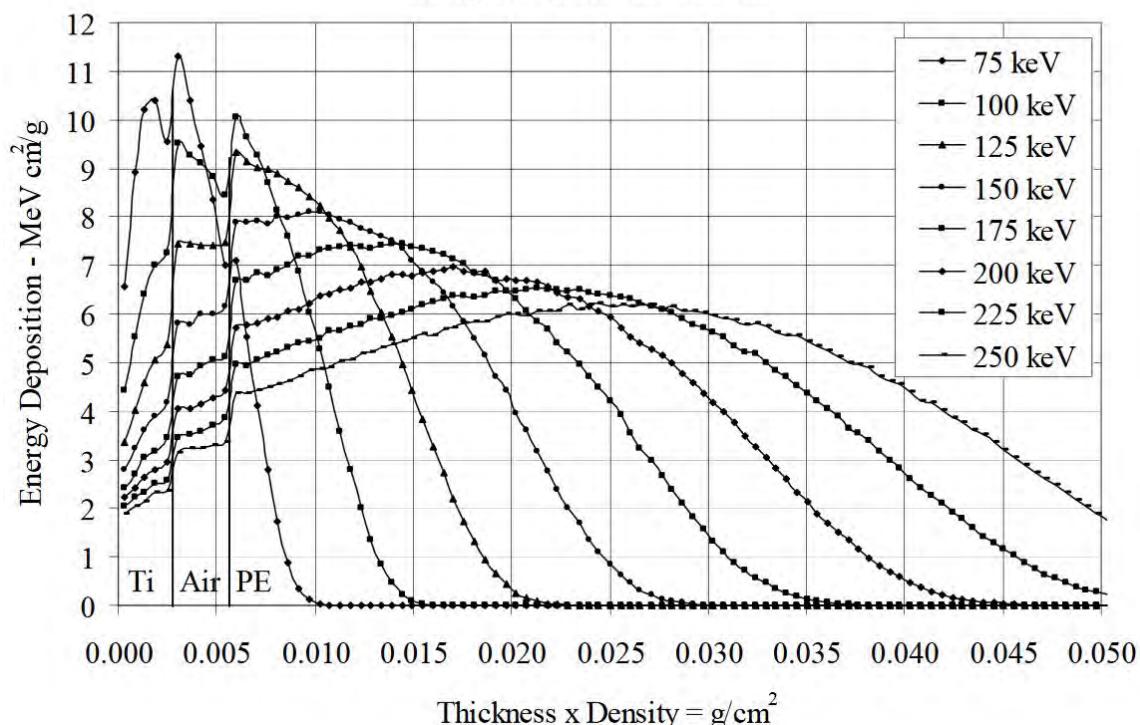


Figure 21 : Dépôt d'énergie par des électrons de 75 à 250 keV en fonction de l'épaisseur et de la densité du matériau traversé, d'après [83].

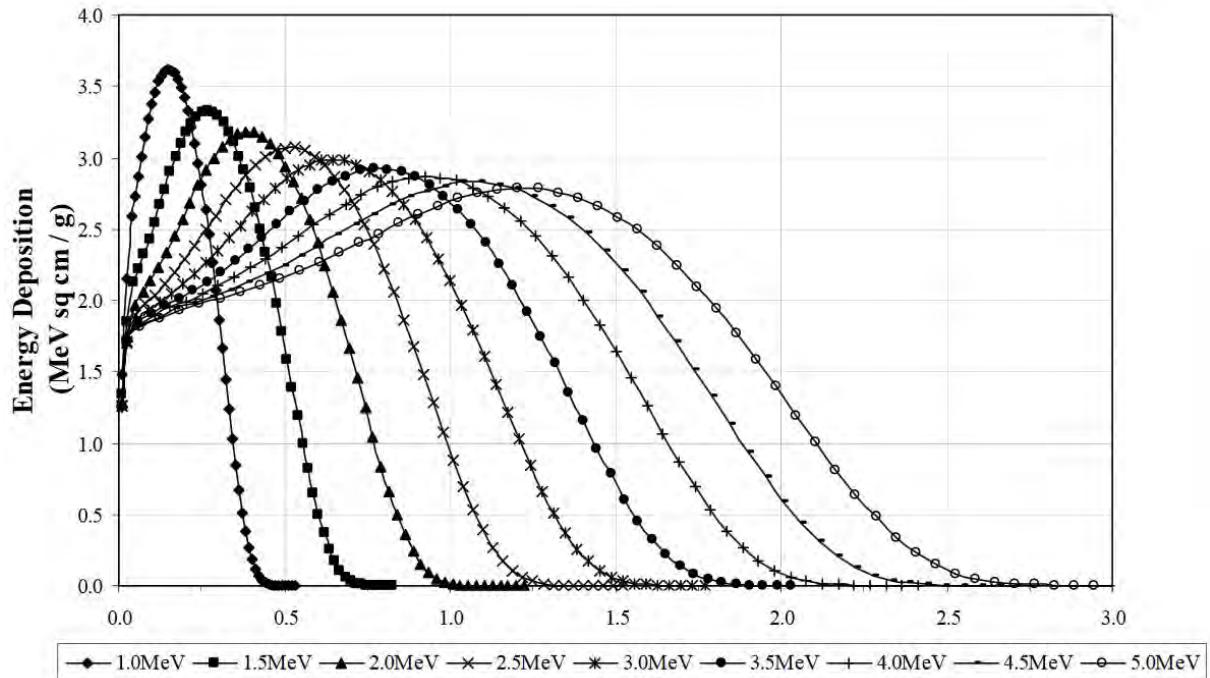


Figure 22 : Dépôt d'énergie par des électrons de 1 à 5 MeV en fonction de l'épaisseur et de la densité du matériau traversé, d'après [83].

De plus, il existerait une énergie ‘seuil’ à partir de laquelle il faut un temps de traitement plus important pour avoir le même taux d’éradiation. Dans l’étude menée par Chalise *et al.*, il faut 5 fois plus de temps au faisceau pour traiter l’échantillon à 77 keV qu’à 85 keV. L’explication peut venir du fait que des électrons de faible énergie sont rapidement atténués et les bactéries situées sur le dessus vont être éliminées rapidement car elles reçoivent un maximum d’énergie, alors que les bactéries situées en dessous sont protégées. Il faudra donc augmenter le temps d’exposition pour arriver à éliminer ces dernières [6].

Un autre paramètre du générateur peut influer sur l’efficacité de traitement. Il s’agit du courant, qui représente le nombre d’électrons extraits par unité de temps. Une augmentation du nombre d’électrons permet d’accroître l’efficacité [84].

Le débit de dose correspond à la dose délivrée par unité de temps. Plus ce débit est important, plus le traitement est efficace [1]. En effet, ce type de traitement influerait sur l’intégrité de l’ADN et les mécanismes de réparation n’auraient pas le temps de se mettre en place.

De plus, les conditions dans lesquelles se trouvent la bactérie ont également été étudiées et montrent que différents paramètres interviennent dans l’efficacité du traitement. Chalise *et al.* ainsi que Ghomi *et al.* ont étudié l’influence de la concentration en étalant des bactéries (*Escherichia coli*) sur boîte de Pétri avec des concentrations allant de 10^2 à 10^6 UFC (Unité Formant Colonies)/boîte [6,84]. En utilisant le même équipement, ils sont arrivés à des conclusions inverses. En effet, Chalise *et al.* démontrent que la densité bactérienne n’influe pas sur la capacité de survie d’*Escherichia coli*. Au contraire, Ghomi *et al.* concluent que, lorsque la concentration en bactéries augmente, la survie des microorganismes augmente. Ils expliquent ce phénomène en évoquant la possibilité de superposition des bactéries. Si une

bactérie se trouve sous une autre bactérie, le niveau d'énergie des électrons aura diminué d'environ 0,5 keV lorsqu'ils atteindront la deuxième bactérie (pour une énergie de faisceau de 80 keV). Cet effet conduira ainsi à un moins bon effet bactéricide. Et, par conséquent, plus la concentration bactérienne augmente, plus cette probabilité est importante.

La présence d'eau est également un facteur influençant l'efficacité. En effet, l'eau disponible joue un rôle essentiel dans l'inactivation microbienne comme un effet indirect dû aux espèces issues de la radiolyse de l'eau [4,73].

Lorsque les électrons viennent interagir avec une surface, ils vont déposer de l'énergie dans la matière rencontrée. En plus des modifications aux niveaux des liaisons chimiques, cette énergie peut être restituée sous forme de chaleur. Par conséquent, une augmentation de la température pourrait également expliquer l'effet bactéricide de ce type de traitement. Helfinstine *et al.* ont montré que l'augmentation de température pour une dose déposée de 40 kGy est de l'ordre de 19°C. En partant d'une température de 20,9°C, ils sont arrivés à un échantillon à 49,2°C [85]. Une équation régit cette augmentation de température, elle montre que cette dernière est proportionnelle à la dose déposée ainsi qu'au matériau rencontré.

$$\Delta T = k \frac{\text{Dose absorbée}}{\text{Cp du matériau irradié}} \quad (\text{équation 3})$$

Avec ΔT : différence de température en Kelvin

k : facteur de conversion

Dose en Gray

Cp : capacité calorifique du matériau en $J.K^{-1}.kg^{-1}$.

Pour finir, il a été montré que, lors d'un traitement des bactéries en dessous de la dose létale, un phénomène de résistance pouvait se mettre en place augmentant ainsi la résistance des souches aux rayonnements ionisants. Cependant, des altérations dans la résistance des cellules végétatives produites par des irradiations répétées n'ont pas donné lieu à des cellules végétatives avec une résistance comparable à celle des spores non traitées [74]. Ces phénomènes de résistance s'expliquent par le fait que, si le traitement est trop lent, les mécanismes de réparation de l'ADN ont le temps de se mettre en place. Par conséquent, afin de neutraliser efficacement les cellules microbiennes en utilisant les rayonnements ionisants, la dose doit être délivrée dans un laps de temps suffisamment court pour contourner les processus de réparation à médiation cellulaire [86]. Cette observation suggère que les faisceaux d'électrons affectent l'ADN des microorganismes mais d'autres phénomènes peuvent intervenir et avoir un effet létal sur les bactéries.

D'une manière générale, les agents bactéricides ont plusieurs cibles afin d'empêcher le développement des bactéries. Tout d'abord, la paroi est une enveloppe rigide qui assure l'intégrité des bactéries et qui les protège d'un stress environnemental. Les biomolécules comme l'ADN ou les protéines peuvent également être les cibles de ces agents. Dans le cas des rayonnements ionisants, il est admis qu'ils agissent de manière directe et indirecte par

l'interaction avec les biomolécules ou en créant des espèces réactives comme $\bullet\text{OH}$, $\bullet\text{H}$, H_2O_2 qui ensuite viendront modifier l'intégrité cellulaire [85,87].

Dans une publication de Parisi *et al.*, un changement au niveau de la morphologie des colonies de *Bacillus pumilus* sous forme végétative est apparue. L'aspect des colonies avant traitement était rugueux alors qu'après les traitements les colonies sont lisses. Cette observation laisse supposer qu'une modification de la paroi a pu se produire. Des outils de microscopies électroniques permettent d'observer si des dommages au niveau de la paroi apparaissent après un traitement ionisant. Aucune modification au niveau de la membrane n'est observée [74]. Cependant, il est supposé qu'une densité de courant très importante peut conduire à la formation de pores au niveau de la membrane de la cellule conduisant ainsi à la mort cellulaire. Le temps d'exposition est un critère important dans le processus d'initiation du phénomène d'électroporation. Ghomi *et al.* (2005) ont émis l'hypothèse que, lorsque la durée d'impulsion est de l'ordre de la microseconde (μs), la capacité de la membrane cellulaire d'isoler le champ électrique externe peut conduire à la pénétration des électrons directement au niveau des organites sans causer de dommages permanents à la membrane cellulaire externe. Cette théorie a été testée en soumettant des échantillons bactériens à une impulsion électrique de 5 μs et 80 keV. L'analyse par spectroscopie à $\text{DO}_{260\text{ nm}}$ et $\text{DO}_{280\text{ nm}}$ n'a révélé aucune fuite d'ADN ou de protéines, respectivement. La microscopie électronique à balayage (MEB) a montré que la membrane cellulaire est restée intacte et, par conséquent, l'inactivation est supposée se produire par des changements au niveau de l'ADN ou des modifications de composés chimiques présents au sein de la bactérie [1,6].

Des mécanismes directs et indirects peuvent se produire suite à l'irradiation des bactéries par un faisceau d'électrons. Le mécanisme direct est l'apparition de cassures au niveau de l'ADN, double ou simple brin [1,88]. L'énergie des liaisons covalentes de cette biomolécule est de quelques eV. Comparativement à l'énergie des électrons, elle est beaucoup plus faible [13]. Des phénomènes de crosslinking peuvent également apparaître ce qui rend la croissance des bactéries impossible. L'eau disponible au sein des microorganismes ou dans leur environnement joue un rôle dans l'inactivation bactérienne grâce à la création de produits de radiolyse de l'eau [73]. Ces espèces réactives sont principalement les radicaux H_3O^+ and $\bullet\text{OH}$. Le radical hydroxyle est responsable à 90% des dommages de l'ADN [2,88].

Il a été constaté que la phase de croissance dans laquelle se situe la bactérie influence l'efficacité du traitement. En effet, en phase exponentielle, les bactéries sont plus sensibles aux radiations. L'explication pourrait venir du fait que la machinerie de réparation est saturée pendant cette étape qui est la phase de croissance la plus rapide du cycle. Cependant, en fonction de la souche bactérienne étudiée, des observations contraires peuvent être faites [86].

Comme vu précédemment, en fonction du type de microorganisme, la réponse au traitement est différente. La radiorésistance a été souvent attribuée à la structure condensée du nucléoïde, aux niveaux élevés d'ions manganèses présents dans le cytosol en tant que catalyseur de la dégradation de l'ion superoxyde pour limiter les dommages induits par l'oxydation ou à un processus de réparation de l'ADN RecA-indépendant [89,90].

En 1946, Evelyn Witkin a établi qu'il était possible d'augmenter la résistance d'*Escherichia coli* B aux dommages à l'ADN. Pour cela, elle a exposé les cultures à de fortes doses de lumière UV, lumière connue comme pouvant créer des mutations au niveau du génome. La dose

délivrée était calculée pour tuer la plupart de la population. Les bactéries non éliminées par le traitement sont sélectionnées comme étant les variantes les plus aptes à tolérer les UV. Ensuite, d'autres chercheurs ont répété ce résultat, démontrant que des cycles répétitifs d'exposition à des doses élevées à un agent endommageant l'ADN peuvent améliorer la capacité d'une culture à tolérer cet agent endommageant. Cette capacité est, de surcroit, transmise aux générations suivantes. Pour le cas des faisceaux d'électrons, il a été montré que, par un traitement successif en dessous de la dose létale, une meilleure résistance au traitement peut apparaître. L'augmentation de la résistance aux irradiations a été reportée pour les souches d'*E. coli*, de *Salmonella enterica* et de *Bacillus pumilus* [89,91].

Les irradiations interagissent donc avec la biomolécule d'ADN qui est protégée, notamment, par la membrane et la paroi des bactéries contre les agressions de l'environnement. Cette remarque laisse à penser que des interactions avec d'autres types de molécules sont possibles.

1.2.4. Effets sur les matériaux

Les électrons vont interagir avec les molécules qu'ils rencontrent et induire ainsi des changements physiques ou chimiques. Des phénomènes peuvent apparaître comme de la réticulation, des ruptures de chaînes ou de la photo-oxydation. Les conséquences de ces changements sont : un changement de couleur du produit traité, un changement d'odeur, une modification de ses propriétés physico-chimiques [2]. L'augmentation de la dose déposée dans le matériau induit plus de dommages. Cependant, après avoir fait des essais sur des radicaux de benzyle ammonium ou sur du LDPE (Low Density PolyEthylene), il semblerait que le débit de dose influe sur la quantité de dommages produits par le traitement (Figure 23 et Figure 24) [92,93].

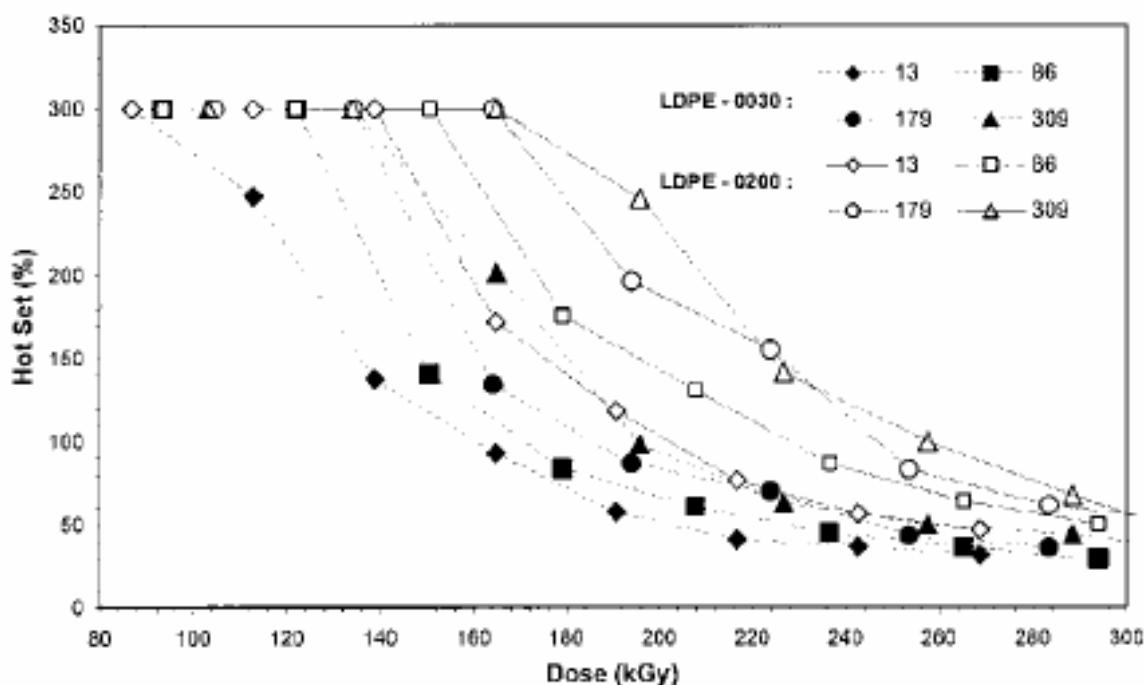


Figure 23 : Variation du taux de gel de deux échantillons de polymère (LDPE-0030 et LDPE-0200) en fonction de la dose déposée. Le débit de dose est indiqué dans la légende en kGy/min, d'après [93].

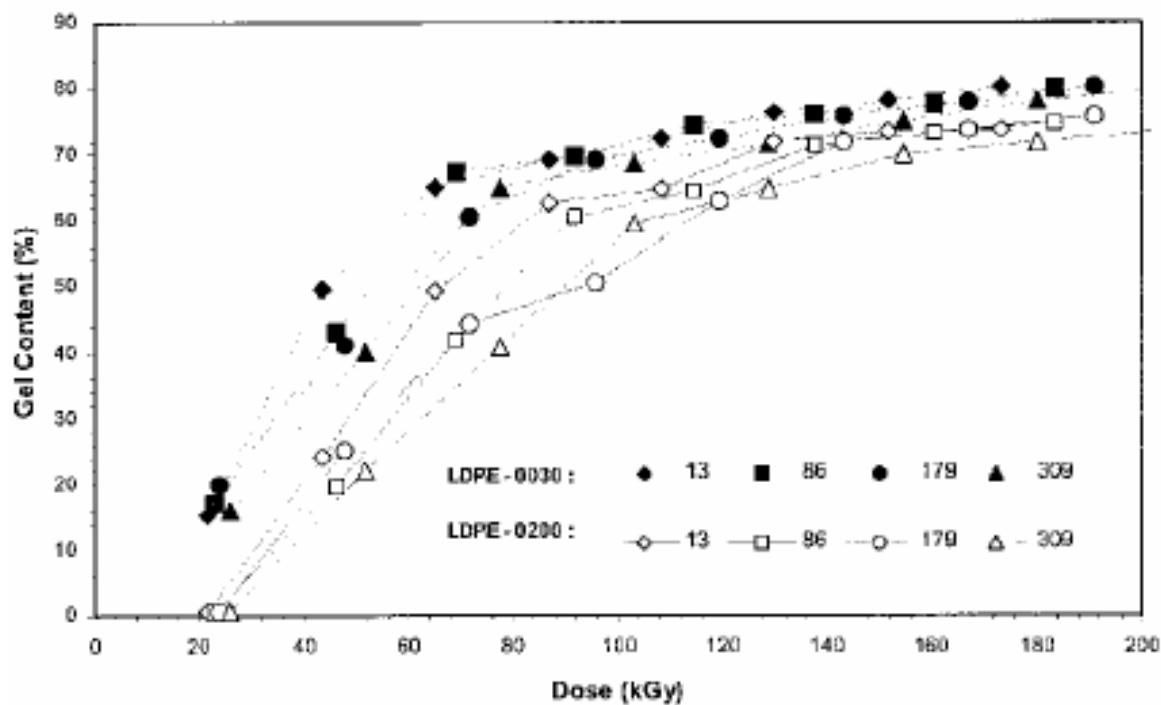


Figure 24 : Variation du pourcentage d'élongation de deux échantillons de polymère (LDPE-0030 et LDPE-0200) en fonction de la dose déposée. Le débit de dose est indiqué dans la légende en kGy/min, d'après [93].

1.2.5. Comparaison avec les autres technologies ionisantes

Plusieurs études s'attachent à comparer l'efficacité des différentes technologies d'irradiation.

Tout d'abord, les rayonnements gamma et les rayons X ont, pour une même dose déposée, une moins bonne efficacité que les faisceaux d'électrons. En effet, la comparaison des valeurs de D_0 (dose létale moyenne) indique que l'irradiation par faisceau d'électrons conduit à la mort de plus de cellules que celle observée pour l'irradiation gamma ou par rayon X [2,94]. Les radiations ayant un TLE important (comme les faisceaux d'électrons) sont biologiquement plus efficaces par unité de dose absorbée. Les variations d'efficacité peuvent aussi être attribuées à l'énergie d'irradiation et au débit de dose, spécifiquement pour les radiations de faible TLE [94].

Ensuite, comparativement à la stérilisation par rayons gamma, la supériorité de la stérilisation par faisceau d'électrons est due à son effet moins dégradant, fonction de son temps d'exposition plus court et d'un débit de dose plus important. Ces caractéristiques permettent de limiter les réactions de dégradation des polymères.

Cependant, la limite de l'utilisation des faisceaux d'électrons est la faible pénétration de ces derniers dans les matériaux par rapport aux deux autres technologies. Un traitement de surface ou à travers des matériaux de faible épaisseur et/ou de faible densité est donc l'unique possibilité d'utilisation de ce type de rayonnement.

Deux types de faisceau existent : les faisceaux d'électrons continus et pulsés. Les débits de dose sont également différents, beaucoup plus élevés dans le cas du pulsé. Par conséquent, une comparaison de l'efficacité a conduit à la conclusion suivante : les faisceaux d'électrons pulsés sont plus efficaces que les faisceaux continus pour les mêmes raisons que les rayonnements gamma et X [1]. Cependant, dans le cas de deux faisceaux d'électrons pulsés de durée d'impulsion 2 μ s et 35 ns, les résultats obtenus par L.C. DeVeaux *et al.* sont différents en fonction du microorganisme étudié. En effet, pour *Halobacterium* sp. NRC-1, l'efficacité n'est pas affectée par le débit de dose. Pour *Bacillus subtilis*, en revanche, la technologie ayant le plus fort débit de dose est moins efficace (LD50 : 1 kGy pour 10¹¹ Gy/s contre 0,2 kGy pour 30 Gy/s) [86].

Par conséquent, en fonction de la souche étudiée, les conclusions peuvent être différentes. Même pour des technologies comme les microondes, en fonction de la souche, cette technologie peut s'avérer plus ou moins efficace que les faisceaux d'électrons. Il est donc proposé par certains de combiner les deux technologies pour avoir une efficacité accrue du traitement et pour étendre la plage de microorganismes inactivés par le traitement [87].

1.2.6. Présentation du dispositif expérimental

Pour le générateur étudié ici, l'énergie des électrons se situe autour de 250 keV. La machine est donc considérée comme une technologie de basse énergie (< 500 keV). Le courant délivré par le générateur est de 6 kA et la durée de l'impulsion mesurée à mi-hauteur est de 10 ns. Il est possible de délivrer beaucoup de courant sur une durée très courte en stockant l'énergie dans des condensateurs qui vont ensuite délivrer le courant à travers un transformateur à

base de matériaux magnétiques. Le principe de ce type de transformateur est d'augmenter la tension d'entrée en utilisant une bobine mono-spire qui va créer un champ électromagnétique. Ce dernier va être guidé par un noyau ferromagnétique présent sur l'axe des bobines primaire et secondaire. Le passage d'un champ électromagnétique au cœur de la bobine va induire un courant dans les spires de la bobine du secondaire. La tension en sortie sera proportionnelle au rapport du nombre de spires entre le primaire et le secondaire.

En aval de cette ligne de formation se trouve un éclateur (Figure 25). Ce dernier sert d'interrupteur. Il est pressurisé sous 12 bars d'azote. Lorsque la tension au niveau de l'électrode **A** dépasse la tenue en tension du gaz présent dans la cavité, le courant va créer un arc entre l'électrode **A** et l'électrode **B**. L'énergie est acheminée jusqu'à la cathode grâce à une ligne de transmission. A ce niveau, un vide secondaire est créé afin de favoriser l'émission des électrons et d'éviter toutes interactions des électrons avec les molécules de l'air. C'est seulement à ce stade que les électrons sont extraits et accélérés avec une certaine vitesse. Cette dernière va leur permettre de traverser une fine feuille métallique (anode). L'épaisseur de la feuille permet de maintenir la différence de pression entre la diode sous vide et la zone de traitement qui est à la pression atmosphérique. Les électrons ainsi émis vont venir percuter le produit situé sous la fenêtre et interagir avec les microorganismes présents sur le produit.

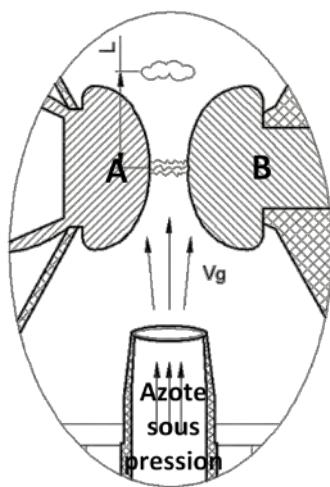


Figure 25 : Eclateur sous 12 bars d'azote.

La Figure 26 résume les différentes parties du générateur. Une photo du système est également présentée en Figure 27.

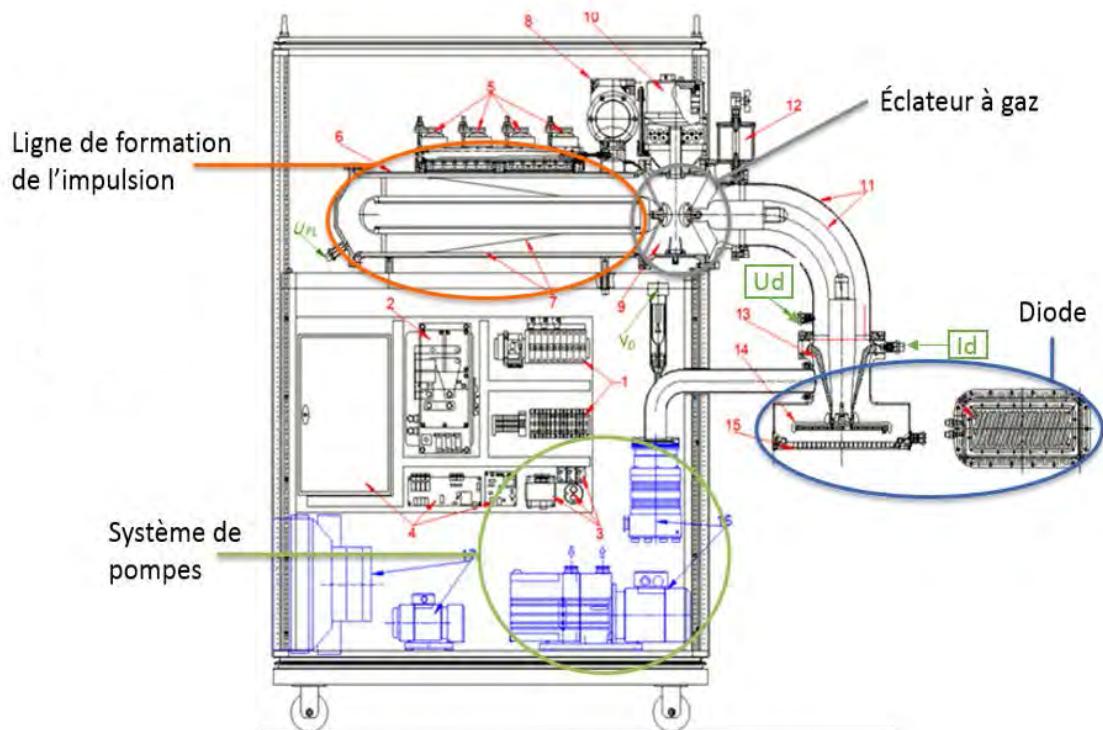


Figure 26 : Schéma des différentes parties constituant le générateur de faisceau d'électrons. Les points de mesure sont indiqués en vert avec U_d pour la tension mesurée au niveau de la diode et I_d , le courant au niveau de la diode.



Figure 27 : Photo de l'équipement de stérilisation par faisceau d'électrons.

1.3. Les décharges électriques

1.3.1. Introduction

Les décharges électriques avec la création d'un arc peuvent se faire dans différents milieux : gazeux ou liquide. Dans le cadre de cette étude, les décharges se font dans un milieu liquide, en l'occurrence de l'eau.

En fonction du type de milieu dans lequel la décharge a lieu, la tenue en tension sera différente. La résistance électrique est une grandeur exprimant la difficulté du mouvement des charges dans un conducteur. L'application d'une forte énergie électrique initie un mouvement important des particules chargées qui vont entrer en collision. Une décharge électrique dans un milieu aqueux ne se réfléchit pas de la même manière que dans un gaz. Il y a au moins trois facteurs principaux distinguant la phase liquide de la phase gazeuse. Le premier est la proximité des molécules plus importante dans une phase liquide qui augmente considérablement la fréquence de collision et donc induit une faible mobilité des particules chargées. Le deuxième problème apparaissant dans les solutions aqueuses vient du fait que les molécules d'eau ont une forte polarité et une force diélectrique favorisant le déclenchement de la décharge. Ces propriétés conduisent à la création de moment dipolaire dans le champ électrique et causent une zone inhomogène à proximité des électrodes. Le troisième facteur influençant la création d'une décharge dans la phase liquide est la présence d'ions et leur mobilité différente dans une solution.

Afin de palier à ces problèmes, il est possible de jouer sur la distance inter-électrode. Une augmentation de cette distance va conduire à une augmentation de la tension de claquage [22].

1.3.2. Principe des décharges électriques

La génération d'une décharge électrique

La décharge dans l'eau se fait en 3 étapes :

- 1) Un faible courant circule entre les électrodes jusqu'à ce que l'eau devienne conductrice. L'eau est chauffée petit à petit par effet Joule, $W_{\text{Joule}} \propto I^2Rt$ ou U^2t/R avec W , l'énergie dissipée sous forme de chaleur (J) ; I , le courant (A) ; R , la résistance de l'eau (Ω) ; t , le temps (s) et U , la tension (V). A cette étape, aucune bulle, couronne ou étincelle n'est observée.
- 2) Quand la tension de décharge augmente, une énergie plus importante est appliquée au milieu et l'eau commence à s'évaporer. Des microbulles sont formées autour des électrodes. Le champ électrique élevé E , (calculé avec $E=V/d$ avec V , la tension de décharge (kV) et d , la distance par rapport au référentiel (cm)) introduit d'abord de petites décharges dans les microbulles. A ce stade, le champ électrique n'est pas assez

élevé pour causer une rupture électrique dans l'eau. Donc, il n'y a pas de lumière ou d'étincelles créées entre les électrodes.

- 3) L'arc de décharge est initié quand la tension de décharge atteint le seuil d'arrachement des électrons [95] (Figure 28).

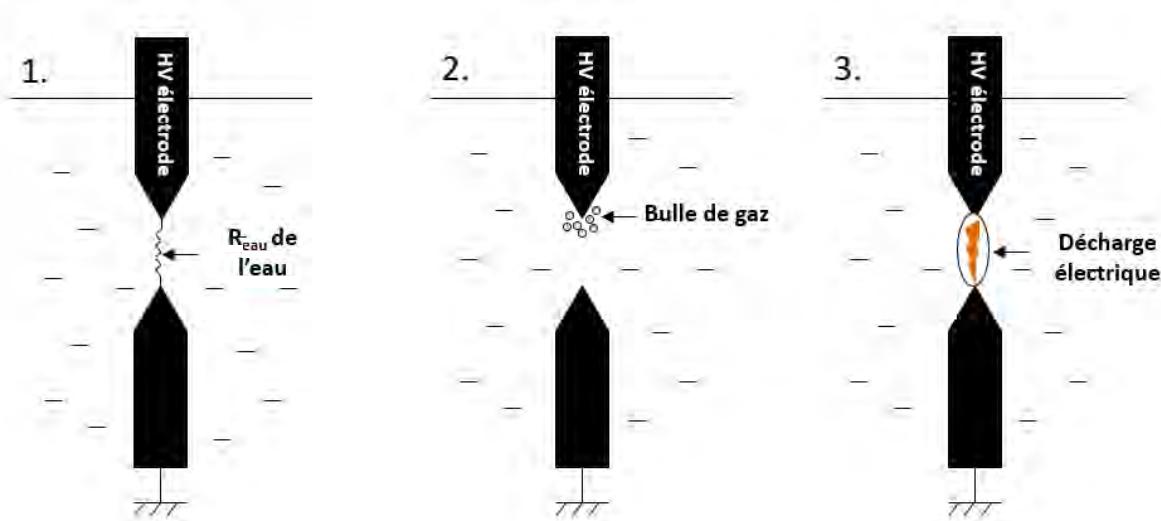


Figure 28 : Principe de création d'une décharge électrique dans de l'eau (inspiré de [95]).

HV électrode : électrode sous haute tension.

Une forte tension de décharge (15-25 kV DC) à travers une paire d'électrodes immergées dans l'eau crée une bulle de plasma de haute pression qui s'expand supersoniquement à travers le fluide alentour produisant une onde de choc sphérique. Contrairement aux ultrasons, les décharges d'ondes de choc sous l'eau, administrées avec une faible fréquence de répétition, ne génèrent pas de chaleur dans le milieu.

Les ondes de choc sont des ondes de pression qui peuvent atteindre chacune 1000 bars en quelques centaines de nanosecondes. Le retour à 1 bar se fait en quelques millisecondes. Quand une onde de choc est réfléchie par une surface avec une impédance acoustique très différente du fluide (ex : air, métal), une onde de pression est produite. Cette dernière peut causer des effets de cavitation et avoir un potentiel perturbateur important aux interfaces [96]. Le changement brusque de pression engendrée par l'onde de choc est la raison de la génération de cavitations [97].

Les phénomènes induits par la décharge électrique

Lors d'une décharge électrique dans l'eau, différents phénomènes physiques sont engendrés. La création d'un arc électrique dans l'eau va induire une augmentation ponctuelle de la température jusqu'à des températures de 5000 K [98]. La cavitation acoustique créée est un

phénomène qui dépend principalement de la pression du milieu, de l'occurrence des microbulles dans le liquide et de la présence d'une interface liquide/air dans l'échantillon [99]. De plus, pendant la création de l'arc, un plasma se produit générant des radiations UV ainsi que des espèces réactives [100]. Le spectre UV créé par la décharge haute-tension sous l'eau a un pic entre 55 et 150 nm [99]. Les radiations UV sont l'un des agents de désinfection les plus efficaces induits par la décharge électrique ainsi que les espèces réactives [17,101,102]. La majorité des espèces créées sont, dans l'ordre, les radicaux hydrogène ($\bullet\text{H}$), puis, oxygène ($\bullet\text{O}$) et le radical hydroxyle ($\bullet\text{OH}$) [95].

Les différents phénomènes induits par la décharge électrique dans l'eau sont résumés dans la Figure 29, leurs effets sur les cellules seront détaillés dans un prochain paragraphe.

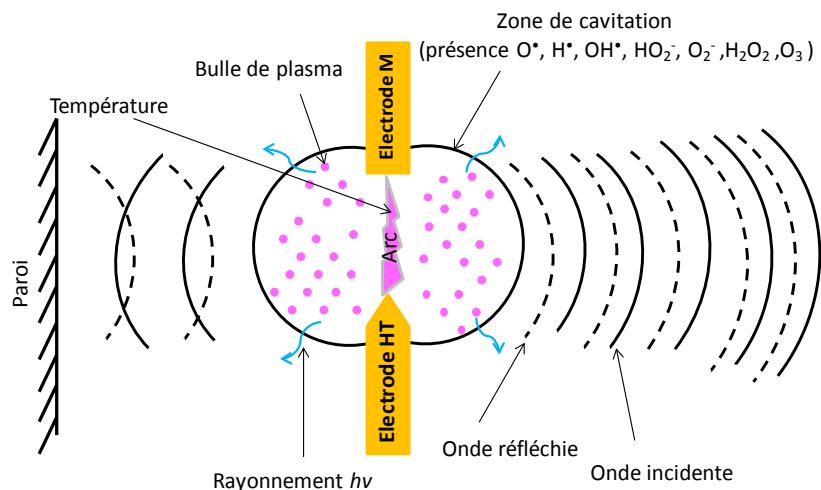


Figure 29 : Mécanismes opérant lors de la génération d'un arc électrique dans l'eau, d'après [103].

1.3.3. Effets sur les microorganismes

Souches

L'efficacité du traitement est dépendante de la taille et de la composition de l'enveloppe des bactéries.

En effet, plus les cellules ont une taille importante, plus elles sont sensibles aux phénomènes d'ultrasons, et donc de cavitation. Ainsi, les bactéries sous forme de bacilles ont une résistance moins importante à ce type de traitement que les coques [104].

En plus de la forme des bactéries, la structure de leur membrane est importante. Les bactéries Gram négatives sont plus sensibles à cause de la finesse de leur membrane de peptidoglycane. Un lien a été établi entre la résistance des bactéries et le degré de réticulation de leur couche de peptidoglycane. Puisque la couche de peptidoglycane dans les membranes des Gram négatives est beaucoup plus mince, même si la réticulation est très importante, leur résistance à des stress mécaniques est plus faible [104–106]. Par exemple, pour stériliser un milieu

contenant *Escherichia coli* (Gram négative), il faut quasiment 2 fois moins d'énergie que pour *Bacillus atrophaeus* (Gram positive) [107].

Il existe également des différences d'efficacité de traitement en fonction de la phase de croissance des bactéries. Des expériences ont été menées sur des bactéries en phase exponentielle de croissance et en phase stationnaire. Ces expériences ont été faites sur la souche de référence *Escherichia coli* et ont montré qu'en phase stationnaire, *E. coli* est plus résistante à des phénomènes comme les UV ou les fortes pressions. Ces constatations suggèrent que, pendant la phase stationnaire, le taux de réPLICATION de l'ADN est diminué ce qui laisse plus de temps aux mécanismes de réparation de l'ADN de se mettre en place ou qu'il y aurait une sur-régulation des mécanismes de réparation de l'ADN pendant cette phase [108,109].

Enfin, des études menées sur les spores bactériennes ont prouvé que les bactéries sous forme sporulée sont moins sensibles à des phénomènes comme la pression hydrostatique ou les ultrasons.

Efficacité

Si l'efficacité d'éradication dépend de la souche sélectionnée, il est également important de connaître les paramètres qui vont influencer le taux de mortalité du microorganisme choisi comme référence, à savoir :

- l'énergie délivrée au niveau de la cuve de traitement
- le nombre d'impulsions appliquées
- les caractéristiques du milieu (volume, présence d'interface, ...)
- les phénomènes créés lors de la décharge.

Tout d'abord, une augmentation de l'énergie va permettre d'augmenter de manière exponentielle l'efficacité bactéricide du traitement [110]. Cependant, le seuil de tension (kV) avant d'avoir un effet sur les microorganismes est d'autant plus long que l'écartement des électrodes est important. La Figure 30 confirme que l'augmentation de l'énergie permet d'améliorer l'efficacité jusqu'à atteindre un plateau. Comme la consommation énergétique augmente avec la tension au carré, il est important de connaître ce plateau pour proposer un système n'ayant pas une tension trop élevée [111].

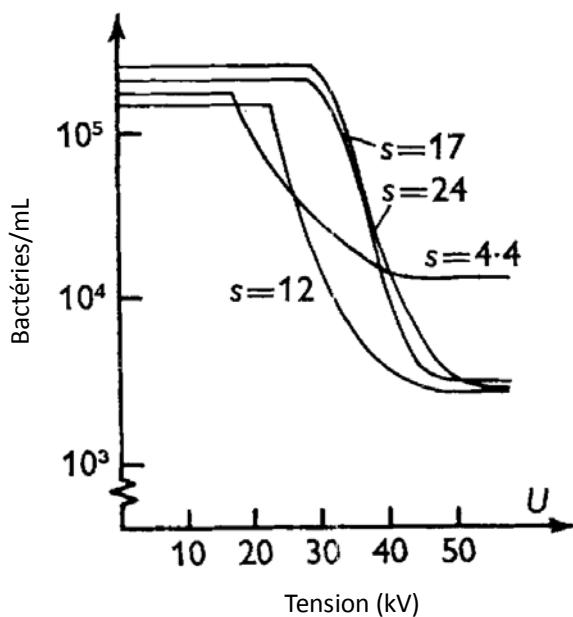


Figure 30 : Effet de la tension et de la distance inter-électrode(s) sur l'effet bactéricide sur *Escherichia coli* B17 dans un volume d'eau de 1,2 L, d'après [111]. La variable 's' désigne la distance inter-électrode en mm.

Il n'est donc pas forcément utile d'augmenter l'énergie si une efficacité plus importante est recherchée.

Une augmentation du nombre d'impulsions permet également d'avoir un effet bactéricide plus important [110]. En contrepartie, la durée du traitement est plus importante. Si ce paramètre ne peut pas être modifié, il est nécessaire d'augmenter la fréquence de répétition des impulsions. Dans ce cas, les ondes de choc générées sont moins violentes mais la quantité d'espèces chimiques produites est plus importante [112]. Or, les radiations produites contribuent de manière significative à la réduction de la viabilité [97]. D'autres recherches ont montré une importante diminution du nombre de bactéries avec des pressions plus faibles. Ces résultats laissent entendre que la mortalité n'est pas purement dépendante de la pression mais probablement d'autres facteurs comme le degré de répétition des chocs et l'exposition aux UV [113]. Par conséquent, il peut être intéressant d'augmenter la fréquence de répétition des impulsions pour améliorer l'efficacité.

L'environnement dans lequel se trouvent les bactéries a un effet sur ces dernières. Par exemple, plus le volume à traiter est important, plus l'efficacité sera faible [110]. De plus, suite à une décharge électrique dans l'eau, l'onde de choc produit une cavitation acoustique, un phénomène bactéricide qui dépend de la pression du milieu, du nombre de microbulles dans le liquide et de la présence d'interface liquide/air [97]. Un autre point à ne pas négliger est la turbidité du milieu. En effet, au moment de la décharge, des radiations UV sont produites. Or, ces rayonnements sont moins efficaces voire inefficaces quand le milieu est trouble ou coloré [112].

La matière dans laquelle sont faites les électrodes est également un paramètre important. Des expériences ont été menées et ont montré que les décharges avec des électrodes contenant

du cuivre (cuivre-tungstène, cuivre, laiton) et de l'argent donnent une meilleure activité bactéricide qui augmente avec le nombre d'impulsion. L'effet bactéricide d'un traitement avec des électrodes de fer, acier, aluminium et platine est faible [114].

En dernier lieu, les différents phénomènes intervenant suite à la création de la décharge électrique sont plus ou moins efficaces sur les bactéries. Les résultats montrent que la variation de pression, la création de cavitation par l'onde de choc et la radiation résultant de l'étincelle générant l'onde de choc influent significativement sur la diminution de la viabilité des microorganismes. La décharge électrique produit de la lumière visible intense et des UV qui peuvent contribuer à la mort des microorganismes. L'effet bactéricide des ondes de choc dépend de différents paramètres (radiation, cavitation, nombre d'impulsions, phase de croissance des microorganismes) qui peuvent varier en fonction de la souche [97]. Dans le cas des arcs, les bactéries sont majoritairement endommagées par les ondes de choc et les radiations UV [101]. Cependant, il peut y avoir des phénomènes complémentaires qui permettent d'augmenter l'efficacité en fonctionnant en symbiose. Par exemple, les cavitations ultrasoniques augmentent les performances biocides des UV [112]. Enfin, il semblerait que l'amplitude de pression de l'onde de choc appliquée n'est pas un facteur significatif pour l'efficacité [99,115]. Mais, le choc acoustique et l'onde de choc générés facilitent le mélange de l'eau à traiter et délivrent les espèces chimiques réactives dans tout le système à traiter [102].

En conclusion, certains phénomènes produits par la décharge électrique dans l'eau vont être majoritairement responsables de la mortalité des microorganismes, comme les UV et les espèces chimiques réactives. Cependant, les autres phénomènes minoritaires ou inefficaces vont permettre d'améliorer cette efficacité en permettant notamment une meilleure diffusion des espèces chimiques créées.

Il est difficile d'isoler les différents phénomènes les uns des autres afin de connaître leurs effets respectifs sur les bactéries. Cependant, l'effet de chaque phénomène pris individuellement est connu.

Effet de la pression

Pour caractériser l'effet de l'onde de pression sur les bactéries, une observation avec un microscope électronique est effectuée par María Prieto-Calvo *et al.* en 2014. Les résultats montrent que plusieurs modifications structurales ou moléculaires apparaissent après le traitement par une forte pression hydrostatique (300 et 600 MPa). Un gonflement de la cellule, une altération de la membrane, une dénaturation du matériel génétique et des protéines ainsi qu'un relargage des composés intracellulaires sont observés. Il a été confirmé par l'utilisation de l'iodure de propidium que les membranes externes et internes sont modifiées par le traitement [98].

D'autres études ont porté sur l'effet de la pression sur les bactéries en prenant en considération leur phase de croissance ainsi que la forme sous laquelle elles se trouvent (végétatives ou sporulées). En phase exponentielle de croissance, la mortalité des bactéries est due à une perte de l'intégrité membranaire. Si les bactéries sont soumises aux mêmes

conditions de pression alors qu'elles se trouvent en phase stationnaire, l'intégrité de la membrane est également affectée. Cependant, la perméabilisation de la membrane est réversible pour certaines souches. Lorsque la pression n'est plus appliquée sur la bactérie, cette dernière redevient imperméable. Par conséquent, le mécanisme responsable de la mort des bactéries sous forme stationnaire est plus compliqué. Il est supposé que lorsque la membrane retrouve son état initial, la bactérie a perdu des fonctions vitales comme celles concernant les flux d'ions ou la conservation de l'énergie. De plus, la proportion entre les acides gras insaturés et saturés modifie la fluidité de la membrane. Plus la membrane est fluide, plus la résistance à la pression est importante [109,116].

Enfin, avant l'inactivation, la pression hydrostatique initie la germination des spores de *Bacillus pumilus*. La réponse des spores face à la pression est indépendante du type de contenant ou de la méthode utilisée pour transmettre la pression. Sous pression hydrostatique, la physiologie des spores change. Pour *Bacillus pumilus*, la transformation semble se produire à partir de 500 atmosphères : l'activité métabolique commence et le procédé devient irréversible [117].

Effet de la cavitation

Le phénomène de cavitation

Le phénomène de cavitation a été caractérisé par Sirs John Thornycroft et Sidney Barnaby en 1985 avec l'observation des hélices d'un bateau dont l'usure était très rapide ce qui rendait ces dernières inefficaces. En bout de pale, la vitesse est tellement importante que la pression chute énormément. Les molécules d'eau vont ainsi se dissiper et des microbulles vont apparaître. Le diagramme de changement d'état de l'eau (Figure 31) permet de comprendre ces changements d'état.

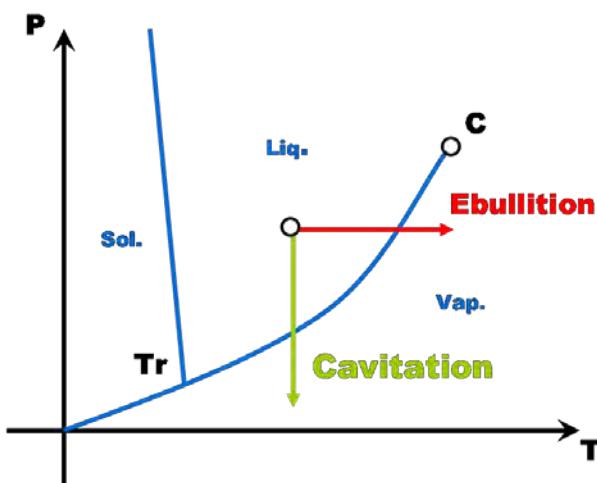


Figure 31 : Diagramme de changement d'état de l'eau avec en abscisse la température (T) et en ordonnée la pression (P). Tr désigne le point triple et C, le point critique.

Une fois les bulles formées, elles vont s'effondrer sur elles-mêmes en libérant localement beaucoup d'énergie. Cet effondrement cavitationnel à proximité d'un métal va conduire *in fine* à son érosion [118]. La Figure 32 représente l'effondrement de la bulle d'eau.

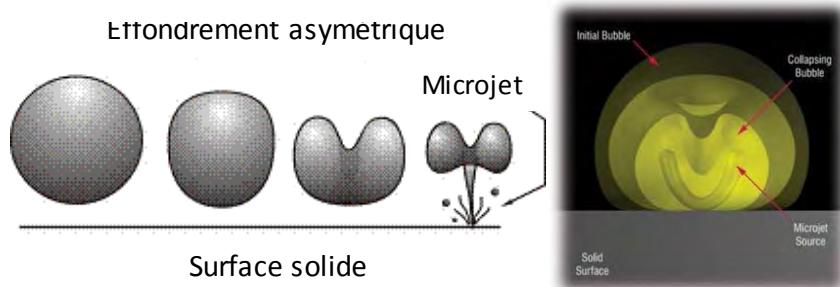


Figure 32 : Phénomène de cavitation d'une bulle d'eau, d'après [119].

Il existe deux manières de créer de la cavitation : avec la circulation d'un fluide (cavitation hydrodynamique) ou avec les ultrasons (cavitation acoustique). Dans le cas de la décharge électrique, nous nous rapprochons d'une cavitation de type acoustique. L'effet de ce type de cavitation sur les bactéries va être présenté par la suite.

Effet de la cavitation sur les bactéries

En solution aqueuse, le phénomène de cavitation conduit à la création de contraintes de cisaillement importantes. Ces dernières vont venir endommager la paroi des cellules des microorganismes en créant des cassures au niveau des liaisons chimiques présentes dans la paroi et la membrane des cellules. Ces dommages vont conduire à la libération des composés intracellulaires, des enzymes, des polysaccharides et des polymères dans l'environnement [120]. En plus des modifications structurales des cellules induites directement par la cavitation, des effets secondaires peuvent expliquer l'effet bactéricide de ce type de phénomène. Localement, une augmentation de la température (de l'ordre de 5000 K) pendant quelques microsecondes ainsi que de la pression (~ 500 atm) conduisent à la production de radicaux libres ($\text{HO}\cdot$, $\text{HO}_2\cdot$, $\text{H}\cdot$ et $\text{O}\cdot$) [15,104,121]. Suite à la production de cavitation acoustique, les effets physiques, mécaniques et chimiques inactivent les bactéries et permettent également leur désagglomération. Les différences de pression au sein du fluide issues de l'éclatement des bulles conduisent à des dommages aux niveaux des bactéries en créant des cassures au niveau des liaisons chimiques. Cependant, pour avoir un effet, il faut que ce gradient se trouve à proximité des parois cellulaires. Les forces de cisaillement induites par une température élevée localement surviennent à l'intérieur des bactéries et peuvent mener à la modification de la paroi cellulaire, une perte du matériel cellulaire et une perturbation de la synthèse protéique. Le gradient de pression et les forces de cisaillement sont très localisés et il faut que les cellules se trouvent à proximité de ces phénomènes pour qu'elles soient éliminées. Un dernier phénomène qui peut se diffuser à travers l'échantillon est l'oxydation chimique avec la production de radicaux libres très oxydants. Ces radicaux

agissent au niveau de la paroi des bactéries en modifiant les structures chimiques jusqu'à affaiblir la paroi au point de la désintégrer [15,106,119].

Certaines hypothèses laissent entendre que la cavitation permettrait d'augmenter l'efficacité des radicaux libres en perméabilisant la paroi bactérienne. Les radicaux pourraient ainsi plus facilement pénétrer dans l'espace intracellulaire et interagir avec les biomolécules [106]. La Figure 33 résume les différents phénomènes qui viennent d'être exposés.

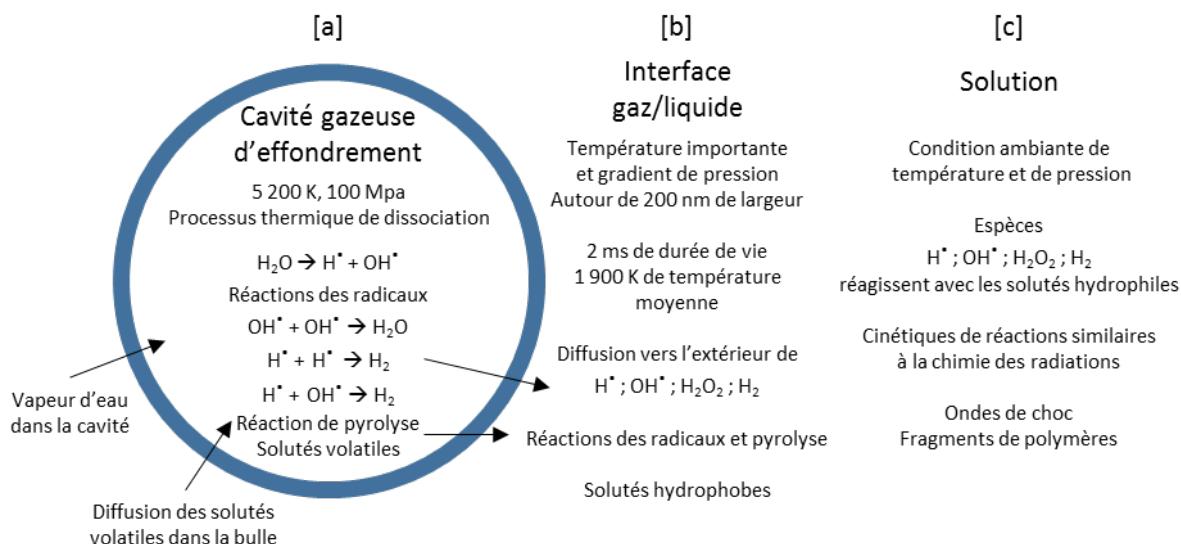


Figure 33 : Représentation des différents phénomènes apparaissant suite au phénomène de cavitation, d'après [15].

Effet des UV

Les rayonnements ultraviolets (UV)

Les UV ont été découverts en 1801 par le physicien allemand Johann Wilhelm Ritter. Les rayonnements UV sont des rayonnements non-ionisants et électromagnétiques. Leur longueur d'onde se situe juste en dessous de celle de la lumière visible et particulièrement de celle du violet, d'où le nom donné, ultraviolet. Il existe différentes catégories : les UV-A, les UV-B et les UV-C. La distinction entre ces trois types de rayonnement se fait au niveau de la longueur d'onde :

- UV-A : 400-315 nm
- UV-B : 315-280 nm
- UV-C : 280-100 nm.

Plus la longueur d'onde est faible, plus la fréquence du rayonnement est importante et moins les UV vont être pénétrants. Ces paramètres déterminent la nocivité du rayonnement, les UV-C sont plus nocifs que les UV-B qui sont plus nocifs que les UV-A. En effet, plus la longueur d'onde est faible, plus le rayonnement est énergétique, comme le montre la relation de Planck-Einstein (équation 4).

$$E = h \cdot v$$

(équation 4)

Avec E : énergie de photon en Joule

h : constante de Planck en J.s

v : fréquence de l'onde électromagnétique en Hertz

Effet des UV sur les bactéries

L'application de rayonnements UV sur des cellules a plusieurs conséquences. Tout d'abord, une réduction de la croissance est observée. Des dommages au niveau des protéines, des lipides, de l'ADN, une réduction de la synthèse de l'Adénosine TriPhosphate (ATP) et de l'activité nitrogénase expliquent cette constatation. Il peut également apparaître de nouvelles liaisons entre l'ADN et l'Acide RiboNucléique messager (ARN_m) mais également entre l'ADN et une protéine [111,122].

Les longueurs d'onde émises lors de la création d'une décharge électrique dans l'eau se trouvent dans la catégorie des UV-C. Le principal effet de ce type de rayonnement est la création de modifications au niveau de l'ADN qui peuvent conduire à la mort bactérienne ou à des mutations. Les UV vont exciter les électrons de l'ADN, notamment, et conduire à la formation de liaisons entre les pyrimidines (principalement les thymines). Ces dimères de pyrimidine vont changer la structure de l'ADN au sein de la cellule ce qui peut perturber sa réplication. Les cellules vont essayer de réparer ce mésappariement avant la réplication mais ce mécanisme peut avoir comme conséquence la création de mutation. Au moment de la réplication, si la mutation apparaît sur un gène codant pour une protéine jouant un rôle dans la survie de la cellule, cette modification peut être létale [123,124].

Enfin, les UV induisent la production d'espèces réactives par interaction avec les molécules de l'eau, constituant principale des bactéries [79].

Effet des espèces réactives de l'oxygène (ROS)

Il est important de rappeler que les ROS se trouvent naturellement présentes dans les bactéries. En effet, les bactéries aérobies utilisent l'oxygène pour leur respiration ou l'oxydation des nutriments pour obtenir de l'énergie. Les ROS sont nécessaires dans de nombreuses fonctions physiologiques que ce soit au sein de la cellule (l'apoptose, l'expression des gènes et l'activation des cascades de signalisation) ou pour se défendre contre des attaques extérieures en relargant ces espèces dans le milieu. Il est cependant vital de garder un équilibre. En effet, une trop forte concentration en ROS cause un stress oxydatif et a des effets létaux. Le stress oxydatif survient quand la quantité d'agents oxydants est supérieure aux agents non-oxydants. Cependant, la cellule bactérienne possède des biomolécules lui permettant d'inhiber l'action des ROS : les enzymes comme la catalase et la superoxyde dismutase, de plus petites molécules comme la thiorédoxine ou la glutarédoxine et des molécules comme le glutathion. La réponse au stress oxydatif est contrôlée par deux régulateurs de transcription principaux (OxyR et SoxRS) [125].

Définition des ROS

Avant de voir les effets des ROS sur les macromolécules, il est important de comprendre ce que sont ces espèces. Pour cela, il faut se pencher sur l'organisation des électrons dans les orbitales de l'atome d'oxygène. Cet atome possède 8 électrons et a la capacité de se lier à d'autres atomes en créant des liaisons covalentes. L'oxygène peut partager au maximum deux électrons avec un autre atome pour créer ces liaisons. Cependant, il peut arriver que lors d'un apport d'énergie important ces liaisons soient rompues. La Figure 34 montre les différents états dans lequel l'oxygène peut se trouver. Les trois molécules de droite sont des ROS. Dans ces configurations, la molécule n'est pas stable. En effet, le nombre d'électrons dans ses couches (représenté par une flèche) est différent de celui de l'état stable ou alors les électrons ne remplissent pas au maximum les cases quantiques (représentées par un trait horizontal). Les molécules cherchent toujours à revenir vers leur niveau d'énergie le plus bas et donc le plus stable. Par conséquent, les ROS sont très réactives et vont interagir avec les molécules présentes dans leur environnement afin de retrouver un état stable [126]. Pour ce faire, les radicaux libres vont venir arracher un électron à une molécule stable qui se trouve à proximité. La molécule qui vient de perdre un électron va à son tour se trouver dans un état radicalaire ce qui conduit à des réactions en chaîne. Quand le procédé est lancé, il peut s'en suivre des réactions en cascade conduisant à la désintégration des cellules [125].

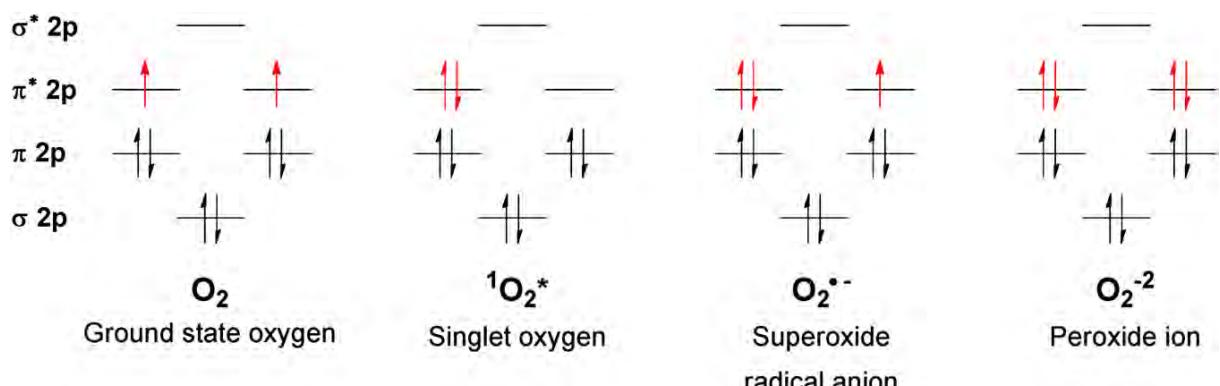


Figure 34 : Répartition des électrons de l'oxygène en fonction de son état dans les différentes couches électroniques, d'après [126].

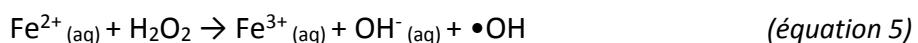
Effet des ROS sur les bactéries

De nombreuses études se sont portées sur l'effet des ROS sur les bactéries. Ces espèces chimiques, qui sont créées lors d'un apport d'énergie très important (cavitation, forte chaleur, pression ou rayonnement), ont un effet bactéricide important de par le caractère oxydant des espèces créées.

Il a été prouvé que la présence de ROS, dans l'environnement de cellules ou au sein des cellules, endommage l'ensemble des biomolécules des membranes ou du cytoplasme comme les protéines, les lipides, l'ADN ou l'ARN en les oxydant [122]. Si le nombre de radicaux qui interagit avec une biomolécule est important, cette dernière peut devenir non-fonctionnelle. Les quatre radicaux principaux sont l'ion superoxyde ($O_2^{\bullet-}$), le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2),

le radical hydroxyle ($\bullet\text{OH}$) et l'oxygène singulet ($^1\text{O}_2$) mais ils ont un effet cinétique propre. L'ion superoxyde et le peroxyde d'hydrogène sont moins réactifs que le radical hydroxyle ou que l'oxygène singulet. Les deux derniers radicaux ne peuvent pas être inactivés par des enzymes, ce qui les rend très toxiques [127,128].

L'un des effets de ces espèces au niveau des membranes biologiques est la peroxydation des lipides qui fait partie des mécanismes majeurs induit par l'oxydation des membranes biologiques. La conséquence de cette modification est la fluidisation de la membrane qui va modifier les propriétés de cette dernière et peut conduire à la rupture des liaisons avec les protéines membranaires. Le mécanisme permettant l'oxydation des lipides est catalysé par les ions Fer dans une réaction similaire à la réaction de Fenton (équation 5) avec le clivage de H_2O_2 (espèce primaire) en $\bullet\text{OH}$ (espèce secondaire) par le Fer ionique. Ensuite, le $\bullet\text{OH}$ va venir arracher des atomes d'oxygènes aux lipides [129]. Ces espèces réactives vont également interagir avec les protéines membranaires ou cytoplasmiques et conduire à des mécanismes type réticulation mais également avec l'ADN en provoquant la scission de ce dernier [128,130].



Les stress oxydatifs n'apparaissent pas si une seule espèce primaire est présente dans un système biologique, même à des concentrations élevées. Pour développer des effets délétères, une espèce primaire réagit avec une autre ou un ion métallique ce qui donne des espèces secondaires hautement réactives [129].

1.3.4. Comparaison avec d'autres techniques utilisant des décharges électriques

L'application de décharges électriques peut se faire de différentes manières. Elle permet notamment de créer des décharges dites corona. Les décharges de type corona se caractérisent par un champ électrique local très intense mais insuffisant pour provoquer un claquage électrique entre l'électrode au potentiel et une autre électrode. L'application de ce type de décharge provoque l'ionisation du milieu au voisinage de l'électrode au potentiel. Il y a création d'un plasma entre les deux électrodes. La conséquence de ce type de décharge est également de créer des espèces réactives type ROS.

Des études se sont portées sur l'effet de ce type de décharges sur les microorganismes. La publication de Dezest *et al.* montre que la création de champs électriques très intenses peut avoir des conséquences sur le potentiel membranaire d'*Escherichia coli* ce qui va modifier la forme de la bactérie et conduire à la création de pores au niveau de la membrane. La mort des bactéries peut être ainsi expliquée par la perte à travers la membrane de composants indispensables à la survie de la cellule ou à la modification de gradients chimiques. Il est également démontré que des espèces réactives sont créées et peuvent venir oxyder les protéines de la bactérie. La composition du gaz employé pour créer le plasma joue un rôle important dans l'efficacité bactéricide de par la nature et la concentration des espèces créées [131]. Dans ce cas, les décharges ne sont pas délivrées dans l'eau.

Une autre publication s'est intéressée à l'effet des décharges corona dans l'eau. Les essais ont été menés à la fois sur la forme végétative et la forme sporulée de *Bacillus subtilis* var. *niger*. L'étude a montré que les spores sont plus résistantes mais peuvent être éliminées par le biais de cette technique. Ils ont prouvé que la création d' H_2O_2 est en partie responsable de la

viabilité des bactéries. Ce phénomène est encore efficace même une fois le traitement terminé. Ils ont également montré que des protéines sont sous- et surexprimées après le traitement. Les protéines sous-exprimées sont impliquées dans la production d'ADN et celles surexprimées sont des protéines de réponse à un choc thermique. Un autre phénomène est également identifié : les ondes de choc qui peuvent également jouer un rôle dans l'éradication des spores par cette technique [132].

En conclusion, en fonction du type de plasma généré les espèces créées sont différentes et l'efficacité également. La manière de délivrer la décharge est également un critère déterminant. Enfin, la souche étudiée ainsi que la forme sous laquelle elle se trouve est également importante.

1.3.5. Présentation du dispositif expérimental

Le générateur développé dans le cadre de cette thèse crée également des décharges électriques dans l'eau mais avec la création d'un arc. La tension délivrée par le générateur est d'environ 120 kV. La génération de la forte tension n'utilise pas la même technologie que pour les faisceaux d'électrons. Dans ce cas, un générateur de Marx est employé. Le principe de fonctionnement de cette technologie est de charger un certain nombre de condensateurs (n) en parallèle à une tension V par le biais d'une alimentation haute tension. Ensuite, ces condensateurs vont être brusquement déchargés en série grâce à l'utilisation d'éclateurs à air (même principe de fonctionnement que l'éclateur à gaz du générateur de faisceau d'électrons). En sortie du générateur, la valeur optimale obtenue est de $n \cdot V$. C'est à ce niveau que la suspension bactérienne se trouve. La Figure 35 résume le principe d'un générateur de Marx.

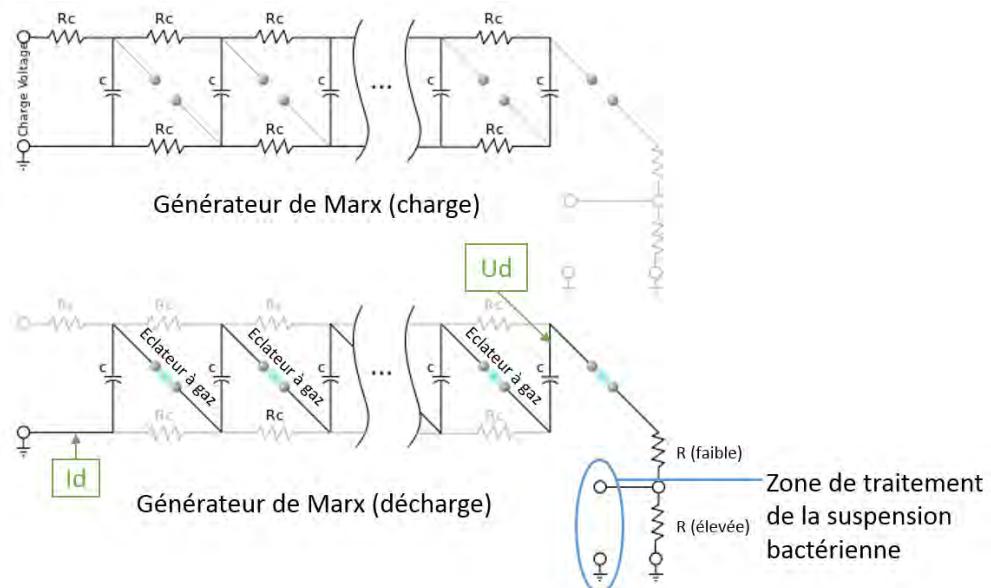


Figure 35 : Principe d'un générateur de Marx.

La première étape est de charger en parallèle tous les condensateurs, dans notre cas 5 condensateurs de $0,2 \mu\text{F}$, 40 kV. Quand la tension atteint le niveau de claquage de l'éclateur à gaz, les condensateurs se déchargent en série et la valeur des tensions se somme. Dans notre cas, le Marx utilisé nous permet de multiplier par 5 la tension en entrée.

Les autres caractéristiques de l'équipement sont un courant de 8,5 kA, une fréquence de répétition des impulsions de 10 Hz et un signal amorti sur 30 μ s avec une période de 3,3 μ s par impulsion. La distance inter-electrode est de 2 mm. Une photo du dispositif expérimental est présentée en Figure 36.

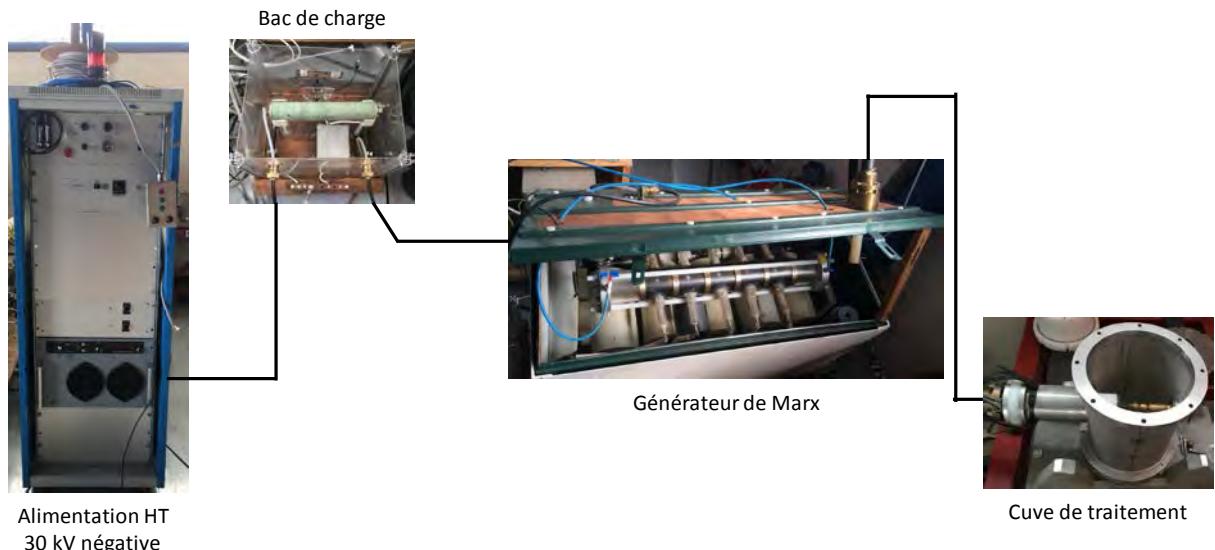


Figure 36 : Photo de l'équipement de décontamination de l'eau par décharge électrique.

1.4. Conclusion du chapitre

Lorsqu'une évaluation de l'efficacité bactéricide d'une nouvelle technologie doit être faite, il faut la réaliser à la fois sur des souches Gram négative et Gram positive et de préférence cohérentes avec la technologie employée et avec l'application finale. Dans notre étude, nous avons choisi les souches *Escherichia coli* et *Bacillus pumilus*.

Les deux technologies étudiées, les faisceaux d'électrons et les décharges électriques, ont des approches de stérilisation/décontamination complètement différentes. Les faisceaux d'électrons ne sont pas très pénétrants et ne peuvent donc pas être utilisés sur des gros volumes pour traiter de l'eau souillée, par exemple. Les applications possibles, à ces énergies, doivent donc se cantonner à de la décontamination de surfaces ou de produits ayant une épaisseur relativement faible (de la centaine de micromètres pour des plastiques). Quant aux décharges électriques, leur application dans l'eau permet la création de différents phénomènes (pression, cavitation, UV et ROS) qui conjointement permettent d'augmenter l'efficacité du traitement. Il est donc choisi d'utiliser ce type de technologie pour éliminer des bactéries dans un milieu liquide où ces phénomènes pourront, pour certains, diffuser dans le milieu et se combiner pour améliorer l'efficacité.

Chapitre 2. Matériels et méthodes

2.1. Mesure des signaux de courant et de tension

Avant de commencer les essais sur les bactéries, il est important de connaître l'énergie et donc l'allure des signaux de courant et de tension délivrées par les deux générateurs.

Pour la mesure de courant, un capteur de Rogowski est utilisé. Il est constitué d'une bobine sans noyau magnétique placée autour de la zone de passage du faisceau d'électrons ou du câble conduisant le courant vers le générateur de Marx dans le cas des décharges électriques. Le champ magnétique produit par le courant induit une tension dans la bobine qui est proportionnelle à la vitesse de variation du courant (dI/dt).

La mesure de tension pour les faisceaux d'électrons se fait à l'aide d'un diviseur capacitif. Ce dernier utilise deux capacités, une de faible valeur ($C1$) et une de forte valeur ($C2$) permettant d'obtenir un bon rapport de division pour avoir une faible tension arrivant au niveau de l'oscilloscope.

$$U2 = \frac{C1}{C1 + C2} U \quad (\text{équation 6})$$

Avec $U2$: tension mesurée à l'oscilloscope en Volt

$C1$: capacité de faible valeur en nanofarad

$C2$: capacité de forte valeur aux bornes de l'oscilloscope en nanofarad

U : tension délivrée par le générateur en Volt

Pour les décharges électriques, la mesure de tension s'effectue à l'aide d'un diviseur résistif. Le principe est le même que pour le diviseur capacitif mais il utilise des résistances pour diviser la tension.

Pour le générateur de faisceau d'électrons, les mesures de courant et de tension sont notées Id et Ud , respectivement, sur la Figure 26. L'emplacement de ces diagnostiques est indiqué par les flèches.

Pour les décharges électriques dans l'eau, il en est de même comme indiqué Figure 35.

2.2. Mesure de la dose délivrée par le faisceau d'électrons

Dans le cas de la technologie de faisceau d'électrons pulsés, une mesure de dose est effectuée afin d'évaluer l'énergie déposée lors du traitement. Les courtes impulsions et le fort courant délivré par l'équipement ne permettent pas d'employer n'importe quel moyen de dosimétrie. Des dosimètres, dits radiochromiques, ont été choisis. Le principe est que les électrons, en déposant de l'énergie dans la matière constituant les films dosimétriques, vont créer un

phénomène de réticulation. Le nombre de liaisons engendrées est proportionnel à la dose. Dans le cas de cette étude, les dosimètres DOSE READER DR 020 (Crosslinking®) ont été choisis. Les films sont constitués de polyvinylbutyral (PVB) avec du cyanure de pararosaniline qui réagit aux radiations et change la couleur des films en rose. Un spectromètre (Dose reader DR020, Crosslinking®) avec une émission dans le rouge à 635 nm et dans le vert à 565 nm est utilisé pour lire la dose après un temps d'incubation de 20 min à 37°C.

2.3. Souches étudiées

2.3.1. *Escherichia coli*

La souche d'*Escherichia coli* est issue de la collection ATCC 29425 (LGC Standards). Elle est conservée à -80°C dans 30% de glycérol. A partir de cette solution commerciale, une fraction aliquote est prélevée avec un cône de P200 et diluée dans 10 mL de milieu LB (Luria-Bertani, Sigma) dans un Erlenmeyer de 125 mL. La suspension est cultivée pendant 16 h à 37°C sous agitation 200 rpm. Des dilutions jusqu'à 10^{-7} sont faites et étalées sur boites LB Ø94 mm (Greiner bio-one) afin d'obtenir des colonies bien séparées (environ 10 par boite). Les boites sont mises à incuber 16 h à 37°C, puis, conservées à 4°C.

2.3.2. *Bacillus pumilus*

La souche de *Bacillus pumilus* est issue de la collection ATCC 27142 (LGC Standards) et se présente sous forme de spores. Elle est conservée à -80°C dans 15% de glycérol. A partir de cette solution commerciale, une fraction aliquote est prélevée avec un cône de P200 et diluée dans 10 mL de milieu LB dans un Erlenmeyer de 125 mL. La suspension est cultivée pendant 16 h à 37°C sous agitation 200 rpm. Des dilutions jusqu'à 10^{-7} sont faites et étalées sur boites LB afin d'obtenir des colonies bien séparées (environ 10 par boite). Les boites sont mises à incuber 16 h à 37°C, puis, conservées à 4°C.

2.4. Préparation des suspensions bactériennes

Les formes végétatives sont obtenues grâce à l'ensemencement d'une colonie dans 10 mL de milieu LB (Sigma) liquide sans antibiotique. La solution est mise sous agitation à 37°C et 200 rpm pendant 16 h dans un Erlenmeyer de 125 mL. Cette culture est ensuite concentrée 10 fois par centrifugation à 10 000 g pendant 5 min, puis, placée à 4°C jusqu'à son utilisation.

Pour la préparation des spores, une colonie de *Bacillus pumilus* est cultivée dans 400 mL de milieu, Difco Sporulation Medium (DSM) qui favorise le processus de sporulation. Les conditions d'incubation sont de 5 jours dans un Erlenmeyer de 2 L et à 37°C et 200 rpm. Les bactéries végétatives résiduelles sont éliminées par choc thermique à 80°C pendant 20 min. La solution de spores est centrifugée à 10 000 g pendant 5 min. Après élimination du

surgeant, le culot est repris dans de l'eau distillée stérile et la suspension conservée à 4°C jusqu'à son utilisation. Avant toute utilisation, la suspension est soumise de nouveau au choc thermique à 80°C pendant 10 min.

Tableau 3 : Composition du milieu DSM

Composé	Concentration
Difco Nutrient Broth (Difco)	8 g/L
MgSO ₄	100 mM
KCl	10%
NaOH	1 M
Ca(NO ₃) ₂	1 M
MnCl ₂	10 mM
FeSO ₄	1 mM

2.5. Caractérisation des souches

2.5.1. Courbe de croissance des bactéries

Les 100 µL de la suspension bactérienne préparée précédemment sont cultivés dans 200 mL de milieu LB et mis sous agitation à 37°C dans un Erlenmeyer de 500 mL. Une mesure de la DO_{600 nm} est effectuée toutes les 30 min jusqu'à atteindre la phase stationnaire. La vitesse spécifique maximale de croissance, $\mu_{x\max}$, est déterminée en traçant le logarithme népérien de la DO_{600 nm} en fonction du temps (en heure). La valeur de la pente de la droite obtenue, au moment de la phase exponentielle de croissance, correspond à $\mu_{x\max}$. Ensuite, la détermination du temps de génération, G, est obtenue via la formule suivante :

$$G = \frac{\ln(2)}{\mu_{x\max}} \quad (\text{équation 7})$$

Avec G : temps de génération en minute

$\mu_{x\max}$: vitesse spécifique maximale de croissance en min⁻¹

2.5.2. Germination des spores

Les 30 μL de la suspension de spores sont ajoutés à 900 μL de milieu LB à 37°C. La solution obtenue est mise dans une cuve à spectrophotomètre en PMMA (Brant®) placée à 37°C. Une mesure de $\text{DO}_{580\text{ nm}}$ est effectuée toutes les minutes avec un spectromètre Pharmacia Biotech, Novaspec II [133–135].

2.6. Evaluation de l'efficacité du traitement

2.6.1. Faisceau d'électrons

Deux types de tests sont effectués : en milieu gélosé et en milieu sec.

Avant tout dépôt, les suspensions de spores de *Bacillus pumilus* sont incubées à 80°C pendant 10 min afin d'éliminer les formes végétatives résiduelles.

Pour les tests en milieu gélosé (milieu Plate Count Agar (PCA) (norme UNE-EN ISO 4833 :2003, VWR Chemicals), 100 μL d'une suspension de *Escherichia coli* ou *Bacillus pumilus* (forme végétative et sporulée) sont étalés au centre de la boîte avec un râteau stérile (Heathrow Scientific®). La taille du dépôt est de 4 cm par 9 cm. Le faisceau d'électrons n'étant pas homogène sur l'ensemble de la fenêtre, la largeur de l'étalement permet de s'assurer d'être dans cette zone.

Pour les tests en milieu sec, sur des boîtes de Pétri stériles et vides de diamètre 90 mm (greiner bio-one), 3 spots de 10 μL de suspension de *Bacillus pumilus* sporulé sont déposés au centre. Les boîtes sont mises à sécher sous la hotte à flux laminaire.

La Figure 37 résume les protocoles utilisés avant le traitement des boîtes.

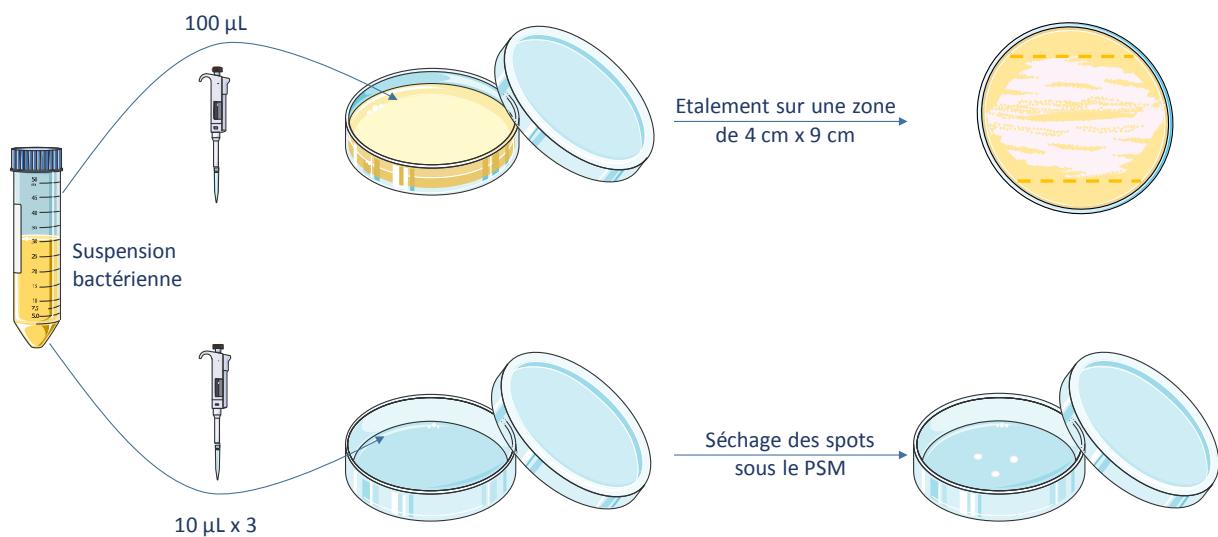


Figure 37 : Schématisation du protocole d'évaluation de l'efficacité du traitement par le faisceau d'électrons.

Pour les boîtes, différents traitements sont appliqués afin d'évaluer l'influence de la distance à la fenêtre d'extraction des électrons et celle de la fréquence de répétition des impulsions.

Suite au traitement, afin de récupérer les bactéries, les boîtes gélosées sont grattées avec un râteau stérile (Heathrow Scientific®) après l'ajout de 1 mL d'eau PPi (Pour Préparation injectable) (action répétée 4 fois) et les spots secs sont grattés avec un coton tige humide, mis dans les tubes de dilution de 55 mL (Carl Roth®) contenant 10 mL d'eau PPi stérile puis vortexés à 25-30 Hz pendant quelques secondes.

Des dilutions au 10^{ème} sont effectuées et 100 µL de ces dilutions sont déposés sur les boîtes de Pétri remplies de Plate Count Agar (PCA) (norme UNE-EN ISO 4833 :2003, VWR Chemicals).

Les boîtes sont retournées et mises à l'incubateur à 37°C pendant 16 h. Le lendemain, le nombre de colonies sur boîtes est déterminé.

Le calcul de la diminution logarithmique se fait en utilisant la formule suivante :

$$\text{Diminution logarithmique} = \log_{10}\left(\frac{N_0}{N}\right) \quad (\text{équation 8})$$

Avec N_0 : concentration initiale en UFC/mL

N : concentration finale en UFC/mL

En parallèle, des mesures pour évaluer la dose délivrée par le générateur sont effectuées à l'aide des films 20 µm Crosslinking AB.

2.6.2. Décharges électriques

La solution de bactérie de *Bacillus pumilus* sporulée est portée à 80°C pendant 10 min. En fonction de l'expérience, un volume de cette solution est mélangé à 8 L d'eau stérile.

Pour *Escherichia coli* et la forme végétative de *Bacillus pumilus*, des boites de Pétri sont incubées à 37°C pendant 16 h après dépôt de 100 µL de suspension et étalement avec un râteau stérile (Heathrow Scientific®). Deux boites sont utilisées pour préparer la suspension par grattage de la surface avec 4 x 1 mL d'eau PPi.

L'espacement inter-électrode est réglé à 2 mm avec une cale. Le courant de l'alimentation haute tension est réglé sur 238 mA afin d'avoir une fréquence de répétition des impulsions de 10 Hz.

Le calcul de la diminution logarithmique se fait en utilisant la même formule que celle présentée ci-dessus (équation 8).

Dénombrement

Pour cette technologie, il a d'abord été évalué l'efficacité globale de l'ensemble des paramètres induits par les décharges électriques dans l'eau (UV, espèces réactives, température, onde de choc).

A travers les essais, différents types de solution sont utilisés :

- Eau distillée filtrée à 0,2 µm
- Eau du robinet laissée 24 h à température ambiante pour éliminer les composés chlorés actifs, puis, filtrée à 0,2 µm.

Dans un second temps, les deux paramètres principalement responsables de l'inactivation bactérienne sont testés selon deux approches :

- Pour les espèces réactives, une solution contenant du pyruvate (Gibco™) 1 mM (dilution au 100^{ème}) est préparée dans le but de voir la différence d'efficacité par rapport à une solution d'eau distillée seule. Le pyruvate est connu pour son rôle de protection contre les radicaux d'oxygène et son effet antioxydant [136]. L'approche est donc de voir l'efficacité du traitement quand l'effet bactéricide des espèces réactives est limité.
- Pour les UV, une solution de bactéries à DO_{600 nm} 0,05 est déposée dans une cuvette en Quartz de dimension effective (qui voit le faisceau) 3,85 cm x 1 cm x 1 cm. En parallèle, une mesure de la quantité de photons émise est effectuée en utilisant une solution de 0,006 M d'actinomètre (voir protocole ci-dessous 'Mesure de la quantité d'UV émise'). Le chemin que peuvent parcourir les UV dans cette solution est de 2 cm, d'après Edebo *et al.* [100]. Dans notre cas, les UV qui vont traverser la cuvette ne vont parcourir que 1 cm (largeur de la cuvette). Dans le but de capter un maximum d'UV émis, il a été décidé de placer, à l'opposé de l'arrivée des UV dans la cuvette, du papier aluminium (Figure 38). En effet, ce matériau a un pouvoir réflecteur vis-à-vis des UV

important (73-90%) [137,138]. Une partie des UV va donc être réfléchie dans la cuvette ce qui améliore ainsi la quantité d'UV captée par la solution. Pour être dans les mêmes conditions pour la cuve contenant la solution bactérienne du papier d'aluminium est également ajouté.

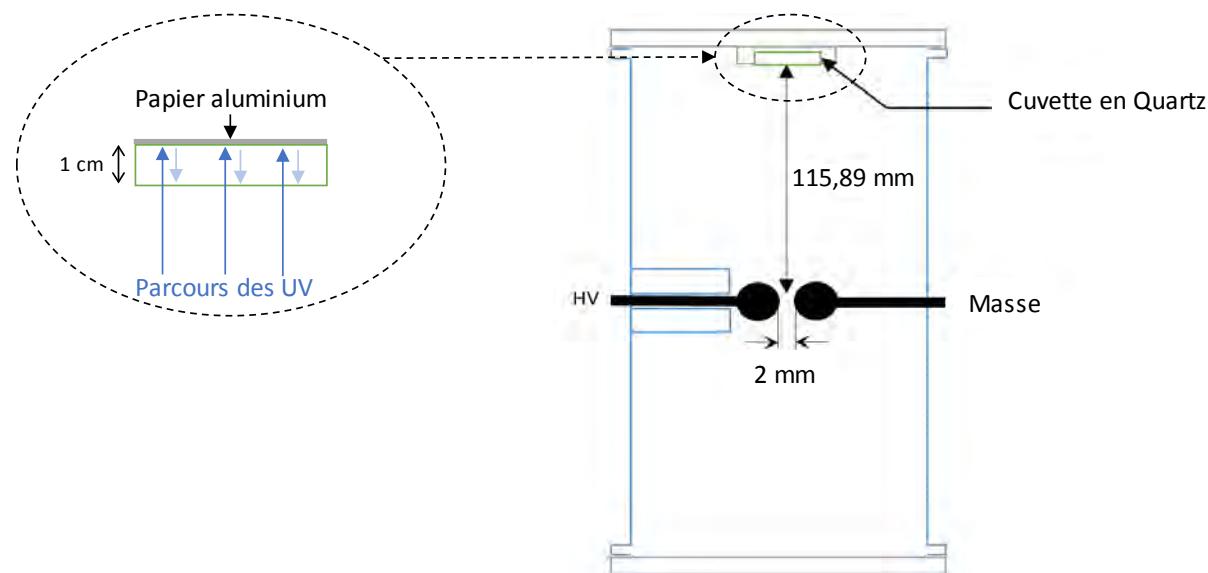


Figure 38 : Schématisation de l'expérience avec l'utilisation du papier d'aluminium pour réfléchir les UV émis.

Des tubes à essais de 2,5 mL sont bouchés avec du coton cardé et du papier aluminium. Ils sont mis à l'étuve à 180°C pendant une heure. Quand les tubes sont redescendus à température ambiante, 900 µL d'eau PPi stérile sont ajoutés.

Des dilutions au 10^{ème} sont effectuées et 100 µL de ces dilutions sont déposés sur les boîtes de Pétri. Des boîtes de Pétri remplies de PCA (norme UNE-EN ISO 4833 : 2003, VWR Chemicals) sont utilisées.

Les boîtes sont retournées et mises à l'incubateur à 37°C pendant 16 h. Le lendemain, le nombre de colonies sur boîtes est compté.

Mesure de la quantité de peroxyde d'hydrogène créée

Différents milieux vont être testés pour déterminer l'impact du milieu sur la quantité de peroxyde d'hydrogène présente dans la solution. Les conditions des essais sont l'application de 500 impulsions à 10 Hz dans un volume de 8 L pour l'ensemble des essais. Il est décidé de tester la quantité de peroxyde d'hydrogène comme indicateur des espèces réactives de l'oxygène. En effet, l'expérience se faisant à l'entreprise, et donc à deux heures du laboratoire pour l'analyse, l'espèce la plus stable a été choisie (Figure 39). L'acheminement se fait au froid afin de limiter la dégradation éventuelle de l'H₂O₂.

Radical libre	Représentation	Temps de demi-vie(s)
Superoxyde	O_2^-	10^{-6}
Radical hydroxyle	$\cdot OH$	10^{-9}
Peroxyde d'hydrogène	$H_2 O_2$	Stable
Radical peroxyde	$RCOO\cdot$	Secondes
Hydroperoxyde organique	$RCOOH$	Stable
Oxygène singulet	1O_2	10^{-6}
Ozone	O_3	Secondes

Figure 39 : Temps de demi-vie d'espèces réactives de l'oxygène, d'après [139].

Les milieux choisis pour les essais sont l'eau du robinet, qui est l'eau qui se trouve dans les tours aéroréfrigérantes, l'eau distillée, l'eau distillée avec du pyruvate à 1 mM (le pyruvate permet de piéger les espèces réactives) et le surnageant de la suspension se trouvant dans la cuvette en Quartz.

Le kit de dosage du peroxyde d'hydrogène utilisé est le Fluorimetric Hydrogen Peroxide Assay Kit (Sigma Aldrich). Il permet le dosage de peroxyde d'hydrogène pour une gamme comprise entre 0 et 10 μM . Une courbe d'étalonnage est réalisée en parallèle des milieux à tester.

La lecture des résultats se fait sur une plaque 96 puits au CLARIOstar (BMG LABTECH).

Les témoins, essais et standards sont analysés en triplicat.

Dans un premier temps, la gamme est préparée à partir d'une solution de H_2O_2 à 20 mM. Pour préparer cette solution, 22,7 μL de solution à 3% (0,88 M) sont mis dans 977 μL de tampon. Les concentrations de la gamme étalon sont les suivantes : 0 ; 0,01 ; 0,03 ; 0,1 ; 0,3 ; 1 ; 3 et 10 μM .

50 μL de chaque solution standard sont déposés par puits.

Ensuite, les échantillons sont préparés. Différentes dilutions sont effectuées afin de s'assurer d'être dans la gamme : 1/2 ; 1/5^{ème} ; 1/10^{ème} et 1/100^{ème}. Les dilutions sont effectuées directement dans les puits.

Le plan des plaques est présenté ci-dessous.

		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A		10 µM			3 µM			1 µM			0,3 µM		
	B	0,1 µM			0,03 µM			0,01 µM			0 µM		
Eau du robinet	T C	[] initiale			[] initiale/2			[] initiale/5			[] initiale/10		
	E D	[] initiale			[] initiale/2			[] initiale/5			[] initiale/10		
Eau distillée	T E	[] initiale			[] initiale/2			[] initiale/5			[] initiale/10		
	E F	[] initiale			[] initiale/2			[] initiale/5			[] initiale/10		
Eau distillée et pyruvate 1 mM	T G	[] initiale			[] initiale/2			[] initiale/5			[] initiale/10		
	E H	[] initiale			[] initiale/2			[] initiale/5			[] initiale/10		

		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
Surnageant suspension UV	T A	[] initiale			[] initiale/2			[] initiale/5			[] initiale/10		
	E B	[] initiale			[] initiale/2			[] initiale/5			[] initiale/10		
	T C	[] initiale/100			[] initiale/100			[] initiale/100			[] initiale/100		
	E D	[] initiale/100			[] initiale/100			[] initiale/100			[] initiale/100		
		Suspension surnageant UV			Eau du robinet			Eau distillée			Eau distillée + pyruvate 1 mM		

Gamme de standards
Blanc
Echantillons (T : témoin ; E : essais)

Pour finir, dans chaque puits, 50 µL du mélange de réaction sont ajoutés et mélangés au milieu à analyser. La plaque est incubée à température ambiante 30 min à l'abri de la lumière. Après incubation, l'intensité de fluorescence avec $\lambda_{\text{excitation}} = 540 \text{ nm}$ et $\lambda_{\text{émission}} = 590 \text{ nm}$ est mesurée.

Tableau 4 : Composition du mélange de réaction.

Composé	Volume
Red peroxydase à 1%	75 µL
Solution de peroxydase 20 U/mL à 4%	300 µL
Tampon à 5%	7,125 mL

La valeur du bruit de fond est celle obtenue avec le standard à 0 μM de H_2O_2 (blanc). Toutes les autres valeurs seront corrigées de cette valeur de bruit de fond.

Mesure de la quantité d'UV émise

L'oxalate de fer est préparé dans le noir. 189,27 g de $(\text{COOK})_2$ est mélangé dans 750 mL d'eau distillée pour avoir une concentration de 1,5 M et 60,83 g de FeCl_3 est mis dans 250 mL d'eau distillée pour avoir une concentration de 1,5 M. Ensuite, 3 volumes de $(\text{COOK})_2$ à 1,5 M est ajouté à 1 volume de FeCl_3 à 1,5 M. La solution est agitée vigoureusement. Le précipitât doit être dissous dans un minimum d'eau chaude et la solution mise au froid (4°C) pour cristallisation environ une heure. L'action est répétée deux fois. Les cristaux sont mis à sécher au dessicteur sur la nuit.

Différentes solutions sont préparées.

Tableau 5 : Composition de la solution A.

Composé	Quantité
Oxalate de fer	0,2947 g
Eau distillée	80 mL
Acide sulfurique 0,5 M	10 mL
Eau distillée	Qsp 100 mL

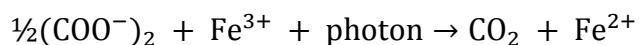
Tableau 6 : Composition de la solution B.

Composé	Quantité
1,10-phénanthroline	0,1 g
Eau distillée	100 mL

Tableau 7 : Composition de la solution C (tampon acétate).

Composé	Quantité
Acétate de sodium à 0.5 M	31,3 mL
Solution B	18,75 mL

La solution A est l'actinomètre à 0,006 M ce qui signifie que l'oxalate de fer est photosensible. L'exposition de ce composé à des photons conduit à la production de Fer II suivant la réaction suivante :



L'ajout de 1,10-phénanthroline (ou orthophenanthroline) permet de former avec le Fer II un complexe de couleur orangée dont le pic d'absorption se situe à 510 nm (Figure 40).

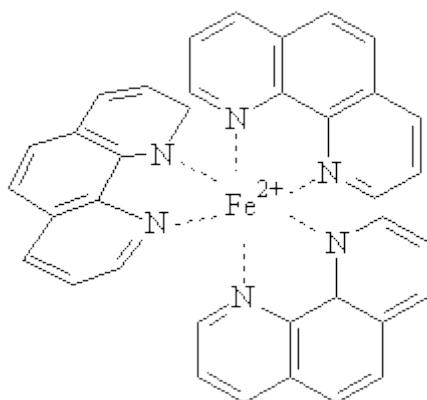


Figure 40 : Complexe entre le Fer II et 3 molécules de 1,10-phénanthroline.

La solution A est irradiée en remplissant la cuvette en Quartz. Le milieu de traitement est de l'eau du robinet, la solution A étant isolée de cette dernière. Différents nombres d'impulsions sont appliqués : 100 ; 250 ; 400 et 500 à une fréquence de 10 Hz. Entre chaque séquence de tir, 40 µL sont prélevés pour effectuer la mesure.

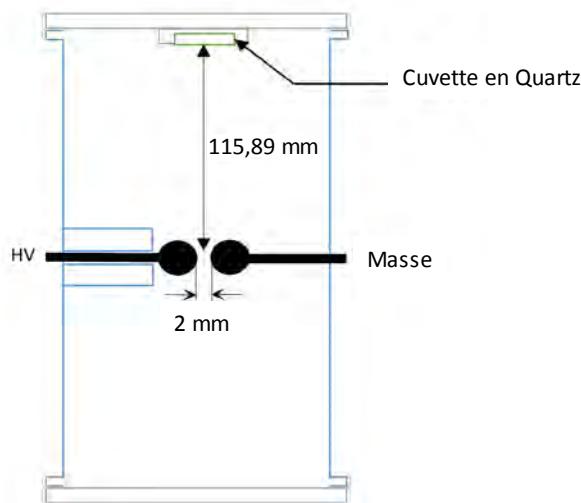


Figure 41 : Schéma de l'expérience avec le positionnement de la cuvette contenant la solution A.

Les 40 μL de la solution irradiée sont mélangés avec 40 μL de la solution B et 20 μL de la solution C. Puis, la solution est diluée dans 900 μL d'eau distillée. Après 30 min à température ambiante, l'absorbance à 510 nm est mesurée. Le blanc est constitué de la solution A non traitée [100,140].

NB : Le temps d'irradiation doit être ajusté pour ne pas avoir plus de 20% des ions fer réduit.

Afin de pouvoir connaître la quantité de Fer II produite, il est nécessaire d'établir une gamme étalon. Le sulfate d'ammonium Fer II est choisi pour réaliser cette gamme. Une solution de sulfate d'ammonium Fer II à 1 $\mu\text{mol}/\text{mL}$ est préparée. Différentes dilutions sont effectuées et 40 μL de la solution sont mélangés avec 40 μL de la solution B et 20 μL de la solution C. Puis, la solution est diluée dans 900 μL d'eau distillée. Après 30 min à température ambiante et dans le noir, l'absorbance à 510 nm est mesurée.

Le blanc est constitué de 40 μL d'eau distillée, 40 μL de solution B, 20 μL de solution C et 900 μL d'eau distillée.

2.7. Evaluation de l'efficacité en fonction de la phase de croissance après traitement par faisceaux d'électrons

Deux cultures de *Bacillus pumilus* sont réalisées dans du milieu LB :

- Phase stationnaire : culture de 16 h à 37°C sous agitation réalisée à partir de 100 μL de suspension de spores. Elle est concentrée en centrifugeant 16 mL et en les reprenant dans 0,2 mL.
- Phase exponentielle : culture jusqu'à l'obtention d'une $\text{DO}_{600\text{ nm}}$ de 0,05 (environ 3,5 h) à 37°C sous agitation réalisée à partir de 100 μL de la suspension de spores. Elle est concentrée en centrifugeant 64 mL et en les reprenant dans 0,2 mL.

La suspension est diluée afin d'obtenir une $\text{DO}_{600\text{ nm}}$ égale à 20.

Sur géloses PCA, 100 μL de suspension sont déposés.

Le traitement suivant est appliqué : 1 impulsion à 2 cm de la fenêtre d'irradiation.

La surface des boîtes est grattée à l'aide de coton tige humidifié. La solution est récupérée dans 1 mL d'eau PPI stérile. Des dilutions au 10^{ème} sont effectuées et 100 μL de ces dilutions sont déposées sur géloses PCA.

Une fois les boîtes sèches, elles sont retournées et mises à l'incubateur à 37°C pendant 16 h.

Le lendemain, la diminution logarithmique obtenue est calculée.

L'expérience est réalisée en triplicat à partir de 3 cultures différentes.

2.8. Evaluation de l'efficacité en fonction de l'état de la spore

2.8.1. Faisceaux d'électrons

Après avoir laissé la suspension de spores 10 min à 80°C, 81 µL sont mis dans des tubes Falcon® 50 mL stériles qsp 2,5 mL de milieu LB à 37°C. Deux états des spores vont être testés :

- 1) Spores directement déposées sur boite de Pétri
- 2) Spores mis à 37°C pendant 50 min jusqu'à avoir une DO_{580 nm} ~ 50% DO_{580 nm} initiale. Cette mesure de DO_{580 nm} permet de s'assurer que la germination des spores a été initiée. En effet, lors de la germination des spores, elles vont se réhydrater ce qui a certainement pour conséquence de faire baisser la densité optique du milieu à cette longueur d'onde [141,142].

Les tubes sont centrifugés et les culots resuspendus dans un volume d'eau PPi pour avoir une DO_{600 nm} de 20.

Sur des boites de Pétri stériles, 3 spots de 10 µL de suspension de *Bacillus pumilus* sporulé sont déposés.

Les boites sont laissées à sécher sous la hotte à flux laminaire.

Des géloses PCA standardisées sont utilisées (Fisherbrand™).

Pour les boites préalablement mises à sécher, les traitements suivant sont appliqués : 3 impulsions à 2 cm de la fenêtre d'irradiation et à 100 Hz. L'expérience est réalisée en triplicat à partir de 3 cultures différentes.

Une fois les boites traitées, les spots sont récupérés avec deux cotons tiges humidifiés et mis dans les tubes contenant 1 mL d'eau PPi, puis, ces derniers sont vortexés à 25-30 Hz.

Des dilutions au 10^{ème} sont effectuées et 100 µL de ces dilutions sont déposés sur géloses PCA.

Une fois les boites sèches, elles sont retournées et mises à l'incubateur à 37°C pendant 16 h.

Le lendemain, la diminution logarithmique obtenue est calculée.

L'expérience est réalisée en triplicat à partir de 3 cultures différentes.

2.8.2. Décharges électriques

A partir de la suspension de spores, des dilutions sont réalisées pour obtenir une DO_{600 nm} initiale de 1. La solution de spores de *Bacillus pumilus* est placée à 80°C pendant 10 min pour éliminer les formes végétatives, puis, mise à 37°C jusqu'à atteindre une DO_{580 nm} égale à la moitié de la DO_{580 nm} initiale. Les 30 mL de la solution sont mélangés à 8 L d'eau distillée stérile. Le traitement est ensuite appliqué : 500 impulsions à 10 Hz.

Des géloses PCA standardisées sont utilisées (Fisherbrand™).

Des dilutions au 10^{ème} sont effectuées et 100 µL de ces dilutions sont déposées sur géloses PCA.

Une fois les boites sèches, elles sont retournées et mises à l'incubateur à 37°C pendant 16 h.

Le lendemain, la diminution logarithmique obtenue est calculée.

L'expérience est réalisée en triplicat à partir de 3 cultures différentes.

2.9. Evaluation de la reprise de croissance après traitement des spores par faisceaux d'électrons

Sur des boites de Pétri stériles, 10 spots de 10 µL de suspension de *Bacillus pumilus* sporulé sont déposés.

Les boites sont laissées à sécher sous la hotte à flux laminaire. Ensuite, les traitements suivant sont appliqués : 3 impulsions à 2 cm et 100 Hz.

Une fois les boites traitées, les spots sont récupérés avec deux cotons tiges humidifiés et mis dans les tubes contenant 1 mL d'eau PPi, puis, ces derniers sont vortexés à 25-30 Hz quelques secondes. Pour les témoins, 5 µL sont mis dans 200 mL de milieu LB. Pour les boites irradiées, 1 mL de LB est mis au contact du coton tige ayant récupéré les spots, le tube est vortexé à 25-30 Hz quelques secondes et l'ensemble de la solution versée dans les 200 mL de LB.

Une mesure de DO_{600 nm} est effectuée toutes les 60 min (entre 0 et 240 min), puis, toutes les 30 min (entre 240 et 570 min) afin de déterminer quand a lieu la reprise de croissance.

2.10. Préparation des échantillons pour l'AFM

2.10.1. Principe général de l'AFM

La microscopie à force atomique (AFM) a été inventée en 1986 par Binnig, Quate et Gerber [143]. En biologie, l'intérêt de l'AFM est de réaliser des topographies de cellules à l'aide d'une pointe qui balaie la surface étudiée et également de révéler des interactions entre l'objet étudié et des molécules. L'AFM peut être utilisée pour l'étude du développement tissulaire, des métastases tumorales, des infections bactériennes et beaucoup d'autres interrogations médicales ou biotechnologiques [144]. La résolution topographique verticale de ce type d'équipement est de 0,01 nm [145].

Dans notre cas, l'AFM va permettre de faire une observation en condition native des bactéries et d'évaluer la rugosité et l'hydrophobicité de la surface des bactéries. Toutes ces caractéristiques permettent de savoir si des lésions au niveau de la paroi des bactéries sont apparues suite au traitement.

Le fonctionnement de l'AFM est basé sur l'utilisation de deux modules : un scanner piezoélectrique et un système de détection laser. Le premier module peut bouger selon trois axes : x, y et z. L'échantillon est positionné sur ce module. Le système de détection laser est composé de plusieurs parties : une source laser, un microlevier sur lequel est fixé la pointe qui va venir au contact de l'objet, une photodiode et un ordinateur. Le laser est situé en retrait du microlevier et va venir se réfléchir sur ce dernier. Un rayon est alors réfléchi vers la photodiode constituée de 4 quadrants. Lorsque la pointe, située sur le microlevier, n'est pas au contact de la surface, le laser va être réfléchi au milieu de ces 4 quadrants. Par contre, lorsque le microlevier va se déformer au contact de l'échantillon, la torsion et la flexion de ce dernier vont dévier le faisceau. La tension renvoyée par la photodiode est alors différente de celle renvoyée lorsque le faisceau se situe au centre de la photodiode. Ce sont ces variations de tension qui permettent à l'ordinateur d'établir un profil à partir des courbes obtenues [143,144]. Les Figure 42 et Figure 43 représentent une schématisation du fonctionnement de l'AFM.

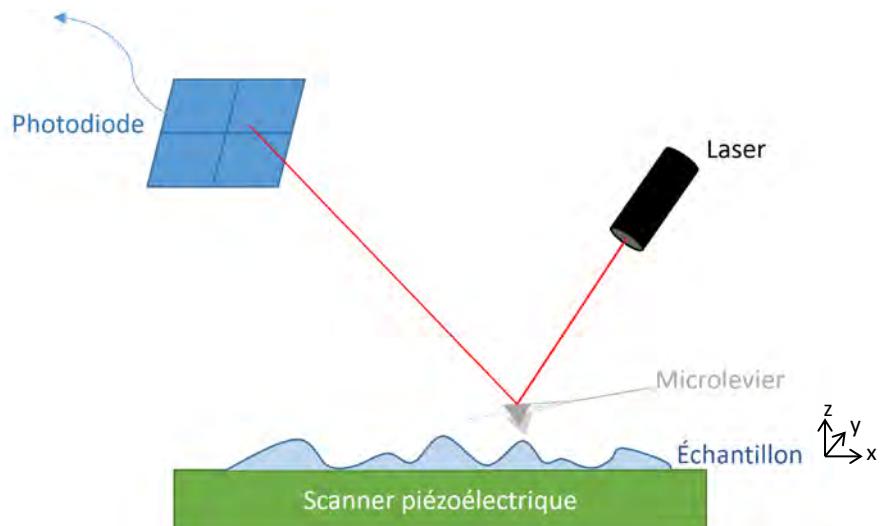


Figure 42 : Principe général de fonctionnement de l'AFM (inspiré de [143,144]).

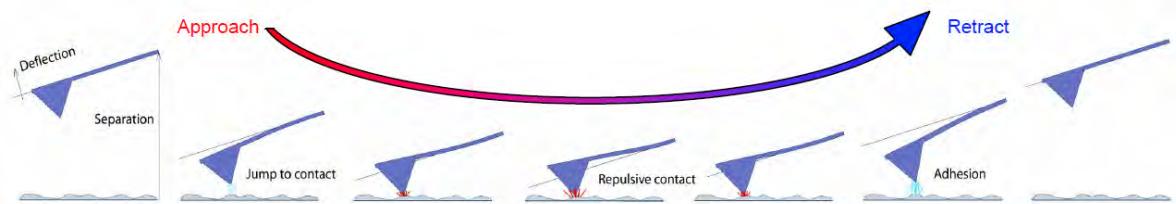


Figure 43 : Schématisation du mouvement de la pointe lors de son approche et de son éloignement de l'échantillon (JPK Instrument, Technical Note).

Les courbes obtenues permettent d'évaluer les forces d'adhésion entre la pointe et l'échantillon. C'est le scanner piezoélectrique qui va mettre l'échantillon au contact du

microlevier et également les séparer. La pointe réagit différemment en fonction de ses interactions avec l'échantillon mais également en fonction de sa position par rapport à l'objet. La Figure 44 explique les différentes parties de la courbe de force obtenue [146].

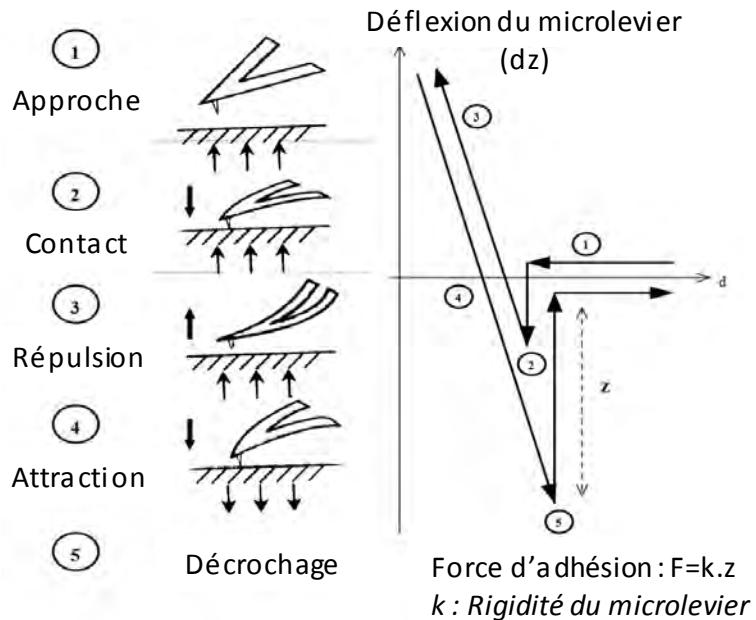


Figure 44 : Courbe de force obtenue par AFM (Biophy Research, La microscopie à force atomique (AFM)).

2.10.2. Réalisation des essais

Les lames en verre (Rogo Sampaic France) utilisées comme support sont rincées à l'éthanol 70° et séchées à l'azote comprimé pour éliminer les poussières. Elles sont ensuite placées sur un plasma de dioxygène pendant 10 min pour désinfecter et augmenter le caractère hydrophile. Les bactéries sont immobilisées pendant 1 h sur une lame de verre fonctionnalisée avec du polyéthylenimine (PEI) à 0,2% (Sigma Aldrich, France) pour permettre l'adhésion des spores. Les lames sont ensuite rincées avec de l'eau distillée et observées sous AFM. Le microlevier MLCT (Bruker, Germany) est fonctionnalisé avec du 1-dodécylmercaptane pour évaluer l'hydrophobicité. Le souffre du 1-dodécylmercaptane permet d'avoir une liaison forte avec l'or constituant la pointe.

Les mesures d'AFM sont réalisées 24 h après le traitement en mode Quantitative Imaging (QI) avec un Nanowizard III (JPK Instruments, Germany) au LAAS-CNRS (Laboratoire d'Analyse et d'Architecture des Systèmes). Ce mode permet de mesurer pour chaque pixel la position de la pointe. La force appliquée sur la pointe est constante sur toute la surface à mesurer ce qui permet d'avoir la topographie de l'objet. Au préalable, la raideur du microlevier est mesurée sur une lame de verre lavée à l'éthanol et séchée à l'azote comprimé. Sa valeur se situe autour de 0,5 N/m et la force appliquée est de 10 nN.

Les valeurs de rugosité arithmétique (nommées Ra) et d'adhésion sont mesurées à l'aide du logiciel JPKSPM Data Processing. La Ra correspond à la moyenne des valeurs absolues de la hauteur mesurée sur la longueur de base, L. Dans un premier temps, il faut définir la ligne moyenne. Elle coupe la courbe de mesure de hauteur de manière à avoir autant d'aire sous la courbe au-dessus et en dessous. Ensuite, la formule suivante est utilisée pour calculer la Ra :

$$Ra = \frac{1}{L} \int_0^L |h(x)| dx \quad (\text{équation 9})$$

Avec Ra : rugosité arithmétique en nm

L : longueur de base en nm

h(x) : hauteur en x en nm

La Figure 45 résume le calcul de la rugosité. La ligne nommée distance est également la ligne moyenne.

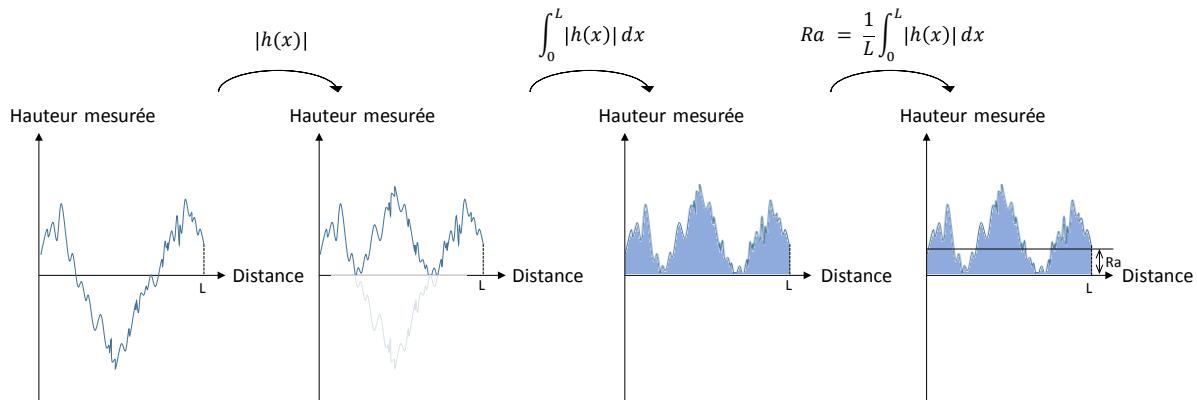


Figure 45 : Explication de la mesure de rugosité.

La mesure d'adhésion est calculée à partir des courbes de force obtenues (Figure 44).

2.11. Observation par MEB et MET

Dans cette étude, deux types de microscopie électronique sont utilisés : la microscopie électronique à balayage (MEB) et la microscopie électronique en transmission (MET). En 1942, Sworykin et Hillier conçoivent le premier MEB dit moderne car il permet d'observer un échantillon massif. Cette technique donne accès à la morphologie de l'objet et à une idée de son relief et de sa rugosité (de manière qualitative). La MET a été mise au point en 1931 par Max Knoll et Ernst Ruska. Elle permet l'observation d'échantillons fins avec comme informations la morphologie (sans relief) et la détermination d'espèces si elles ont des densités différentes [147]. Dans notre cas, ces deux technologies sont complémentaires car elles permettent, pour l'une, d'observer la paroi de la bactérie et de confirmer les

observations faites en AFM (morphologique et rugosité) et, pour l'autre, d'observer l'organisation interne de la bactérie.

2.11.1. *Principe général de la MEB et de la MET*

Contrairement à un microscope optique, la taille des objets pouvant être observée est beaucoup plus faible, de 0,1 nm à 100 µm contre 200 nm à 2 mm. L'explication vient du fait que le pouvoir séparateur, d , est proportionnel à la longueur d'onde (équation 10) et que la longueur d'onde des électrons est inférieure à 0,1 nm contrairement à celle des photons (400-800 nm). Le pouvoir séparateur désigne la distance minimale séparant deux points perçus comme distinct.

$$d = \frac{0,6\lambda}{n \sin(\alpha)} \quad (\text{équation 10})$$

Avec d : pouvoir séparateur en nm

λ : longueur d'onde en nm

n : indice de réfraction du milieu

α : angle maximum d'ouverture en radian.

La MEB et la MET ne fonctionnent pas de la même façon.

La MEB utilise un canon à électrons de plus faible énergie que la MET, dans notre cas de 10 keV. A la sortie de ce canon, il est retrouvé un jeu de lentilles condenseurs constituées de bobines ainsi qu'un déflecteur d'électrons qui vont permettre de balayer l'ensemble de l'échantillon. Ce dernier a subi au préalable un dépôt métallique afin de permettre la création d'électrons secondaires lorsque le faisceau va interagir avec l'échantillon. Le platine ou le chrome sont couramment utilisés car ils permettent de créer un nombre important d'électrons secondaires. Ces derniers vont être captés par un détecteur chargé positivement pour attirer un maximum d'électrons. A partir de l'intensité des signaux reçus, une image va être reconstituée. La MEB s'apparente donc plus à l'AFM qu'à la microscopie optique car l'image obtenue n'est pas une image reconstituée de l'échantillon.

Par contre, la MET fonctionne sur le même principe que la microscopie optique (ou photonique). Il faut considérer que les électrons vont remplacer les photons. Un canon à électron va produire un faisceau avec une certaine énergie, 80 keV dans notre cas. L'énergie est plus importante que pour le MEB car il faut que les électrons traversent l'échantillon. Le faisceau va passer par une série de lentilles condenseurs qui sont en fait des bobines parcourues par un courant électrique. Ces dernières vont produire un champ magnétique qui va dévier les électrons lors de leur passage afin de régler la taille et l'angle d'incidence du faisceau qui arrive sur l'échantillon. L'échantillon de fine épaisseur (~50 nm) va être traversé par le faisceau et conduit à travers différentes lentilles afin de grossir l'image. Un écran fluorescent est placé derrière ces lentilles et révèle l'image (comme l'œil du manipulateur qui regarde dans son microscope optique). Le contraste obtenu traduit l'absorption des électrons dans l'échantillon qui est dépendant de la structure et de la densité de la zone traversée. Plus la zone est sombre, plus sa densité est importante.

2.11.2. *Réalisation des essais*

Dans un premier temps, les bactéries ont été fixées avec 2% de glutaraldehyde à 0,1 M dans du tampon phosphate Sorensen à pH 7,2. Les échantillons sont ensuite confiés à la plateforme CMEAB (Toulouse, France) pour la préparation des échantillons avant l'observation.

Pour les observations avec le MEB, les images sont visualisées à l'aide d'un microscope QuantaTM 250 FEG (FEI, USA) avec une vitesse d'accélération des électrons de 10 keV.

Pour le calcul des volumes, les mesures sont faites sous Image J à partir des images grossies au x 5 000.

Pour les observations par MET, les échantillons sont observés avec un HT 7700 (Hitachi, USA) à 80 keV.

2.12. *Evaluation de la perméabilisation de la membrane*

Afin d'évaluer la perméabilisation de la membrane, une méthode couramment employée est l'utilisation de marqueurs fluorescents. L'avantage de cette technique est qu'elle est simple à mettre en œuvre, non invasive et très sensible. Il existe différentes molécules fluorescentes, mais la plus couramment employée est l'iodure de propidium (PI). Le PI a un poids moléculaire de 668,39 g/mol. Si la membrane est perméabilisée, le PI va pouvoir entrer dans la cellule et interagir avec les acides nucléiques. Au contact de ces derniers, son rendement quantique de fluorescence est augmenté d'un facteur 20 à 30 [148].

Pour chaque échantillon, 100 µL de suspension à DO_{600 nm} de 2 sont utilisés. Un dépôt de 10 µL de suspension sur lame PEI est effectué afin de fixer les bactéries sur la lame. Les spots sont laissés 15 min à température ambiante. Ensuite, les lames sont rincées à l'eau distillée pour éliminer les bactéries non fixées.

Les échantillons sont marqués au PI (Sigma) à 100 µM et laissés à température ambiante pendant 5 min. La lame est rincée avec de l'eau et une lamelle est déposée sur la lame. L'observation des échantillons immobilisés sur lame PEI est réalisé au microscope inversé (LEICA) à l'objectif × 100, zoom × 1,6, sous immersion. L'observation est effectuée à chaque fois en contraste de phase avec un temps d'exposition de 50 ms et en fluorescence à l'aide du filtre mCherry (540 < λ_{ex} < 580 ; 600 < λ_{em} < 660) avec un temps d'exposition de 200 ms.

2.13. *Evaluation de l'intégrité de l'ADN génomique*

La taille du génome des bactéries est de l'ordre de la mégabase (Mb). Par conséquent, une électrophorèse classique ne permettrait pas de faire migrer un ADN aussi grand. L'électrophorèse en champ pulsé (PFGE) est donc utilisée.

2.13.1. Principe général de l'électrophorèse en champ pulsé

L'électrophorèse en champ pulsé a été découverte en 1984 par David C. Schwartz et Charles R. Cantor [149]. Le principe est le même que pour une électrophorèse classique : les fragments d'ADN sont séparés en fonction de leur taille grâce à un gel d'agarose. Les fragments de petites tailles migrent plus vite que ceux de grandes tailles. Cependant, l'invention vient de l'application d'un champ électrique pulsé. De plus, plusieurs paires d'électrodes disposées autour du gel permettent d'appliquer le champ avec un angle pouvant aller de 90° à 120°. L'ADN étant très long, il faut qu'il trouve un passage entre les mailles du gel. Le changement de direction du champ électrique permet à l'ADN de se réorienter dans le sens du nouveau champ. La mobilité étant plus longue pour les fragments de grande taille, c'est de cette manière qu'ils seront séparés. Les fragments de plus grande taille se retrouveront en haut du gel alors que ceux de plus petite taille se situeront en bas du gel. Un dernier paramètre influençant la migration des fragments d'ADN et la résolution du gel est la durée de l'impulsion, modulable de 0,1 à 65 000 s [150,151]. La Figure 46 représente le principe général de la PFGE (gel d'électrophorèse en champ pulsé).

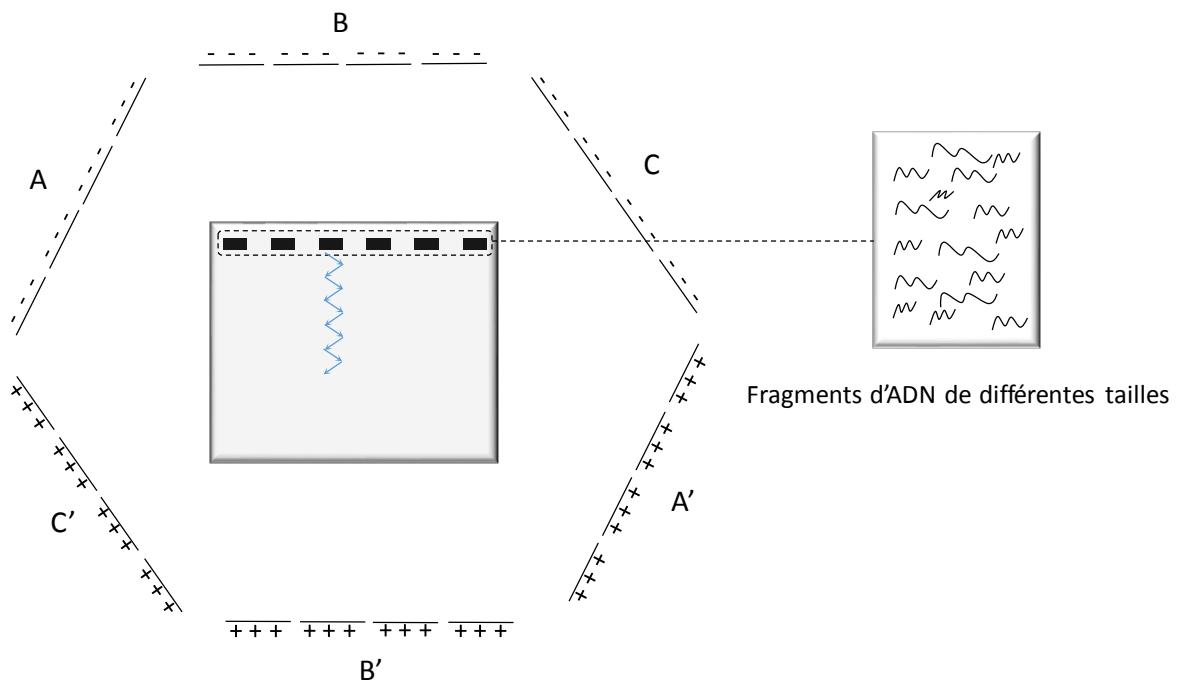


Figure 46 : Principe général de la PFGE. Les flèches en bleu montrent le parcours de l'ADN lors de l'application d'un courant entre les paires d'électrodes A-A' et C-C'.

2.13.2. Réalisation des essais

Avant de commencer les essais sur les bactéries, l'activité des endonucléases est testée directement sur l'ADN extrait des spores et n'ayant subi aucun traitement ni par les faisceaux d'électrons ni par les décharges électriques. Pour l'extraction de l'ADN, le protocole ci-dessous est suivi jusqu'à l'étape de rinçage après la digestion par la protéinase K. Les plugs sont alors placés sous une lumière UV ($\lambda=254$ nm, Spectroline EF-180/FE, Spectronics Corporation, USA) pendant 50 s ou dans 1 mL d'une solution de H_2O_2 (Sigma-Aldrich, France) à 5% pendant 30 min à température ambiante. Ensuite, les étapes de digestion avec les différentes endonucléases sont effectuées.

- Pour les faisceaux d'électrons, 100 μ L d'une suspension de *Bacillus pumilus* à $DO_{600\text{ nm}}$ de 20 sont déposés sur gélose PCA. Ensuite, 2 ou 10 impulsions à 100 Hz et 2 cm sont appliquées. Pour les spores, plusieurs boites de Pétri stériles et vides contenant 10 spots de 10 μ L de solution de *Bacillus pumilus* sporulé sont traitées avec 10 impulsions à 100 Hz et 2 cm.
- Pour les décharges électriques, dans le cas des bactéries végétatives, le tapis bactérien ayant poussé pendant 16 h à 37°C sur gélose PCA est récupéré par ajout de 4 x 1 mL d'eau PPi stérile par boite. Deux boites de Pétri sont utilisées par essai. La suspension obtenue est ensuite déposée dans 8 L d'eau distillée stérile. Pour les spores bactériennes, 40 mL de suspension sont déposés dans 8 L d'eau distillée stérile. Dans les deux cas, 500 impulsions sont appliquées avec une fréquence de répétition de 10 Hz.
- Pour évaluer l'influence des UV produits par les décharges électriques après 500 impulsions à 10 Hz sur l'ADN des spores de *Bacillus pumilus*, 3,6 mL d'une suspension à $DO_{600\text{ nm}}$ de 0,5 sont placés dans une cuvette en Quartz au-dessus des électrodes. Cette opération est répétée 8 fois afin d'avoir suffisamment de matériel pour extraire l'ADN.

Après récupération des échantillons, la suspension est concentrée afin d'obtenir une $DO_{600\text{ nm}}$ égale à 10.

1 mL des solutions est récupéré dans des Eppendorf 1,5 mL et centrifugé 5 min à 12 000 g.

Pour la lyse du manteau, le culot est repris dans 500 μ L de solution de dénaturation TUDSE préparée extemporanément et incubé 45 min à 37°C. L'opération est répétée deux fois. La solution est de nouveau centrifugée pendant 5 min à 12 000 g. Ensuite, les culots sont lavés 5 fois avec du tampon TES, puis resuspendus dans ce même tampon et placés à 4°C.

Le lendemain, les tubes sont vortexés puis, une mesure de $DO_{600\text{ nm}}$ est effectuée afin d'ajuster cette dernière à 3 pour les spores et à 0,5 pour les cellules végétatives dans 1 mL de TES. Les tubes sont centrifugés à 12 000 g pendant 5 min et resuspendus dans 200 μ L de tampon de lyse 2X préparé extemporanément. Immédiatement, un volume identique de CleanCut Agarose à 2% est ajouté. Les tubes sont vortexés et 90 μ L sont déposés dans les moules à plug. Après solidification, les plugs sont déposés dans 1 mL de tampon de lyse 1X et mis à incuber à 37°C pendant 2 h sous légère agitation.

Les plugs sont ensuite rincés avec 1 mL d'eau milli-Q DNases free et mis à incuber sur la nuit à 50°C dans 1 400 µL de tampon de déprotéinisation.

Les plugs sont rincés avec du tampon TE à température ambiante sous légère agitation, puis avec du tampon TE contenant 1 mM de Pefabloc SC (Roche) (inhibiteur de protéases) à 37°C, et deux lavages avec du tampon TE à température ambiante. Le temps d'incubation entre chaque lavage est de 1 h.

Les plugs sont ensuite découpés en bande de 2 mm x 5 mm.

Le marqueur de taille choisi est Lambda (48,5-1 000 kb ; Bio-Rad) [152,153].

Pour les plugs digérés par l'Endonucléase IV, chaque plug est équilibré dans 150 µL de tampon NEB 3 1X pendant 30 min à 37°C sous légère agitation. Puis, 150 µL de tampon NEB 3 1X frais contenant l'Endonucléase IV à 5 U sont déposés et mis à 37°C pendant 1 h sous légère agitation. Pour les plugs digérés avec la T4 Endonucléase V, le tampon utilisé est le tampon T4 PDG.

Les plugs non digérés par l'endonucléase sont conservés au frigo jusqu'à leur utilisation.

Après les digestions, les plugs sont équilibrés dans 150 µL de tampon O 1X (Tampon O 10X fournit avec l'enzyme) sous légère agitation pendant 30 min à 37°C. Le tampon est éliminé et 150 µL de tampon O 1X frais est ajouté avec 15 U de NotI. L'ensemble est mis à 37°C sur la nuit sous légère agitation.

Les plugs sont lavés deux fois dans du tampon TE à température ambiante pendant 1 h.

Dans les cas de digestion par la Nucléase S1, après la digestion par NotI, les plugs sont lavés avec 1 mL d'eau DNase free et équilibrés avec 300 µL de tampon Nucléase S1 1X pendant 30 min à 37°C sous légère agitation. Le tampon est éliminé. L'ADN est digéré avec 3 U de Nucléasse S1 (ThermoScientific) dans 300 µL de tampon Nucléase S1 1X frais pendant 1 h à 37°C sous légère agitation. Les plugs sont ensuite lavés 4 fois avec 1 mL de tampon TE pendant 30 min à température ambiante sous légère agitation.

Les fragments sont ensuite déposés dans les différents puits du gel d'agarose à 1% certifié pour les champs pulsés (Bio-Rad). Les plugs sont fixés par l'ajout dans les puits d'agar en surfusion (Bio-Rad) jusqu'au remplissage du puits. Le gel est ensuite déposé sur la PFGE au contact de 2 L de tampon TAE à 1X. L'électrophorèse CHEF-DR III Chiller System de chez Bio-Rad est utilisée (Figure 47). Les conditions de migration sont 14°C pendant 18 h à 6 V/cm avec une augmentation de la durée des impulsions de 1 à 50 s et un angle de 120°.

Après les 18 h de migration, le gel est transféré dans un bain de 200 mL de BET à 0,5 µg/mL pendant 30 min sous légère agitation à température ambiante. Le gel est ensuite rincé dans 300 mL d'eau milli-ro et laissé sous légère agitation à température ambiante pendant 40 min. La fluorescence est révélée grâce au transilluminateur Gel Doc XR (Bio-Rad). Les images sont acquises avec le logiciel Quantity One v.4.6.2 de chez Bio-Rad [152,153] (Figure 48).



Figure 47 : Electrophorèse CHEF-DR III Chiller System avec à gauche le système de refroidissement, au centre la cuve d'électrophorèse et à droite l'alimentation.

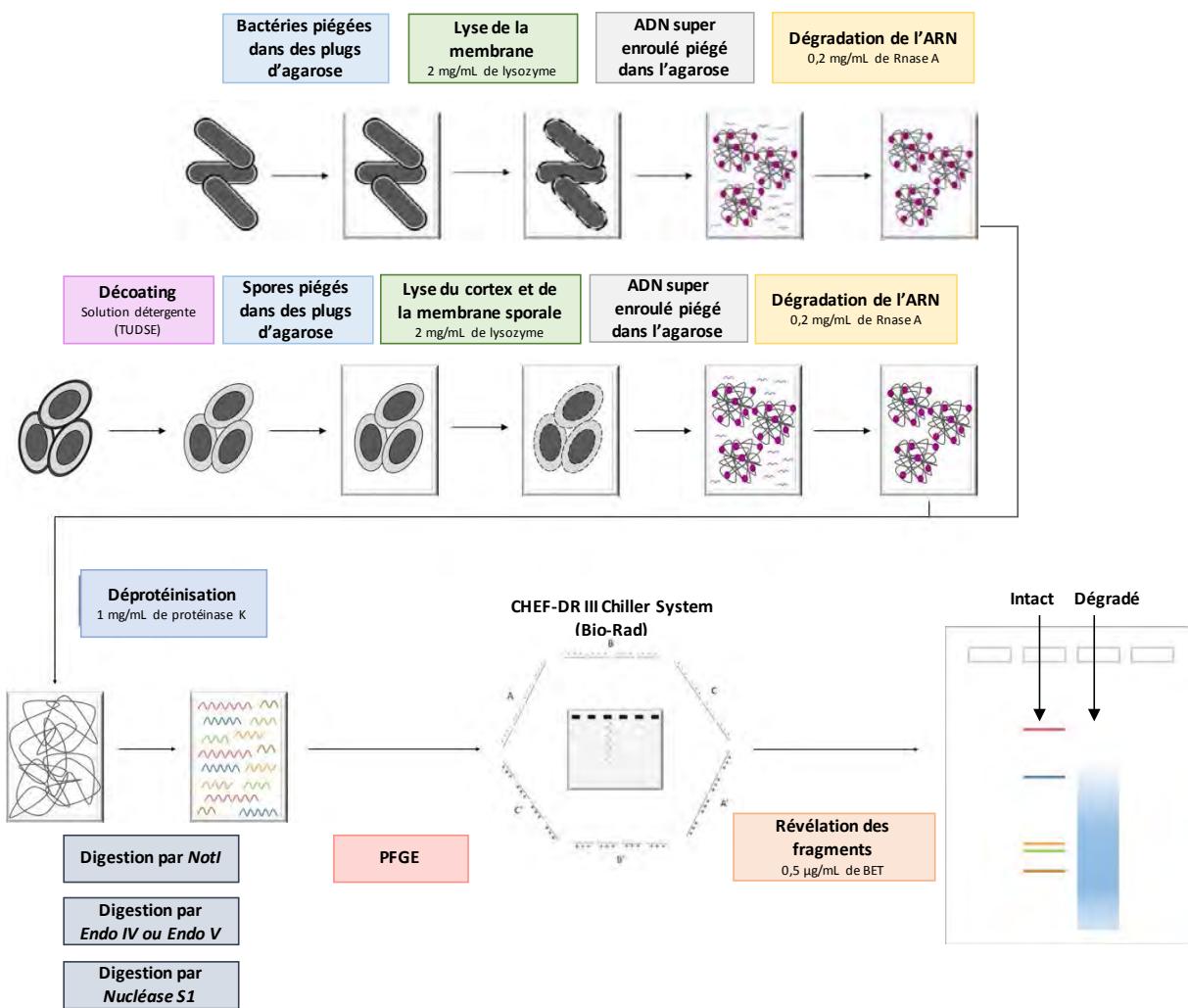


Figure 48 : Résumé des différentes étapes de récupération, digestion et migration de l'ADN.

2.13.3. Composition des tampons

Tableau 8 : Solution de dénaturation TUDSE

Composé	Concentration finale
Tris-HCl (pH 8)	50 mM
EDTA (pH 8)	10 mM
Urée	8 M
Dithiothreitol (mis au dernier moment)	50 mM
Dodécylsulfate de sodium (SDS)	1%

Tableau 9 : Tampon TES

Composé	Concentration finale
Tris-HCl (pH 8)	10 mM
EDTA (pH 8)	10 mM
Na-Cl	150 mM

Tableau 10 : Tampon de lyse 2X

Composé	Concentration finale
Tris-HCl (pH 8)	50 mM
EDTA (pH 8)	50 mM
Tween 20	0,5%
Triton X-100	0,5%
Lysozyme (Sigma-Aldrich, France)	4 mg/mL
RNase A (Euromedex, France)	0,4 mg/mL

Tableau 11 : Tampon de déprotéinisation

Composé	Concentration finale
Tris-HCl (pH 8)	50 mM
EDTA (pH 8)	50 mM
Tween 20	0,5%
Triton X-100	0,5%
Guanidine HCl	3 M
Tween 20	20%
Protéinase K	1 mg/mL

Tableau 12 : Tampon TE

Composé	Concentration
Tris-HCl (pH 8)	10 mM
EDTA (pH 8)	1 mM

Tableau 13 : Tampon NEB 3 10X

Composé	Concentration
Tris-HCl (pH 7,5)	500 mM
MgCl ₂	100 mM
NaCl	1 M
Dithiothreitol	10 mM

Tableau 14 : Tampon T4 PDG 10X

Composé	Concentration
Na ₂ HPO ₄ (pH 7,2)	250 mM
EDTA	10 mM
NaCl	1 M
Dithiothreitol	10 mM

Tableau 15 : Tampon Nucléase S1 5 X

Composé	Concentration
Acétate de sodium (pH 4,5)	200 mM
NaCl	1,5 M
ZnSO ₄	10 mM

Tableau 16 : Tampon TAE 50X

Composé	Concentration
Tris base	45 mM
EDTA (pH 8)	1 mM
Acide borique	45 mM

Tous les tampons sont filtrés au moyen d'un filtre de porosité 0,20 µm (ClearLine®) ou autoclavés si besoin. Ils sont conservés à -20°C sous forme d'aliquots de 1 mL pour les tampons

des enzymes ; à 4°C pour les tampons TE et TES et à température ambiante pour le TAE. Les autres tampons sont préparés extemporanément.

2.14. Etude des protéines

Les essais pour l'étude des protéines ont été réalisés en triplicat à partir de trois cultures différentes. Le traitement qui est appliqué est de 2 ou 10 impulsions à 2 cm et 100 Hz, pour les faisceaux d'électrons pour la forme végétative ou la forme sporulée respectivement, et de 500 impulsions à 10 Hz, pour les décharges électriques.

Après le traitement, les bactéries sont récupérées et centrifugées à 12 000 g pendant 5 min. Le culot est repris dans 200 µL de tampon de lyse (5% SDS, un détergent, et 2 mM de Pefabloc SC (Roche), un inhibiteur des protéases). Le volume centrifugé permet d'avoir, dans les 200 µL, une $DO_{600\text{ nm}}$ de 20. Les tubes sont mis dans un bain sec à 95°C pendant 5 min pour dénaturer les protéines.

La solution est ensuite transférée dans un nouveau tube. Environ 200 µL de billes de silicate de zirconium de 0,1 mm de diamètre (Biospec Products) sont déposés [154]. Les cellules sont lysées par sonication au Bioruptor® Plus en effectuant 10 cycles (45 s 'ON'/15 s 'OFF') à puissance maximale. Cette opération est répétée 4 fois. Pour les spores, cette étape permet de séparer la membrane interne du cortex et la paroi. Pour les bactéries végétatives, elle détruit la membrane et la paroi. L'ensemble est ensuite centrifugé pendant 5 min dans une microcentrifugeuse à 12 000 g pour éliminer les cellules non lysées. Le surnageant est pipeté. Un volume d'environ 100 µL est récupéré. Un dosage des protéines est effectué à l'aide du kit DC Protein Assay II (Bio-Rad). Le principe de ce dosage est basé sur la réaction des protéines avec une solution alcaline de tartrate de cuivre et un réactif de Folin. Le principe est similaire à la méthode de Lowry. La coloration du milieu en fonction de la quantité protéique se fait en deux étapes. Dans un premier temps, les protéines se complexent avec les ions cuivre. En effet, elles possèdent, en milieu alcalin, 4 liaisons peptidiques permettant de former ce complexe. La deuxième étape est la réaction avec le réactif de Folin qui permet la réduction des acides aminés aromatiques (tyrosine et tryptophane) conduisant à la formation d'un complexe bleu dont l'absorbance se situe entre 650 et 750 nm. Dans notre cas, la mesure d'absorbance est réalisée à 700 nm.

En parallèle, 22 µL de tampon Laemmli 5X sont ajoutés aux 88 µL d'échantillons restants. Les tubes sont mis à 95°C pendant 5 min sous agitation (600 rpm) afin de dénaturer les protéines. Les protéines sont conservées à 4°C jusqu'à l'analyse SDS-PAGE et protéomique.

Tableau 17 : Tampon Laemmli 5X

Composé	Concentration
SDS	10%
Glycérol	50%
2-mercptoethanol	25%
Bleu de bromophénol	0,02%
Tris-HCl (pH 6,8)	0,3125 M

2.14.1. Analyse SDS-PAGE

Un gel SDS-PAGE est préparé avec un gel de concentration à 4% et un gel de séparation à 12%. 20 µg des protéines extraites précédemment sont déposées dans les puits. Le marqueur de taille est le Precision Plus Protein Standards Kaleidoscope (Bio-Rad) qui constitue une échelle allant de 10 à 250 kDa. Dans le puits, 5 µL du marqueur sont ajoutés.

La migration s'effectue à 200 V pendant 35 min dans du tampon de migration 1X (TG-SDS 10X, EUROMEDEX (référence EU0510-B) dilué 10 fois dans de l'eau milli-Q). Une fois la migration terminée, le gel est coloré sur la nuit dans de l'InstantBlue™ (Euromedex) sous agitation à température ambiante. Le seuil de détection des protéines avec ce colorant est de 5 ng par bande. Avant d'acquérir les images, le gel est lavé dans de l'eau sous agitation. Les images sont scannées grâce au ChemiDoc™ Touch gel Imaging System (Bio-Rad).

Tableau 18 : Composition des gels pour la SDS-PAGE.

Composé	Gel de séparation 12%	Gel de concentration 4%
Acrylamide/bisacrylamide 40% (Euromedex)	3 mL	1 mL
H ₂ O	4,4 mL	6,4 mL
Tris 1,5 M	2,5 mL	/
Tris 0,5 M	/	2,5 mL
SDS 10%	100 µL	100 µL
TEMED	10 µL	10 µL
Ammonium persulfate	50 µL	50 µL

Tableau 19 : Composition du tampon de migration TG-SDS 10X (Euromedex).

Composé	Concentration
Tris (hydroxymethyl) aminomethane	0,25 M
Glycine	1,92 M
SDS	1%

2.14.2. Principe général de l'analyse protéomique

La protéomique est l'étude du protéome (protéines exprimées par le génome). Elle permet la caractérisation et la quantification des protéines exprimées par une cellule, un prélèvement biologique, un tissu ou un microorganisme.

Il existe deux stratégies pour l'analyse d'extraits protéiques :

- Stratégie top-down en MS/MS qui consiste à analyser un mélange de protéines intactes sans digestion, puis, à isoler la protéine d'intérêt pour la fragmenter et l'analyser.
- Stratégie bottom-up en MS/MS qui consiste à digérer les protéines avec une enzyme (type Trypsine) afin d'obtenir un mélange de peptides. Ces derniers sont séparés en LC (Liquid Chromatography) avant d'être injectés dans le spectromètre de masse qui génère un spectre de masse où tous les peptides sont présents. Ensuite, le spectromètre choisit N ions peptidiques pour les fragmenter et ainsi les identifier. Cette méthode est appelée TopN, où N correspond au nombre de spectres MS/MS effectués après un scan MS. A partir des peptides identifiés, grâce à des banques de données, les protéines sont identifiées en sélectionnant le microorganisme étudié. Chaque protéine possède au moins un peptide spécifique (séquence peptidique propre à une seule protéine).

2.14.3. Préparation des échantillons avant l'analyse protéomique

La préparation et l'analyse protéomique ont été réalisées à l'IPBS, dans l'équipe 'Protéomique et Spectrométrie de masse des biomolécules'.

Les échantillons sont repris dans du Laemmli pour un volume final de 50 µL. La réduction des protéines se fait en plaçant l'échantillon dans un Thermomixer réglé sur 95°C. Les tubes sont incubés 5 min. Afin d'éviter la reformation des ponts disulfures, une solution d'alkylation composée d'Iodoacétamide à 750 mM (alkylation des résidus cystéines) et d'ammonium bicarbonate à 50 mM est utilisée. Cette dénaturation des protéines, en supprimant leur conformation 3D, favorise leur migration dans un gel de polyacrylamide et leur digestion enzymatique. 5 µL de cette solution sont déposées dans les tubes. Si la solution est jaune, il faut rajouter un peu d'ammonium bicarbonate à 50 mM pour désacidifier le milieu. Le temps d'incubation est de 30 min à l'abri de la lumière.

En parallèle, un gel stacking est préparé avec un gel de concentration à 4% et un gel de séparation à 12%. La composition est la même que pour les gels SDS-PAGE. Le volume préparé pour le gel de concentration est juste deux fois plus important.

La migration s'effectue à 20 mA pendant 10 min, puis, 40 mA jusqu'à ce que les marqueurs de taille se séparent sur une distance de 5 mm (environ 30 min de migration) dans du tampon de migration. Une fois la migration terminée, le gel est coloré dans de l'InstantBlue sous agitation à température ambiante pendant 15 min. Avant de récupérer les bandes, le gel est lavé dans de l'eau MilliQ sous agitation. Les bandes sont ensuite excisées, mises dans des tubes Eppendorf de 1,5 mL et décolorées grâce à une solution de bicarbonate d'ammonium 25 mM/ACN (Acétonitrile, Optima LC/MS Grade 2,5L, Fischer Scientific) 50/50 pendant 15 min.

L'opération est répétée 3 fois. Les bandes sont ensuite séchées au speed-vacuum pendant 10 min.

Les protéines sont digérées par la trypsine qui hydrolyse les liaisons peptidiques dans lesquelles un acide aminé basique (Lysine ou Arginine) engage sa fonction acide. Pour préparer la solution, 20 µg de trypsine sont ajoutés à 1 mL de bicarbonate d'ammonium 25 mM. Les 60 µL de cette solution sont incorporés dans chaque échantillon afin de recouvrir les bandes. La digestion s'effectue sur la nuit à 37°C sous agitation.

Pour extraire les peptides du gel, les tubes sont mis à centrifuger 5 min avec une centrifugeuse de paillasse. Le surnageant est récupéré. Sur le morceau de gel, 50 µL d'une solution de AF (acide formique pour spectrométrie de masse, ~98%, Sigma) 1% et ACN 40% sont déposés. Le tube est centrifugé pendant 5 min avec une centrifugeuse de paillasse et le surnageant est récupéré et ajouté au précédent. Pour finir l'extraction, 10 µL d'une solution AF 1% et ACN 25% sont ajoutés. Les 25 µL d'ACN 60% sont ajoutés. Le surnageant est rajouté au précédent. Pour évaporer les éluats, le tube est mis au SpeedVac. Les échantillons sont conservés à -20°C jusqu'à l'analyse en spectrométrie de masse (MS).

L'extrait peptidique sec est repris dans 14 µL d'une solution 2% ACN/0,05% acide trifluoroacétique. Pour l'analyse en MS, 5µL d'extrait peptidique sont injectés et le reste est conservé à -20°C.

Les peptides générés sont ensuite analysés en nanoLC-MS/MS qui utilise un système HPLC en nano débit (nanoRS UHPLC system (Dionex, Amsterdam, The Netherlands)) couplé à un spectromètre de masse de type LTQ-Orbitrap Velos mass spectrometer (Thermo Fisher Scientific, Bremen, Germany).

2.14.4. Extraction et analyse des données

Les listes de protéines ont été obtenues après recherche avec le moteur de recherche Mascot dans la banque *Bacillus pumilus* locale (Bacillus_Pumilus 20170606 (25575 séquences; 7540378 résidus)).

Deux types d'analyses sont effectués :

- 1) L'analyse des protéines détectées qui permet de comparer la quantité d'une protéine dans l'échantillon témoin par rapport à l'échantillon essai.
- 2) L'analyse des peptides spécifiques qui permet de détecter également le ratio entre le nombre de peptides détecté dans l'échantillon témoin et celui de l'essai. Le choix des peptides spécifiques tient dans le fait que l'on peut remonter directement à la protéine impliquée.

Le détail de ces analyses est décrit ci-dessous.

1) Les listes de protéines identifiées sont validées par le logiciel Proline. Les protéines identifiées avec exactement le même jeu de peptides (samesets) ou avec une partie du même jeu de peptides (subsets) sont regroupées sous forme de listes dans des tableaux Excel.

Les protéines d'un même groupe sont classées selon leur score protéique, leur nombre de séquences peptidiques (spécifiques ou non de la protéine), leur nombre de spectres MS/MS qui sont les spectres de fragmentation. Seul un membre du groupe est reporté dans la liste des protéines identifiées, c'est la protéine de 1^{er} rang. Afin d'augmenter la robustesse des

résultats, les listes obtenues sont ensuite filtrées afin de ne valider que les protéines identifiées avec au moins 2 peptides et 4 MS/MS.

L'analyse statistique des quantifications est réalisée par un t-test. La p-value est fixée à 0,05. C'est-à-dire que $-\log(p\text{-value})$ doit être strictement supérieur à 1,3 pour être considéré comme une différence significative. Le $\log_2(\text{Fold change})$ est de 2 ou -2 ce qui signifie que le ratio entre une valeur à comparer et une valeur de référence est égale à 4 ou inférieur à 0,25, respectivement. Dans notre cas, le $\log_2(\text{Fold change})$ se calcule comme suit :

$$\log_2(\text{Fold change}) = \log_2 \left(\frac{\text{Valeur } B}{\text{Valeur } A} \right) \quad (\text{équation 11})$$

Avec Valeur A : valeur obtenue pour le témoin

Valeur B : valeur obtenue pour l'essai

Les volcanoplots représentent, en abscisse, le \log_2 du ratio d'intensité entre l'essai et le témoin, et en ordonnée, le $-\log_{10}(p\text{-value})$.

2) Les listes de peptides sont triées afin de n'identifier que les peptides spécifiques (#psm_prot_sets = 1). Les moyennes sont effectuées sur les Raw abundance des réplicats techniques, au nombre de 2 (un réplicat technique est un échantillon biologique injecté 2 fois sur le spectromètre de masse). A partir des réplicats biologiques (au nombre de 3) des témoins et des essais, un test de Student est effectué afin de ne sélectionner que les $p\text{-value} < 0,05$. Si le calcul n'est pas possible parce que la mesure du peptide n'a pas été faite par le spectromètre de masse, la valeur manquante est remplacée par une valeur de bruit de fond. Ensuite, les peptides sont séparés en quatre catégories selon les critères suivants :

- Un ratio de quantité de peptides dans le témoin/quantité de peptides dans l'essai supérieur à 4 (T/E)
- Les peptides qui sont absents dans l'essai (E absent)
- Un ratio de quantité de peptides dans l'essai/quantité de peptides dans le témoin supérieur à 4 (E/T)
- Les peptides qui sont absents dans le témoin (T absent).

L'intérêt est de savoir si un type de protéines (membranaire ou cytoplasmique) ou de processus biologique est préférentiellement affecté par le traitement. Afin de classifier les protéines en fonction de leur emplacement dans la cellule ou de leur processus biologique, les termes GO (Gene Ontology) donnés par le logiciel QuickGO (<https://www.ebi.ac.uk/QuickGO/annotations>) sont employés. Il est important de noter qu'une protéine peut être associée à différents termes GO. La Figure 84, présenté en page 140, résume la stratégie d'analyse. Pour connaître la signification exacte des catégories déterminées par QuickGO, il faut rentrer la désignation sur le site <https://www.ebi.ac.uk/QuickGO/GTerm> [155].

Les analyses quantitatives protéique et peptidique sont complémentaires. La première permet de voir la sous-expression d'une protéine entre les deux types d'échantillon. Cependant, si une cassure survient au niveau d'un peptide mais que les autres peptides de la protéine ne sont pas touchés, cette cassure ne sera pas révélée par l'approche 'analyse quantitative à partir des protéines'. En effet, il faut la détection de plusieurs peptides pour valider la présence d'une protéine et donc la sous-expression d'un peptide ne signifiera pas qu'une sous-expression de la protéine sera détectée si les autres peptides ne sont pas touchés. La deuxième approche permet donc de détecter des modifications au niveau des peptides spécifiques et de pouvoir remonter à la protéine concernée par cette modification. Les protéines détectées lors de la première approche ne seront pas forcément révélées par l'autre approche étant donné que, dans le second cas, seuls les peptides spécifiques sont considérés. Il n'est pas possible d'analyser l'ensemble des peptides car les non-spécifiques ne permettent pas de remonter à la protéine impliquée, étant donné qu'ils se retrouvent dans plusieurs protéines.

2.15. Etudes statistiques

Pour savoir si les résultats obtenus entre deux conditions de traitement sont significativement différents, un f-test est effectué afin de déterminer si les variances sont différentes. Ensuite, un test de Student (ou t-test) est réalisé. Le nombre d'étoiles correspond à :

- t-test <5% : 1 étoile
- t-test < 1% : 2 étoiles
- t-test < 0,01% : 3 étoiles.

Chapitre 3. Étude des effets du faisceau d'électrons pulsés

L'objectif de ce chapitre est d'étudier les effets du traitement par le faisceau d'électrons pulsés sur les bactéries.

Dans un premier temps, les caractéristiques physiques du faisceau vont être présentées. Ensuite, les essais de décontamination seront réalisés sur différentes souches afin de déterminer la plus résistante au traitement qui servira de référence pour la suite des travaux. Différents paramètres machine seront testés afin d'évaluer leur impact sur l'efficacité du système.

Une fois la meilleure configuration trouvée, des techniques de microscopie seront mises en œuvre pour observer l'intégrité et l'organisation de la paroi des microorganismes. Différents outils ont été choisis : l'AFM, la MEB et la MET. L'AFM est une technique qui permet non seulement d'observer la morphologie de la bactérie mais également de déterminer quantitativement la rugosité ou l'hydrophobicité de la surface observée. L'avantage de cette technique est qu'elle permet une observation en condition native. La MET est une technique complémentaire qui permet d'observer également la morphologie des bactéries et d'évaluer leur taille. La rapidité d'acquisition des images permet l'observation d'un nombre important de bactéries pour confirmer les observations faites en AFM. Enfin, la MET apporte une information supplémentaire par rapport aux deux autres technologies, à savoir l'organisation interne de la bactérie. Il sera donc possible de voir si les différentes couches constituant la bactérie sont toujours présentes et si elles sont intactes après le traitement.

L'intégrité de l'ADN génomique sera analysée. Il n'est pas possible d'utiliser un gel d'électrophorèse classique car la taille de l'ADN est trop importante (~3,7 Mb). Par conséquent, une électrophorèse en champ pulsé va être utilisée afin de pouvoir distinguer correctement les différents fragments d'ADN.

Pour finir, les protéines de la bactérie seront extraites et analysées par protéomique. Cette technique permet d'identifier et de quantifier les protéines. Une comparaison entre la quantité de protéines dans l'échantillon témoin et l'essai est possible et permet de connaître les protéines affectées par le traitement.

Les parties concernant l'évaluation de l'influence des paramètres et l'observation par MEB et MET sur les spores ont fait l'objet d'un proceeding 'Bacteria inactivation by pulsed electron beam' suite au congrès EAPPC (Euro-Asian Pulsed Power Conference) 2016. Il est présenté en Annexe 1 : Proceeding de l'EAPPC 2016 'Bacteria inactivation by pulsed electron beam'.

3.1. Présentation de la problématique

Le générateur de faisceaux d'électrons pulsés utilisé dans ces travaux a été développé dans le but de stériliser des emballages pour les industries de l'agroalimentaire, de la pharmaceutique et de la cosmétique. D'après la norme ISO/TS 11139 : 2006, le niveau d'assurance de la stérilité (NAS) correspond à la définition suivante : « probabilité de présence d'un seul microorganisme viable sur une unité de stérilisation. Le terme NAS prend une valeur

quantitative, généralement 10^{-6} ou 10^{-3} ». Ainsi, il faut raisonner en terme de probabilité. Un NAS de 10^{-6} signifie que la probabilité de trouver un microorganisme viable sur le produit stérile est de 1 sur 10^6 .

Il a été décidé de se placer dans le cas le plus critique et donc d'atteindre une diminution de $6 \log_{10}$, diminution qui est classiquement demandée par les industries pharmaceutiques.

3.2. Configuration des essais

Les paramètres de la technologie qui peuvent être modifiés sont :

- la distance de l'objet à traiter à la fenêtre d'irradiation
- la fréquence de répétition des impulsions
- le nombre d'impulsions appliquée.

Dans les paragraphes suivants, le choix des différents paramètres sera décrit et expliqué en fonction de l'objectif de la manipulation.

3.3. Mesure des signaux de courant et de tension

Les Figure 49 et Figure 50 montrent que les valeurs de courant et tension sont reproductibles d'une impulsion à l'autre. Il est à noter que, sur l'ensemble des expériences, l'écart maximal retrouvé reste inférieur à 5%.

Comme détaillé dans le chapitre précédent, les signaux de courant sont obtenus à l'aide d'un capteur de type Rogowski situé au niveau de la cathode. Pour les mesures de tension, un diviseur capacitif est utilisé et placé à proximité de la mesure de courant.

Les signaux Figure 49 et Figure 50 sont ceux obtenus à l'aide d'un oscilloscope Tektronix TDS 7404B. Ces signaux montrent que les impulsions sont reproductibles d'une impulsion à l'autre. La largeur à mi-hauteur (FWHM, full width at half maximum) correspond à 10 ns qui est la durée d'impulsion. Le front de montée (pris entre 0 et 100%) évalué à partir du signal de tension est de 5 ns. La valeur du courant est de l'ordre de 6 kA et la tension au niveau de la cathode de 250 kV.

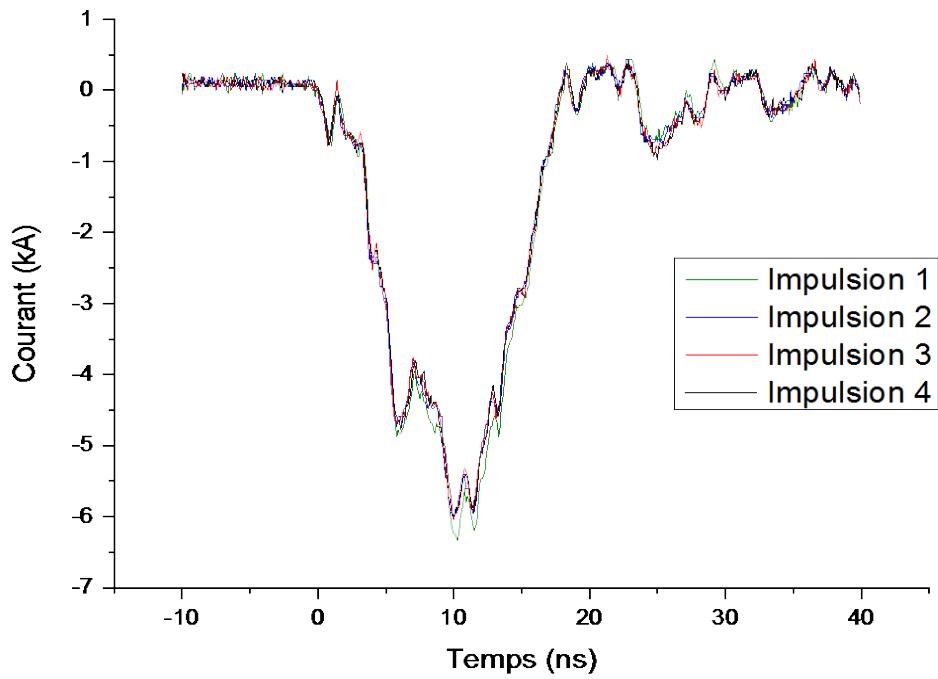


Figure 49 : Signaux de courant donnés par les capteurs situés au-dessus de la diode.

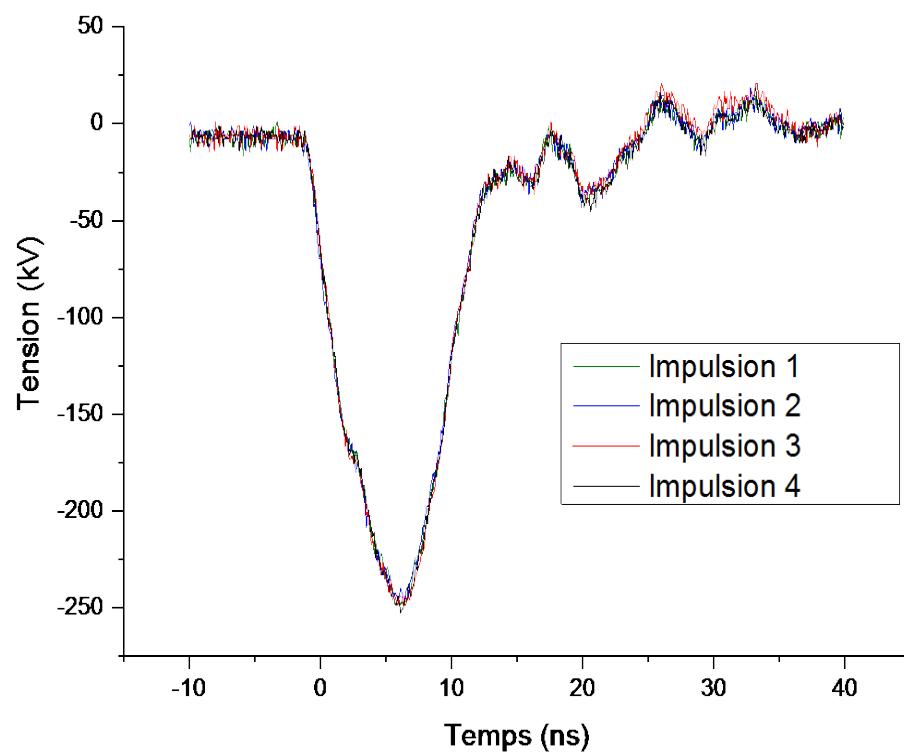


Figure 50 : Signaux de tension donnés par les capteurs situés au-dessus de la diode.

Le contrôle/commande, permettant de faire fonctionner la machine, donne également les valeurs pic de courant et tension. Ces valeurs servent de référence pour les essais.

3.4. Mesure de la pénétration du faisceau

Afin d'évaluer la profondeur de pénétration des électrons, des films radiochromiques de 20 µm d'épaisseur couplés à un lecteur DR 020 de Crosslinking AB permettent de déterminer l'évolution de la dose en fonction de la profondeur. Les films sont superposés, un traitement de 50 impulsions à 2 cm et avec une fréquence de répétition de 100 Hz est appliqué. L'expérience est répétée trois fois. Les valeurs moyennes de tension délivrée pour les essais sont, respectivement, de 265,5 kV, 263,5 kV et 263,5 kV. Pour ce qui est du courant, les valeurs moyennes sont de 5,64 kA, 5,37 kA et 5,39 kA, respectivement. Les dosimètres sont ensuite cuits à 37°C pendant 20 min afin de catalyser les réactions de réticulation qui apparaissent après le traitement.

Le profil de pénétration montre que la profondeur maximale que peuvent atteindre les électrons dans un matériau de densité 1 se situe autour de 400 µm (Figure 51). Cependant, si l'objectif est de traiter un emballage dans son intégralité (intérieur et extérieur), la différence de dose entre la face interne et la face externe ne doit pas être trop importante. D'après les échanges clients, un ratio maximum entre la dose maximale et la dose minimale (appelé DUR, Dose Uniformity Ratio) de 2 est demandé. Dans ces conditions, le profil de pénétration nous indique que le faisceau ne pourra traiter que des emballages d'épaisseur inférieure à 160 µm dans le cas d'un matériau ayant une densité de 1.

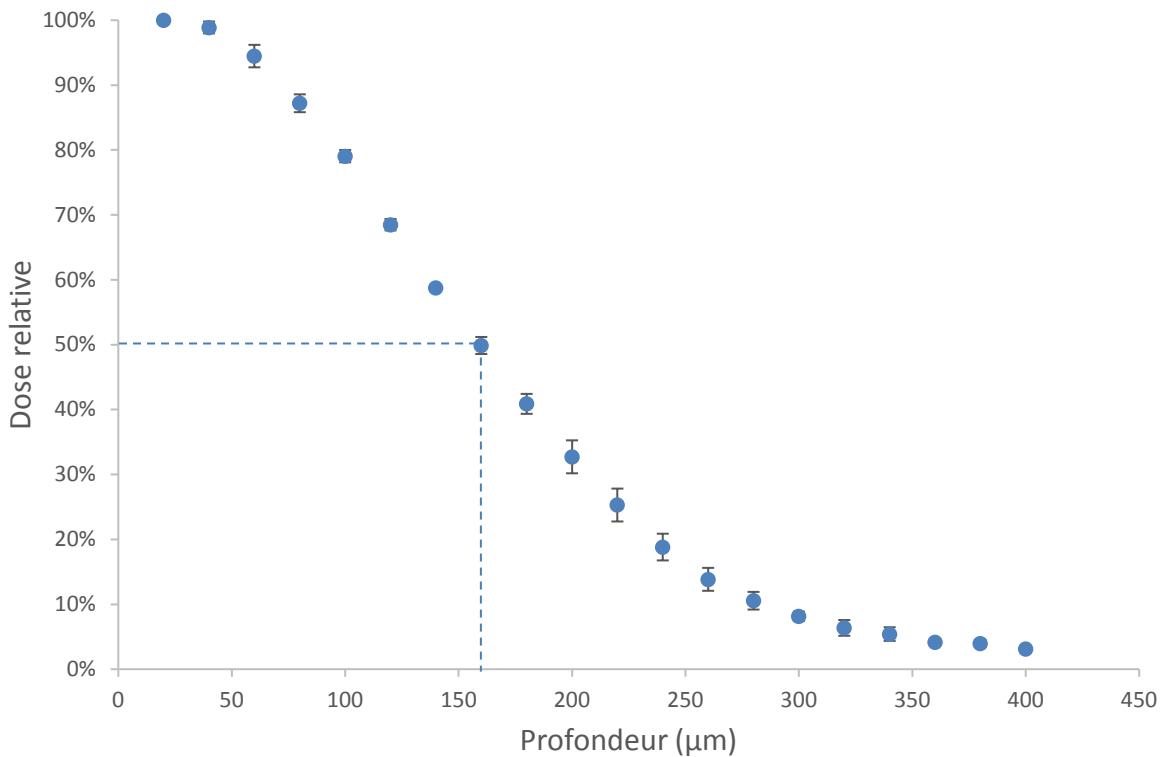


Figure 51 : Profil de pénétration du faisceau d'électrons dans les films radiochromiques de 20 μm d'épaisseur et de densité 1 après un traitement avec 50 impulsions à 2 cm et 100 Hz.

3.5. Efficacité du traitement

3.5.1. Choix de la souche de référence

L'efficacité de la technologie a été étudiée. Pour cela, des essais sur boîte de Pétri contenant un milieu gélosé ont été effectués. *Escherichia coli* et *Bacillus pumilus* (forme végétative et sporulée) sont les deux souches étudiées. La Figure 52 illustre la différence d'efficacité en fonction de la souche considérée. Il apparaît clairement que la souche Gram négative *d'Escherichia coli* est plus sensible au traitement que la souche Gram positive de *Bacillus pumilus*. En effet, avec 1 impulsion de 10 ns à 2 cm, la diminution logarithmique obtenue pour *Escherichia coli* est de $6,31 \log_{10}$ contre $4,7 \log_{10}$ pour *Bacillus pumilus* sous forme végétative. Ces résultats confirment ce qui est décrit dans la littérature, à savoir que les souches Gram négatives sont plus sensibles aux irradiations que les souches Gram positives [81]. De plus, il est intéressant de voir que la différence d'efficacité entre la souche sous forme végétative et sous forme sporulée est très importante. Le traitement est presque 6,7 fois moins efficace sur les spores de *Bacillus pumilus* ($4,7 \log_{10}$ pour la forme végétative contre $0,7 \log_{10}$ pour la forme sporulée). La structure de la spore peut expliquer ce résultat avec notamment un ADN condensé et une plus faible teneur en eau. En effet, dans de telles conditions, les rayonnements créent moins de produits issus de la radiolyse de l'eau au niveau du cœur de la spore et ainsi moins de molécules constituant la spore sont oxydées.

La forme sporulée étant la plus résistante à ce traitement, c'est celle qui nous servira de référence pour la suite de nos essais.

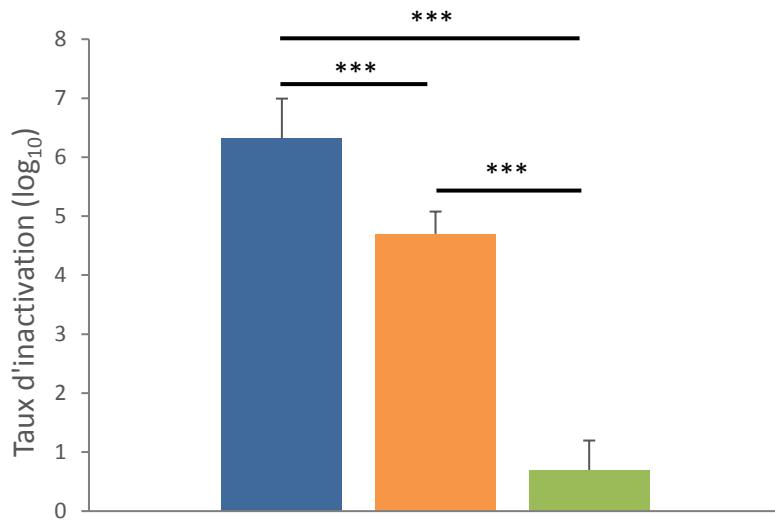


Figure 52 : Comparaison de l'efficacité des faisceaux d'électrons.

Escherichia coli K-12 (en bleu), *Bacillus pumilus* ATCC 27142 sous forme végétative (en orange) et sous forme sporulée (en vert) après 1 impulsion de 10 ns à 2 cm de la fenêtre d'irradiation. Pour chaque souche, les tests ont été réalisés à partir de 3 cultures différentes. L'analyse statistique a été faite avec un test de Student (*** $P<0,0001$).

3.5.2. Etude de l'effet de différents paramètres

Effet de l'environnement de traitement

Le générateur à faisceaux d'électrons pulsés est utilisé pour la stérilisation d'emballage. Dans ces conditions, les microorganismes se trouvent dans un environnement sec. Il a été comparé la différence d'efficacité entre les spores bactériennes sur milieu gélosé et les spores bactériennes déposées en spot et séchées en applicant différents nombre d'impulsions de 10 ns avec une fréquence de répétition de 100 Hz (Figure 53).

Pour un même nombre d'impulsions (3, 5 ou 8 impulsions), l'analyse statistique entre les résultats d'efficacité du traitement sur gélose ou en spot sec n'a pas révélé de différences significatives entre les deux environnements. Il est possible que la différence d'efficacité observée pour l'essai à 1 impulsion soit due principalement au faible taux de mortalité obtenu qui conduit à une plus forte incertitude sur les mesures.

L'application finale vise des bactéries en milieu sec. La suite des expériences se fera donc à partir de spots de *Bacillus pumilus* sporulé.

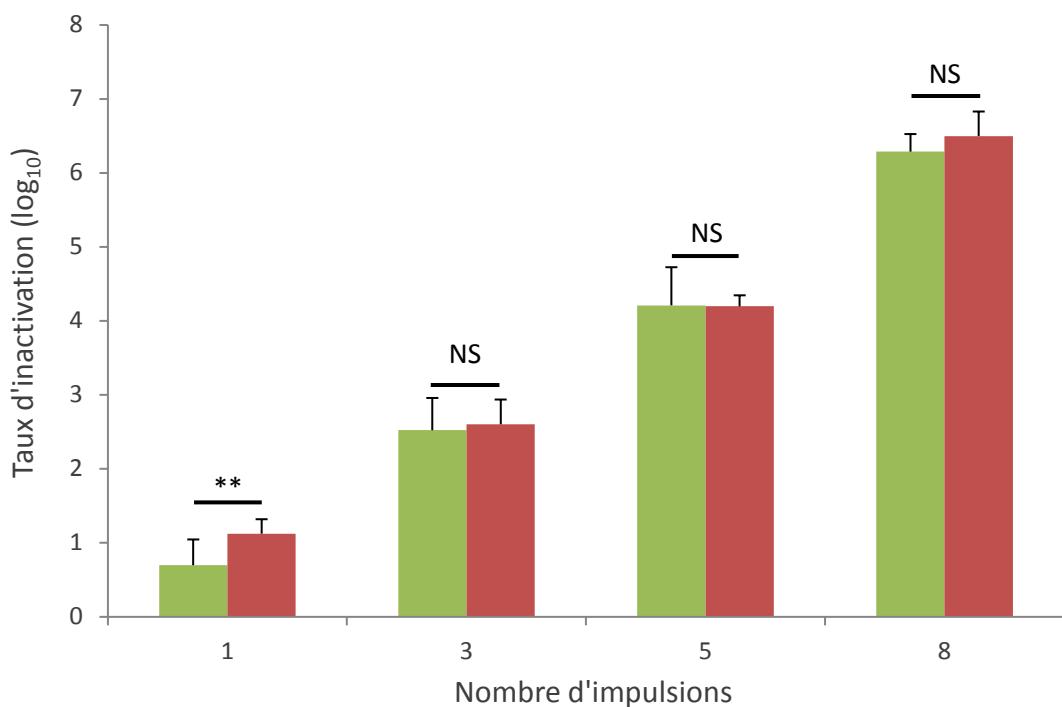


Figure 53 : Différence d'efficacité entre les spores de *Bacillus pumilus* sur gélose (en vert) et en spot (en rouge). L'analyse statistique a été faite avec un test de Student (** P<0,01).

Effet de la distance à la fenêtre d'extraction des électrons

Au vu des applications finales de cette technologie, une distance de 2 cm est la distance minimale de positionnement du produit. De plus, sous la fenêtre d'irradiation, une chambre permettant d'arrêter les électrons et les rayons X est présente. La distance maximale de traitement est de 9 cm.

Différentes distances ont de ce fait été testées : 2 cm, 4 cm, 7 cm et 9 cm.

Une fréquence de répétition des impulsions de 100 Hz (fréquence maximale de la machine) est choisie afin de se laisser la possibilité d'atteindre des cadences de plusieurs dizaines de milliers de produits à l'heure.

Les essais ont été effectués sur des spots secs afin de mimer au mieux l'environnement dans lequel se trouvent les bactéries sur les emballages avant le remplissage de ces derniers.

Les résultats sont présentés en Figure 54. Les essais ont été réalisés en triplicat et à partir de 3 cultures différentes. Il apparaît que lorsque les bactéries se situent à une distance de plus en plus importante de la fenêtre d'irradiation l'efficacité diminue et il faut un nombre plus important d'impulsions pour obtenir le même abattement. Les valeurs moyennes de courant et tension pour chaque essai sont résumées dans le tableau ci-dessous.

Tableau 20 : Valeurs moyennes de tension et de courant pour chaque distance testée.

Distance	Tension moyenne	Courant moyen
2 cm	$266,4 \pm 6$ kV	$5,65 \pm 0,5$ kA
4 cm	$266,4 \pm 9,2$ kV	$5,9 \pm 0,7$ kA
7 cm	$266,4 \pm 12,5$ kV	$5,5 \pm 0,2$ kA
9 cm	$261,2 \pm 10,2$ kV	$5,5 \pm 0,4$ kA

Ces valeurs étant très proches, elles ne peuvent pas expliquer les différences d'efficacité obtenues. L'explication vient du fait que les électrons interagissent avec les molécules de l'air et perdent, à leur contact, de l'énergie. De plus, leur trajectoire va être modifiée et ainsi la densité électronique sera moins importante. Ces deux phénomènes conduisent à une diminution de la dose. Par conséquent, une mesure de dose avec des films radiochromiques de 20 μ m d'épaisseur couplés à un lecteur DR 020 de Crosslinking AB permet de voir l'évolution de ce paramètre avec la distance. Une diminution de la dose déposée par le faisceau en fonction de la distance est constatée, comme illustré en Figure 55. Ceci se traduit par un dépôt moins important de l'énergie au niveau des bactéries et donc une plus faible efficacité. La courbe traduisant l'évolution de l'efficacité en fonction de la dose déposée montre que l'efficacité bactéricide de la technologie est bien liée à la dose (Figure 56).

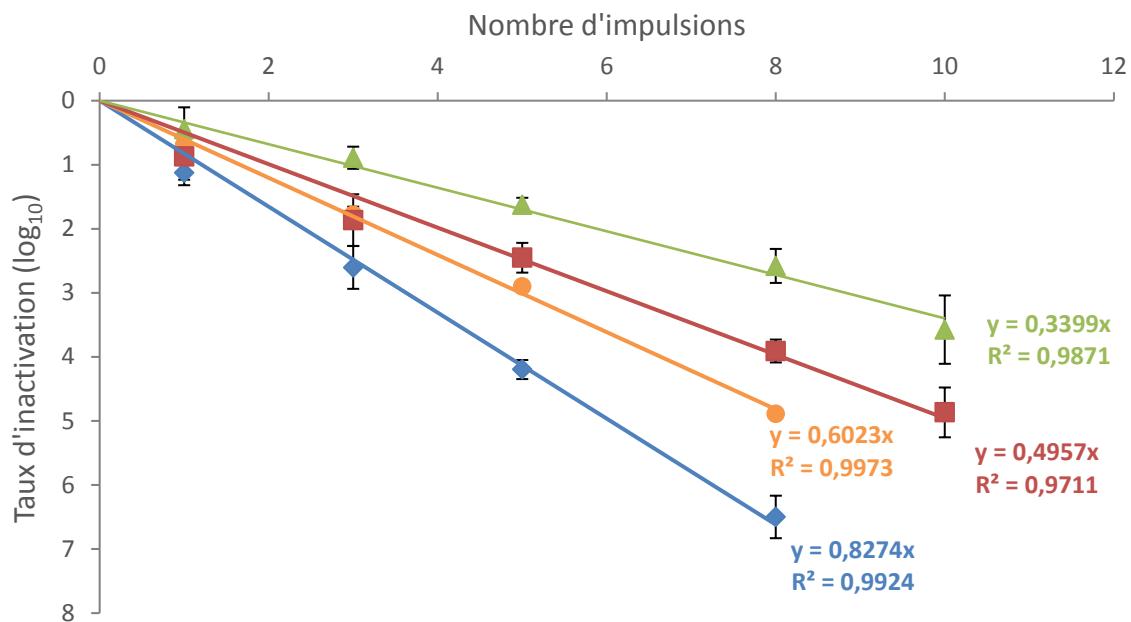


Figure 54: Evolution de l'efficacité sur *Bacillus pumilus* sous forme sporulée en fonction de la distance à la fenêtre d'irradiation.

Les losanges représentent une distance de 2 cm, les ronds de 4 cm, les carrés de 7 cm et les triangles de 9 cm.

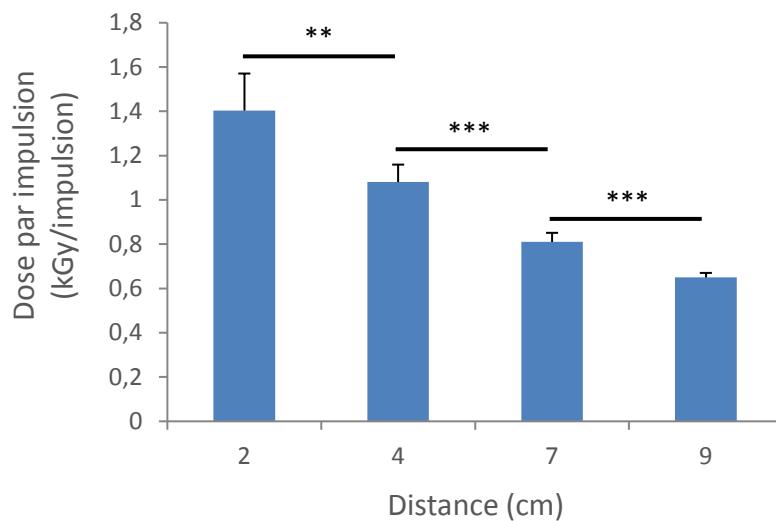


Figure 55 : Evolution de la dose en fonction de la distance. Les dosimètres ont été placés à côté des dépôts de bactéries. L'analyse statistique a été faite avec un test de Student (** P<0,01 ; *** P<0,0001).

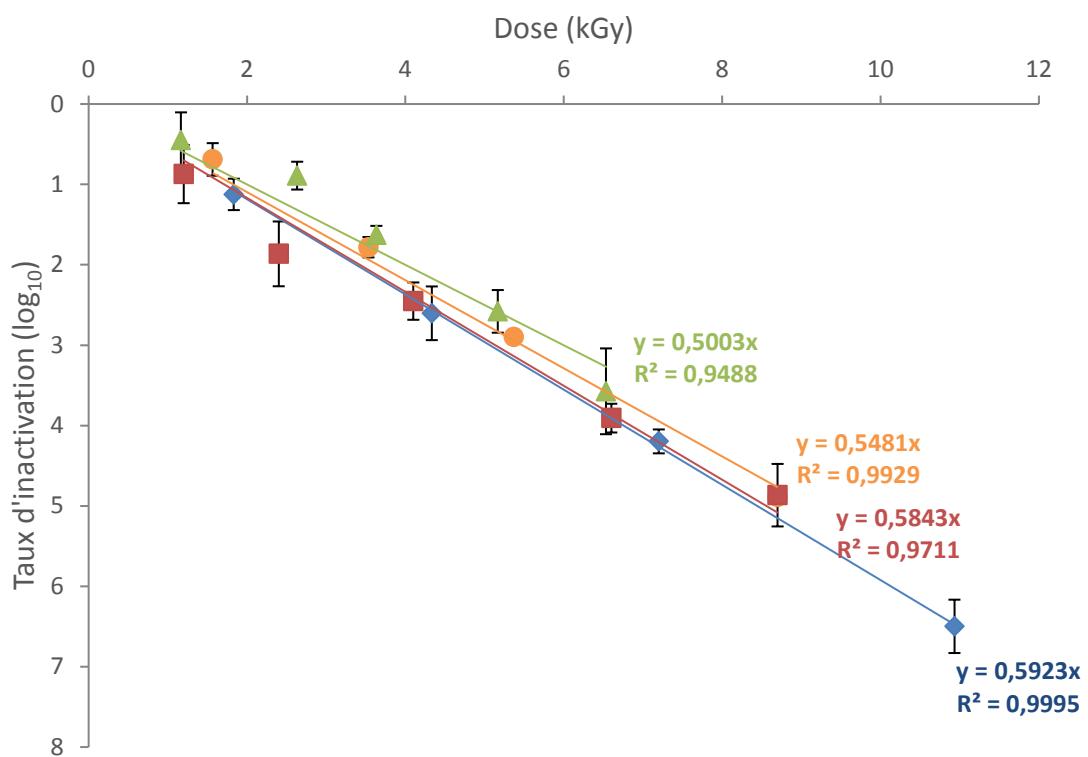


Figure 56 : Evolution de l'efficacité en fonction de la dose déposée et de la distance à la fenêtre d'irradiation. Les losanges représentent une distance de 2 cm, les ronds de 4 cm, les carrés de 7 cm et les triangles de 9 cm.

Effet de la fréquence de répétition des impulsions

Un autre paramètre qui peut être ajusté est la fréquence de répétition des impulsions. Cette dernière peut être modifiée de 1 à 100 Hz. D'après les résultats obtenus précédemment, il a été décidé de travailler à 2 cm de la fenêtre d'irradiation et avec 5 impulsions de 10 ns. La distance choisie est celle pour laquelle l'efficacité est la meilleure et qui, par conséquent, pourra être utilisée pour des applications de décontamination d'emballage. Afin de pouvoir observer et quantifier toute variation d'efficacité, le nombre d'impulsions est choisi de manière à se situer en dessous d'une diminution de $6 \log_{10}$.

Trois fréquences ont été testées : 1 Hz (fréquence minimale), 100 Hz (fréquence maximale que peut atteindre le générateur) et 50 Hz (fréquence intermédiaire). Les résultats présentés en Figure 57 sont obtenus à partir de trois cultures différentes en triplicat. D'après l'analyse statistique réalisée avec le test de Student, il est possible de conclure qu'il n'y a pas de différence significative de l'efficacité du traitement pour les trois fréquences testées. Pour la suite des expériences, la fréquence de répétition la plus élevée, 100 Hz, sera utilisée. A cette fréquence, la puissance consommée est de 2.9 kWh.

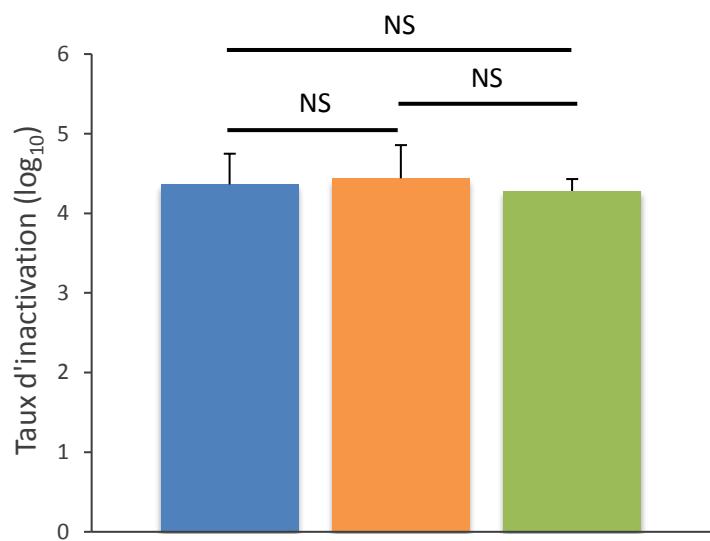


Figure 57 : Evolution de l'efficacité sur *Bacillus pumilus* sous forme sporulée en fonction de la fréquence de répétition des impulsions.

Les résultats pour 1 Hz, 50 Hz et 100 Hz sont, respectivement, en bleu, orange et vert. L'analyse statistique a été faite avec un test de Student (NS $P>0,05$).

Effet de la phase de croissance des microorganismes

Bacillus pumilus sous forme végétative

La courbe de croissance de *Bacillus pumilus* a été déterminée en effectuant des mesures de DO toutes les 30 min à 600 nm. La vitesse spécifique maximale de croissance ($\mu_{x\max}$) et le temps de génération (G) sont calculés à partir de la courbe représentant le logarithme népérien de la DO_{600 nm} mesurée en fonction du temps (Figure 58). La vitesse spécifique de croissance $\mu_{x\max}$ correspond à la pente de la tangente à la courbe en phase exponentielle. Dans notre cas, elle a pour valeur 1,49 h⁻¹. Le temps de génération est le ratio entre ln(2) et le $\mu_{x\max}$. Dans le cas de *Bacillus pumilus*, G est égal à 28 min ce qui signifie que, dans les conditions de culture utilisées, les bactéries se divisent toutes les 28 minutes.

Les deux phases de croissance testées seront la phase exponentielle et la phase stationnaire. Pour cela, 1 impulsion de 10 ns sera appliquée en positionnant les échantillons à 2 cm de la fenêtre d'extraction des électrons. Dans nos conditions de culture, la phase exponentielle de croissance débute lorsque la DO_{600 nm} atteint 0,05. Pour la phase stationnaire, des cultures sur la nuit sont réalisées pour faire les essais.

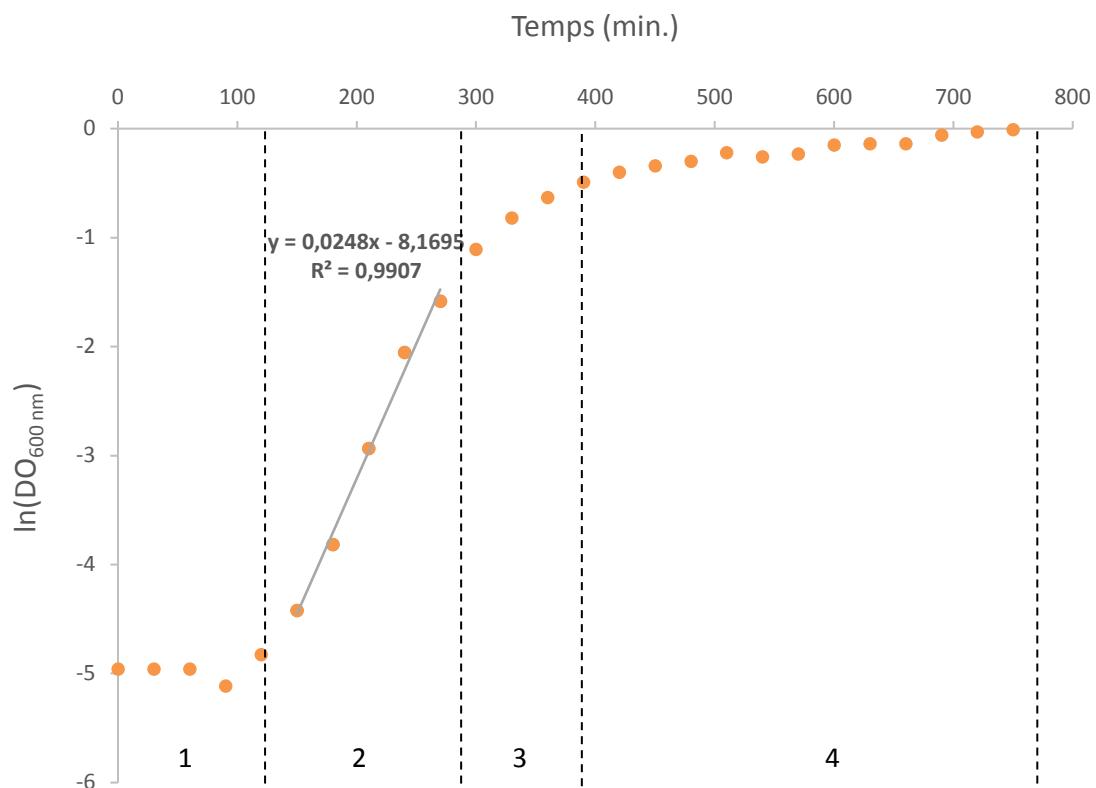


Figure 58 : Courbe de croissance *Bacillus pumilus* ATCC 27142 avec le Logarithme népérien de l'absorbance et l'équation correspondant à la tangente à la courbe (en gris) quand les bactéries sont en phase exponentielle de croissance. 1 : Phase de latence, 2 : phase de croissance exponentielle, 3 : phase de ralentissement, 4 : phase stationnaire.

La Figure 59 révèle que les bactéries cultivées en phase stationnaire de croissance sont plus sensibles au traitement que les bactéries en phase exponentielle. Pour la plupart des bactéries, la sensibilité aux rayonnements ionisants est plus importante en phase active de croissance de par la saturation de la machinerie cellulaire [86]. Cependant, pour certaines souches (*Halobacterium* NRC-1), la résistance maximale aux irradiations (gamma ou faisceaux d'électrons) est plus importante en phase exponentielle. Une explication à cette constatation est que l'élimination des ROS pourrait être plus efficace en phase de croissance active ce qui expliquerait la plus grande survie de *Halobacterium* NRC-1 [156,157]. L'expression des protéines de stress de *Bacillus subtilis* est contrôlée par le facteur de transcription σ^B . Pendant la phase exponentielle, σ^B est inactif et se trouve sous la forme d'un complexe avec le facteur anti-sigma, RsbW. L'activation du facteur de transcription requiert la déphosphorylation de RsbV, une protéine antagoniste, qui vient alors se lier à RsbW [158]. En phase stationnaire, σ^B est actif et est contrôlé de manière post-traductionnelle par une voie régulatrice sensible aux signaux de la phase stationnaire [159]. Sous forme complexé, le facteur anti-sigma, RsbW, joue peut-être un rôle protecteur lors du traitement qui permet d'éviter la dégradation de σ^B ce qui pourrait expliquer la plus grande résistance des bactéries sous forme exponentielle.

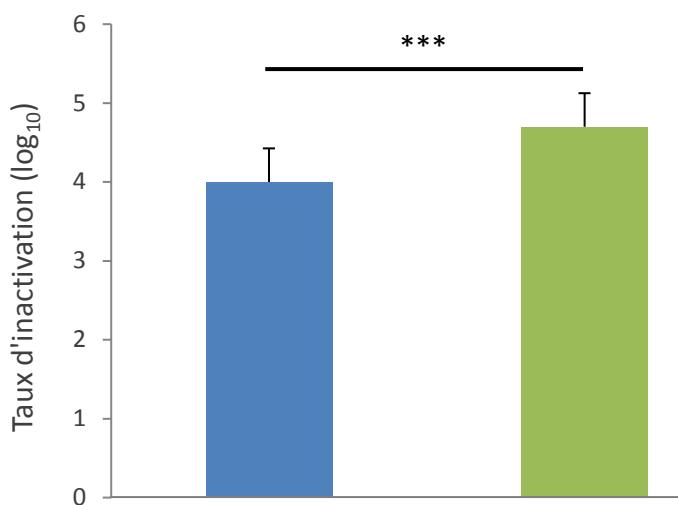


Figure 59 : Evolution de l'efficacité du traitement en fonction de la phase de croissance de *Bacillus pumilus* avec la phase exponentielle de croissance à gauche et la phase stationnaire à droite. L'analyse statistique a été faite avec un test de Student (***) $P<0,0001$.

Bacillus pumilus sous forme sporulée

Le suivi de la germination des spores se fait en mesurant la $DO_{580\text{ nm}}$ du milieu toutes les minutes. Les résultats présentés sur la Figure 60 ont été réalisés en triplicat à partir de 3 cultures de spores différentes. Une diminution de la $DO_{580\text{ nm}}$ est constatée jusqu'à atteindre un seuil après environ 40 min de culture à 37°C. La $DO_{580\text{ nm}}$ finale représente 49% de la $DO_{580\text{ nm}}$ initiale.

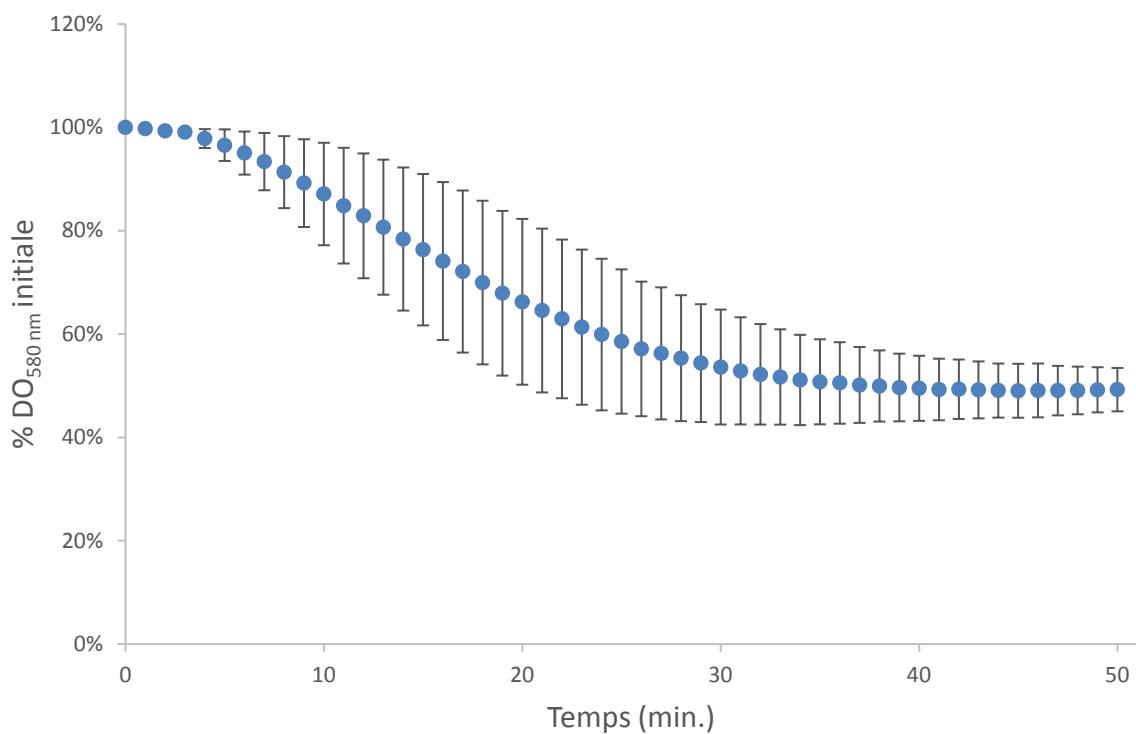


Figure 60 : Suivi de la chute de la DO_{580 nm} de spores de *Bacillus pumilus* dans du milieu LB.

A partir de ces données, des essais ont été réalisés afin d'évaluer si une différence d'efficacité existe entre les spores non germées et les spores cultivées pendant 50 min à 37°C. Les trois cultures utilisées précédemment pour suivre la chute de la DO_{580 nm} des spores sont utilisées pour ces essais. Les résultats sont présentés en Figure 61. Aucune différence significative n'est constatée entre les spores non stimulées thermiquement et les spores incubées 50 min à 37°C.

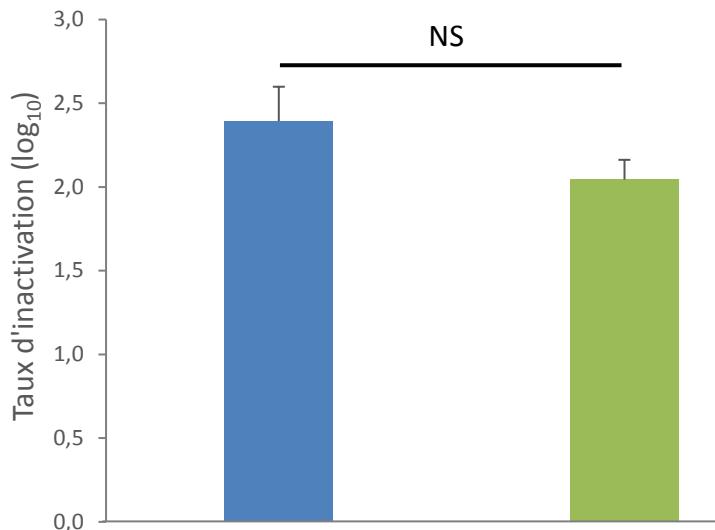


Figure 61 : Evolution de l'efficacité du traitement en fonction de l'état de la spore. A gauche, les spores non incubées et, à droite, les spores incubées 50 min à 37°C. L'analyse statistique a été faite avec un test de Student (NS P>0,05).

Reprise de croissance des microorganismes après traitement de *Bacillus pumilus* sous forme sporulée

L'analyse statistique sur les 3 cultures différentes, réalisée avec le test de Student, ne révèle pas de différence significative de la vitesse spécifique maximale de croissance. La reprise de croissance est évaluée à partir de la courbe représentant l'évolution de la DO_{600 nm} en fonction du temps. Une droite est tracée au niveau du changement de pente. L'équation de la droite permet de déterminer la valeur à laquelle cette droite coupe les abscisses à 0. Les différentes valeurs de temps obtenus sont comparées. Le test de Student ne révèle pas de différence significative entre les différentes cultures (Tableau 21).

Tableau 21 : Evaluation de l'évolution de la vitesse spécifique maximale de croissance et de la reprise de croissance des spores de *Bacillus pumilus* après traitement.

Numéro de l'échantillon	Témoin		Essais	
	$\mu_{x\max}$ (h ⁻¹)	Reprise de croissance (min)	$\mu_{x\max}$ (h ⁻¹)	Reprise de croissance (min)
1	1,4	416	2,0	306
2	0,9	437	1,3	388
3	1,3	309	1,4	346

3.6. Détermination des mécanismes responsables de l'inactivation bactérienne

Après avoir évalué l'influence de différents paramètres (machine ou environnement et état de la bactérie) sur l'efficacité d'éradication des bactéries, cette partie a pour objectif de déterminer les mécanismes impliqués dans l'inactivation bactérienne.

L'étude est réalisée en utilisant différentes techniques de microscopies :

- L'AFM (Microscopie à Force Atomique) permet une observation en condition native de la bactérie ainsi que des mesures de ses propriétés physiques (rugosité, adhésion).
- La MEB (Microscopie Electronique à Balayage) révèle la morphologie de la bactérie de manière complémentaire à l'AFM et permet d'évaluer le volume de l'objet observé par cette technique.
- La MET (Microscopie Electronique en Transmission) donne accès à l'architecture des différents compartiments intracellulaires.

Enfin, l'étude de l'intégrité de l'ADN, par l'utilisation de la PFGE, et des protéines, par l'emploi de gel SDS-PAGE et de MS/MS complètera l'étude.

3.6.1. Etude des effets au niveau de la paroi bactérienne

L'intégrité de l'enveloppe cellulaire des bactéries traitées sous forme végétative ou de spores a été évaluée grâce à l'utilisation des techniques de microscopie décrites ci-dessus. Si l'enveloppe est endommagée différents composés peuvent entrer ou sortir de la cellule. Ces échanges entre le milieu extérieur et l'intérieur de la bactérie peuvent conduire à la mort du microorganisme si celui-ci n'est pas capable de réparer les dommages.

Bacillus pumilus sous forme végétative

Le choix de l'AFM liquide permet d'observer la surface des bactéries en condition native, c'est-à-dire sans utiliser de traitement chimique. La Figure 62 montre un exemple typique d'images obtenues en AFM. Pour les bactéries non traitées (Figure 62 a et b), la présence de crêtes est observée (en pointillé sur le zoom b). Après l'exposition aux faisceaux d'électrons, les crêtes sont toujours visibles (en pointillé sur le zoom d) et aucun matériel ne semble avoir été extrait de l'enveloppe.

Une évaluation de la rugosité à partir de 3 cultures et 3 images par culture est effectuée. Pour les bactéries témoins, une rugosité de $2,2 \pm 0,7$ nm est obtenue et $1,9 \pm 0,4$ nm, pour les bactéries traitées (Figure 63). L'analyse statistique ne révèle pas de différence significative entre les deux conditions.

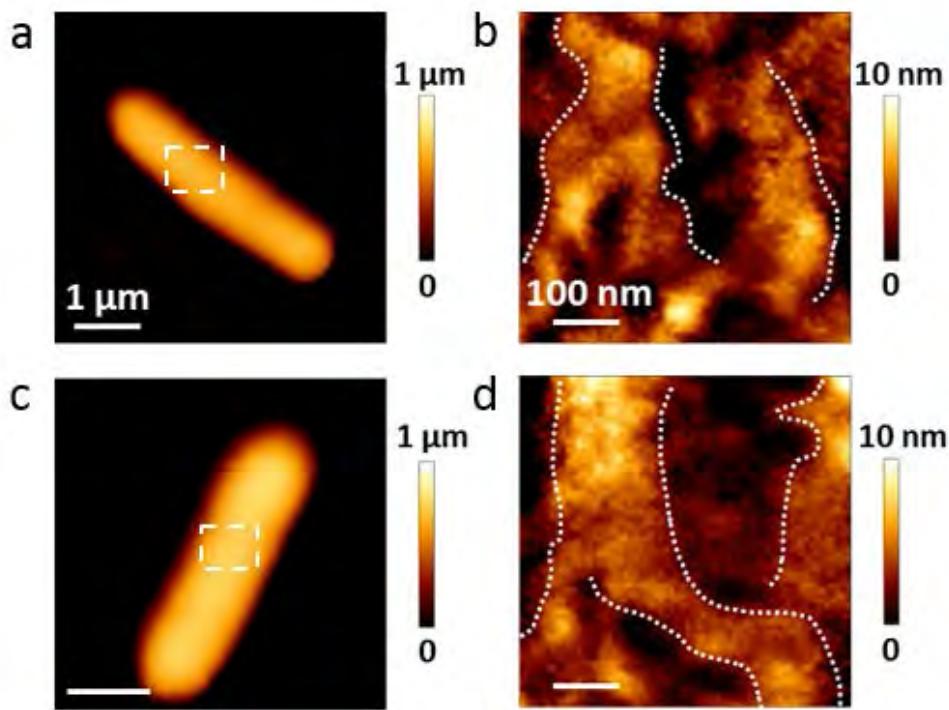


Figure 62 : Observation des bactéries végétatives par AFM liquide avant et après traitement par le faisceau d'électrons. a) Image d'une bactérie non traitée, b) zoom sur une partie de la bactérie avec l'observation des crêtes de surface (lignes en pointillées), c) Image d'une bactérie traitée avec 2 impulsions de 10 ns à 2 cm et 100 Hz, d) zoom sur une partie de la bactérie traitée avec en pointillées blanc les crêtes de surface. Les images choisies sont représentatives de l'ensemble des bactéries observées.

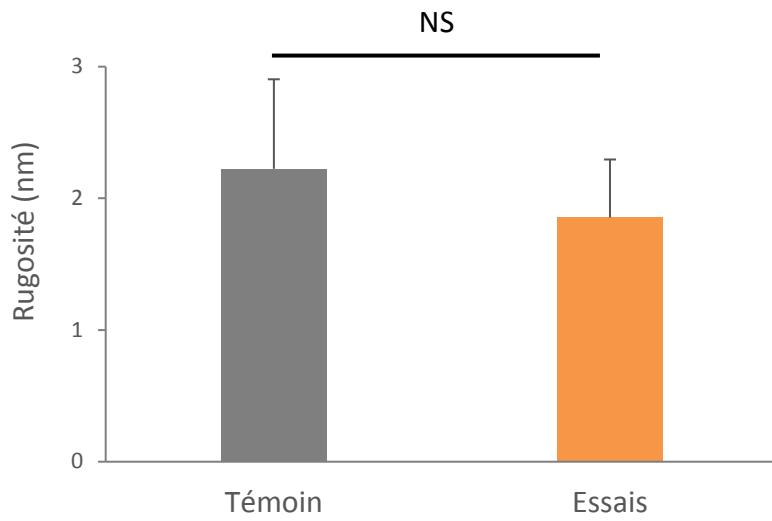


Figure 63 : Analyse statistique de la rugosité réalisée sur 13 bactéries par condition. En gris, les bactéries témoins et, en orange, les bactéries traitées. L'analyse statistique a été faite avec un test de Student (NS $P>0,05$).

Une autre donnée qui peut être évaluée est la mesure d'hydrophobicité. En effet, la pointe utilisée pour l'AFM a été fonctionnalisée avec une molécule constituée d'une chaîne de 12 carbones, le 1-Dodécymercaptane ou 1-Dodecanethiol (Sigma-Aldrich) [40] donnant à la pointe un caractère hydrophobe. Si la paroi de la bactérie est hydrophobe, la pointe va adhérer. Au contraire si la surface est hydrophile, la pointe va subir une force de répulsion. Par conséquent, les courbes obtenues en AFM traduisant le parcours de la pointe auront une allure différente. Les résultats des mesures de l'adhésion sont présentés en Figure 64 et révèlent une modification significative de l'hydrophobicité après le traitement par les faisceaux d'électrons. En effet, la force d'adhésion pour les bactéries non traitées est de $1,3 \pm 0,5$ nN et de $0,5 \pm 0,3$ nN pour les bactéries traitées. Cette diminution traduit une dégradation des molécules présentes à la surface de la paroi suite au traitement. La conséquence d'une perte d'hydrophobicité de la bactérie est une diminution de son caractère invasif par la modification des propriétés d'adhésion, d'agrégation ou de flocculation. Le caractère hydrophobe de la paroi des bactéries est dû à la présence d'acides teichoïques liés à la paroi (WTA) et d'acides lipoteichoïques (LTA). La diminution de l'hydrophobicité de *Bacillus pumilus* suite au traitement peut s'expliquer par une dégradation de ces acides [27,160].

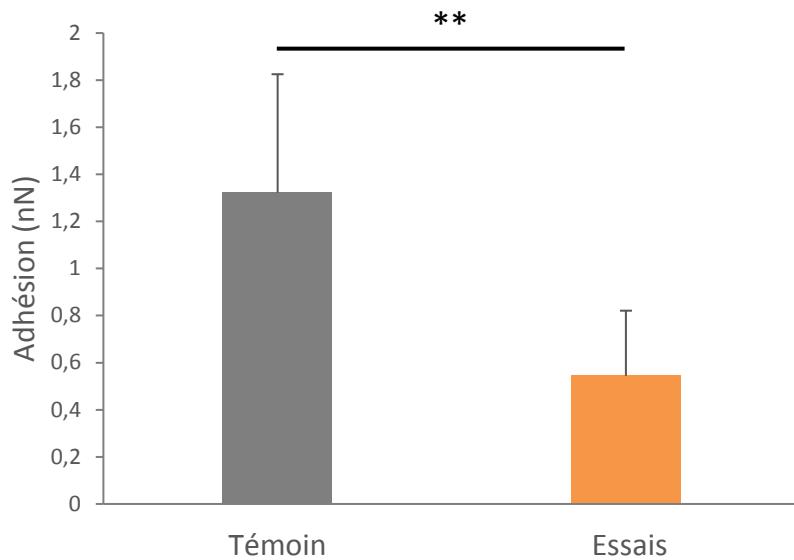


Figure 64 : Analyse de l'hydrophobicité des bactéries réalisée sur 10 bactéries par condition. En gris, les bactéries témoins et, en orange, les bactéries traitées. L'analyse statistique a été faite avec un test de Student (** P<0,01).

L'enveloppe des bactéries a été observée par microscopie électronique à balayage (MEB). La Figure 65 est un exemple d'image obtenue avec un grossissement 50 000x. L'observation de la paroi des bactéries par MEB ne permet pas d'observer de dommages au niveau de la paroi.

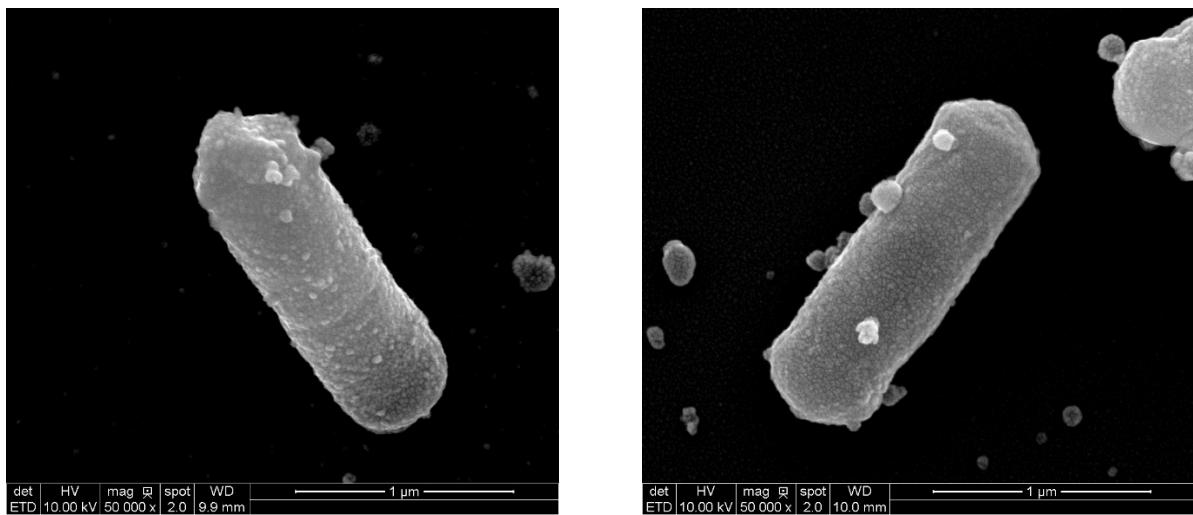


Figure 65 : Observation de l'enveloppe de *Bacillus pumilus* par MEB.

L'image de gauche montre la morphologie de la bactérie avant d'avoir subi un traitement par faisceau d'électrons pulsés. La photographie de droite est une bactérie traitée avec 10 impulsions de 10 ns à 100 Hz et 2 cm. Les images choisies sont représentatives de l'ensemble des bactéries observées.

Si la MEB ne permet qu'une observation de la morphologie de *Bacillus pumilus*, la MET permet d'observer l'organisation interne de la bactérie. La Figure 66 ne révèle pas de différence entre les bactéries traitées et les bactéries non traitées. La présence d'une membrane intacte est observée après le traitement. Il ne semble pas y avoir eu de fuite de matériel dans le milieu suite à l'application de 10 impulsions de 10 ns à 100 Hz et 2 cm. L'organisation interne ne semble pas non plus être modifiée par le traitement.

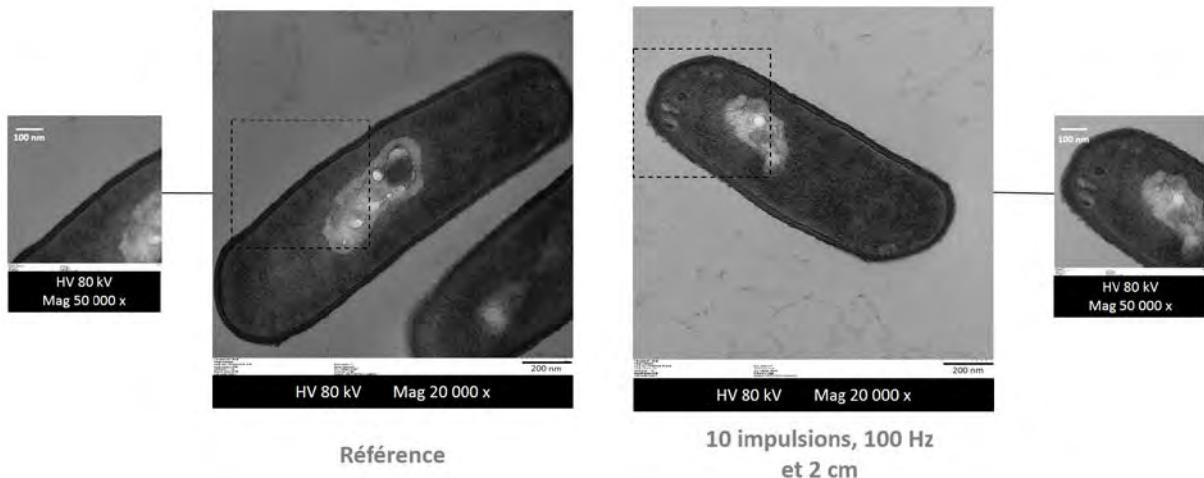


Figure 66 : Observation de l'organisation de *Bacillus pumilus* par MET.

L'image de gauche montre la morphologie de la bactérie avant d'avoir subi un traitement par faisceau d'électrons pulsés. La photographie de droite est une bactérie traitée avec 10 impulsions de 10 ns à 100 Hz et 2 cm. L'échelle de taille pour les vues globales est de 200 nm et de 100 nm pour les zooms. Les images choisies sont représentatives de l'ensemble des bactéries observées.

Afin de compléter ces résultats, il est possible grâce à une molécule intercalante à l'ADN, l'iodure de propidium (PI), de mettre en évidence une perméabilisation de la paroi. En effet, si la membrane est perméabilisée, la molécule peut entrer dans la cellule et s'intercaler avec les acides nucléiques. Cette molécule fluorescente est fréquemment utilisée pour révéler une augmentation de la perméabilité des membranes cellulaires [161,162]. Au contact de l'ADN ou de l'ARN, son rendement quantique de fluorescence augmente ce qui va permettre de distinguer les bactéries perméabilisées des autres. Dans ce travail, seule la perméabilisation irréversible de la paroi a été étudiée. La perméabilisation réversible de la paroi est une observation qui doit se faire immédiatement après le traitement en ayant mis le PI au contact des bactéries pendant le traitement. Le temps séparant le lieu du traitement et le lieu d'observation est de 2 heures, temps trop important pour ce type d'expérimentation.

Les résultats obtenus sont présentés en Figure 67. Le calcul de la fluorescence est fait avec le logiciel Image J. La valeur moyenne d'intensité obtenue sur 644 bactéries du témoin est de 1483 ± 310 et de 1803 ± 488 pour les 425 bactéries analysées issues de l'essai. Cette expérience n'a pas mis en évidence de perméabilisation irréversible de la paroi suite au traitement par faisceau d'électrons.

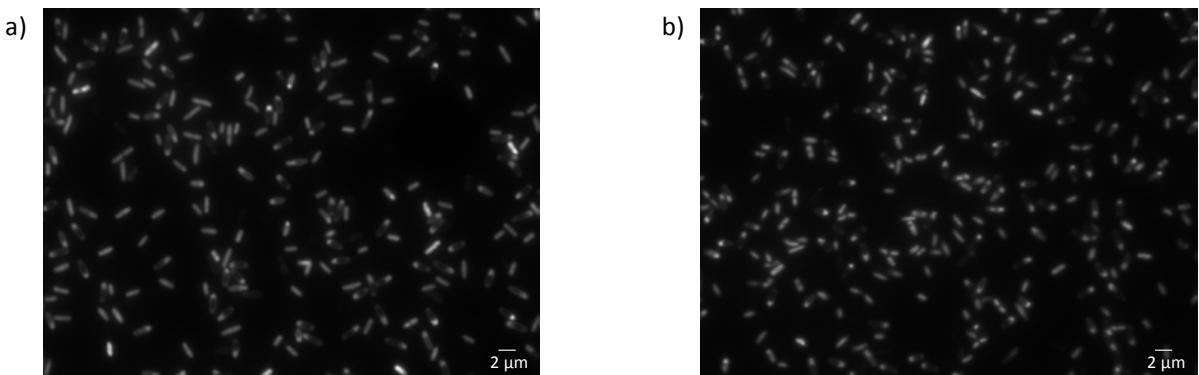


Figure 67 : Observation de la forme végétative de *Bacillus pumilus* avant (a) et après (b) l'application de 2 impulsions de 10 ns à 2cm et 100 Hz.

Un autre moyen utilisé pour la révélation de perméabilisation est de mesurer la quantité d'ADN et de protéines dans le surnageant [6]. Comme dans notre cas nous n'avons pas pu mesurer la perméabilisation réversible avec le PI, cette technique a été employée. En effet, si des pores sont apparus lors de l'application des décharges, il est possible que des protéines ou de l'ADN se retrouvent à l'extérieur de la bactérie, dans le surnageant. Un spectromètre nécessitant peu de volume (NanoDropTM, Thermo ScientificTM) est utilisé. Les mesures se font à 260 nm pour l'ADN et 280 nm pour les protéines.

Les résultats sont présentés dans le Tableau 22. La comparaison des valeurs d'absorbance obtenues pour l'échantillon témoin (T) et les échantillons essais (E1 et E2) ne permet pas de révéler la présence d'ADN ou de protéines dans le milieu extracellulaire. En effet, les valeurs sont similaires pour tous les échantillons.

Cet essai n'a pas mis en évidence de perméabilisation réversible ou irréversible.

Tableau 22 : Résultats de la mesure d'absorbance à 260 nm pour l'ADN et 280 nm pour les protéines.

Échantillons	Q_{ADN} (ng/ μ L)	A_{260}	A_{280}	$\frac{A_{260}}{A_{280}}$
T	129,6	2,592	1,666	1,56
E1	116,3	2,326	1,473	1,58
E2	119,2	2,384	1,496	1,59

Bacillus pumilus sous forme sporulée

L'AFM liquide permet d'observer la surface des spores mais également d'analyser certaines propriétés de la paroi. La Figure 68 montre un exemple typique d'images obtenues. Pour les spores non traitées (a et b), la présence de crêtes sporales est observée (en pointillé sur le zoom b). Ces crêtes sont classiquement observées en AFM (ou en MEB et MET) sur bactéries sporulées [40]. Elles sont constituées par les protéines du manteau et il est supposé qu'elles jouent un rôle dans l'adhésion des spores. Après l'exposition au faisceau d'électrons, les crêtes sporales sont toujours visibles (en pointillé sur le zoom d).

Une évaluation de la rugosité à partir de 3 cultures de spores et 3 images par culture est effectuée (Figure 69). Pour les spores témoins, une rugosité de $4,8 \pm 1,5$ nm est obtenue et $5,8 \pm 2,8$ nm, pour les spores traitées. L'analyse statistique ne révèle pas de différence entre les deux conditions. Afin de compléter ces résultats, d'autres techniques de microscopie ont été utilisées.

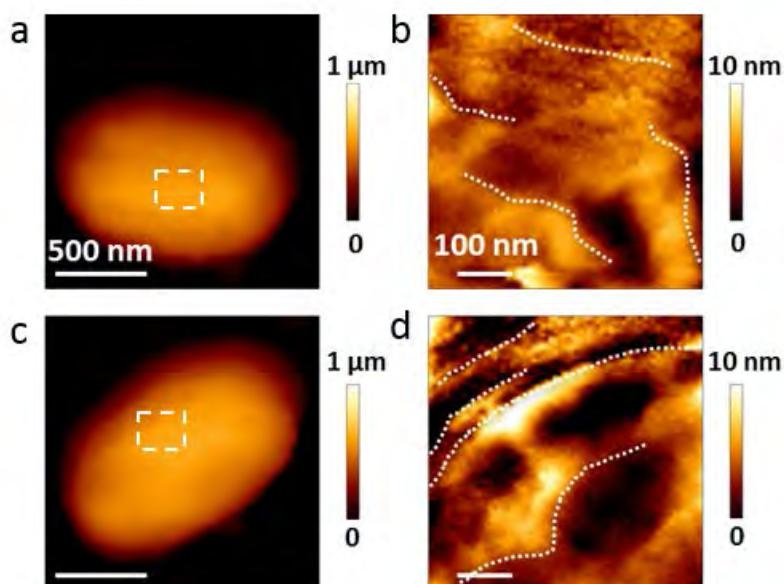


Figure 68 : Observation de la paroi des spores par AFM liquide avant et après traitement par le faisceau d'électrons.
a) Image d'une spore non traitée, b) zoom sur une partie de la spore (indiqué par le carré blanc) indiquant les crêtes de surface (lignes en pointillées), c) Image d'une spore traitée avec 10 impulsions de 10 ns à 2 cm et 100 Hz, d) zoom sur une partie de la spore traitée avec en pointillées blanc les crêtes sporales. Les images choisies sont représentatives de l'ensemble des bactéries observées.

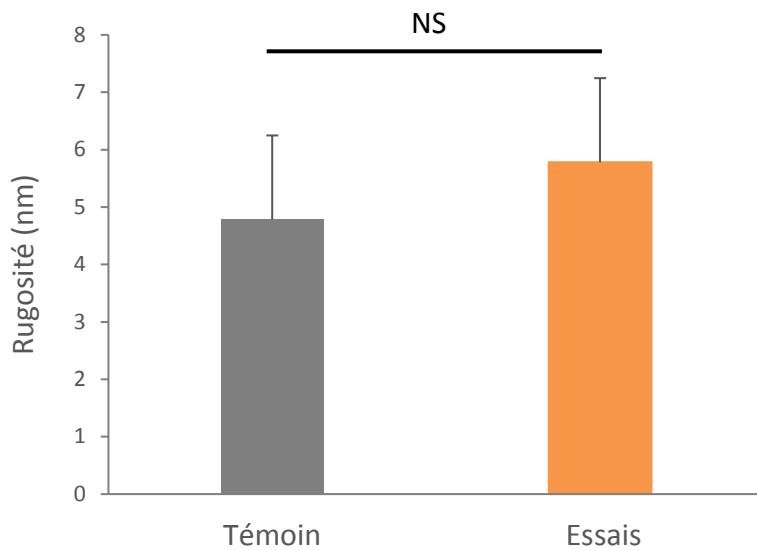


Figure 69 : Analyse statistique de la rugosité réalisée sur 15 spores par condition. En gris, les spores témoins et, en orange, les spores traitées. L'analyse statistique a été faite avec un test de Student (NS $P>0,05$).

La paroi des bactéries a été observée par MEB. La Figure 70 est un exemple d'image obtenue avec un grossissement 50 000x. Elle met en évidence la présence de crêtes sporales pour les spores témoin comme pour les spores irradiées et une morphologie similaire entre les échantillons. La MEB ne révèle pas de dommage au niveau de la paroi.

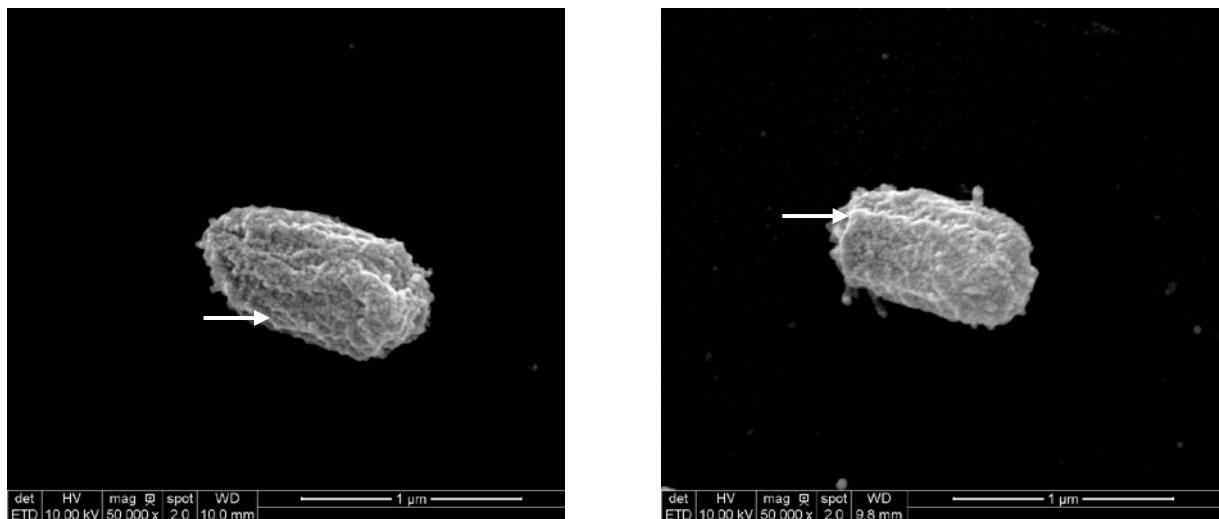


Figure 70 : Observation de la paroi des spores de *Bacillus pumilus* par MEB.
L'image de gauche montre la morphologie de la spore avant d'avoir subi un traitement par faisceau d'électrons pulsés. La photographie de droite est une spore traitée avec 10 impulsions de 10 ns à 100 Hz et 2 cm. Les flèches indiquent la présence de crêtes sporales. Les images choisies sont représentatives de l'ensemble des bactéries observées.

Un changement de taille de la bactérie avant et après traitement peut traduire un dommage consécutif à l'expulsion de matériel ou, au contraire, l'absorption de molécules présentes dans l'environnement de la spore. Le calcul du volume des spores a été réalisé en assimilant les spores à des ellipsoïdes de révolution. La largeur de la bactérie et la hauteur sont considérées identiques. Le calcul du volume V des spores est obtenu grâce à la formule suivante :

$$V = \frac{4}{3} \times \pi \times L/2 \times l/2 \times h/2 \quad (\text{équation 12})$$

Avec V : volume en μm^3

L : longueur de la bactérie en μm

l : largeur de la bactérie en μm

h : hauteur de la bactérie (égale à l) en μm

Les images obtenues en MEB avec un grossissement de 5 000x et l'analyse statistique sur un échantillon de 80 bactéries montrent que le traitement par faisceaux d'électrons n'a pas d'effet sur le volume des spores de *Bacillus pumilus* (Figure 71 a). En effet, le volume moyen pour les spores témoin est de $0,21 \pm 0,02 \mu\text{m}^3$ et de $0,21 \pm 0,03 \mu\text{m}^3$ pour les spores irradiées. La répartition des volumes sur l'ensemble des échantillons analysés est également identique entre les témoins et les essais (Figure 71 b).

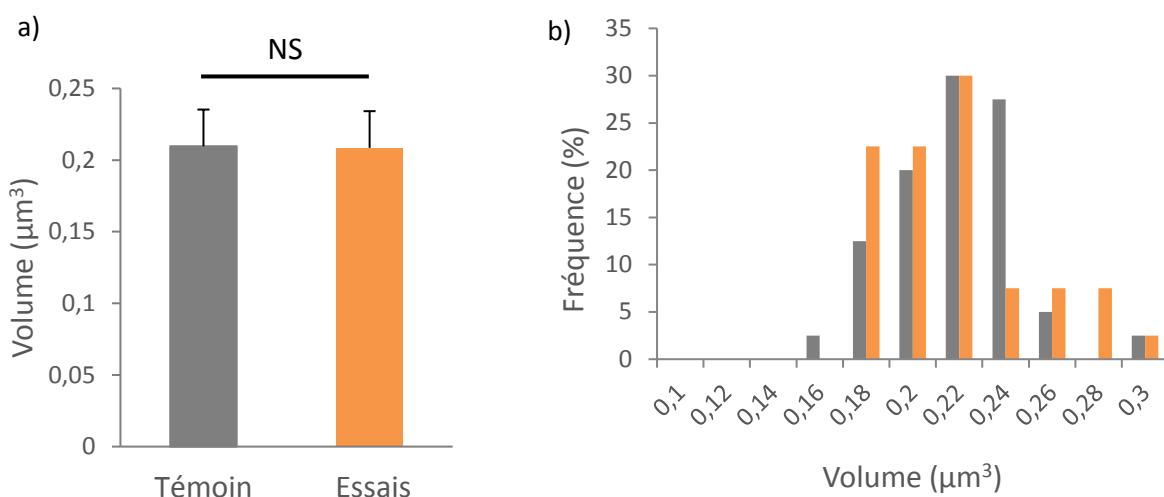


Figure 71 : Détermination du volume des spores à l'aide des images de MEB.

a) La mesure du volume des spores des échantillons témoins (en gris) et des échantillons exposés à 10 impulsions de 10 ns, 100 Hz et 2 cm (en orange). Il a été supposé que la largeur des spores correspondait à la hauteur de ces dernières pour évaluer le volume. Une étude statistique en utilisant le test de Student a été menée sur les 80 bactéries mesurées par condition (NS $P>0,05$).

b) La fréquence de distribution des volumes calculés est reportée.

Des expériences complémentaires ont été réalisées en MET. La partie externe de la spore, nommée le manteau, est constituée de différentes couches de protéines (Figure 72). Le centre de la spore apparaît en foncé et représente le cœur de la spore. Il est composé notamment d'ADN très condensé. Entre le manteau et le cœur se trouve le cortex. Ces trois parties sont distinctement visibles sur les images de MET. Aucune différence d'organisation n'est observée après traitement. De plus, aucun matériel n'est visible à l'extérieur de la spore après le traitement ce qui aurait pu indiquer des dommages induits par le traitement.

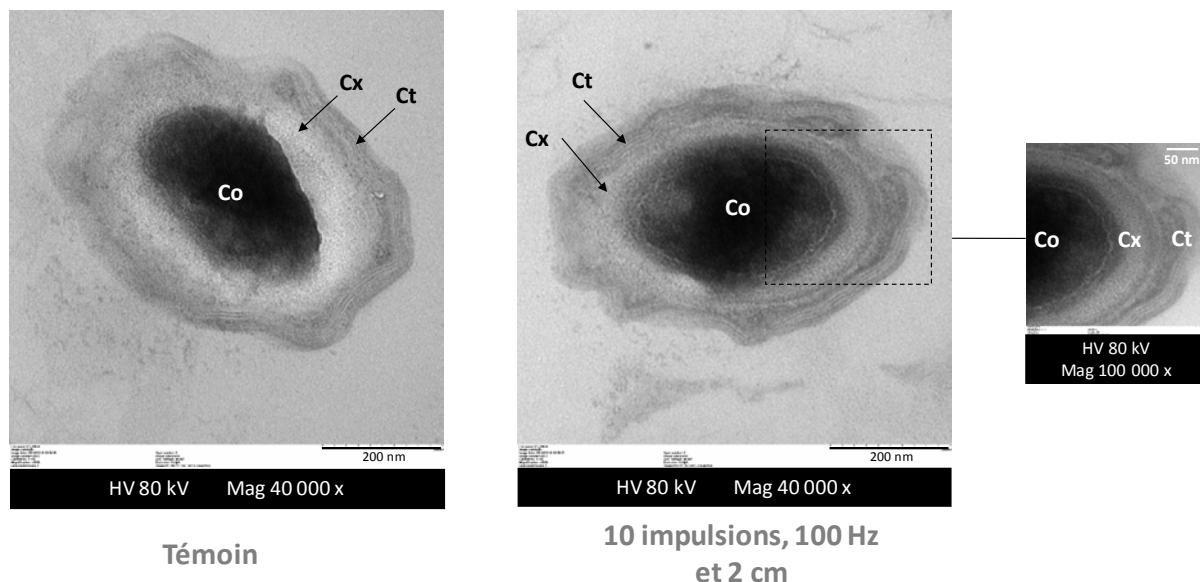


Figure 72 : Observation de l'organisation des spores de *Bacillus pumilus* par MET.

L'image de gauche montre la morphologie de la spore témoin. La photographie de droite est une spore traitée avec 10 impulsions de 10 ns à 100 Hz et 2 cm. Les images sont représentatives de l'ensemble des bactéries observées.

Co : Cœur (Core), Cx : Cortex et Ct : Manteau (Coat).

Les outils de microscopie employés ont permis de révéler une perte de l'hydrophobilité de la paroi des bactéries sous forme végétative après le traitement. Cette modification peut être expliquée par une dégradation d'au moins une partie des acides teichoïques constitutifs de la paroi. Une modification de la morphologie des bactéries ainsi que de leur architecture intracellulaire n'a pas été mise en évidence. Pour les spores, aucune modification de leur volume ou morphologie n'est révélée. L'architecture interne des spores irradiées semble identique à celle du témoin.

3.6.2. Etude des effets au niveau de l'ADN

Le but de cette partie est d'étudier les effets du traitement au niveau de l'ADN des bactéries. La taille du génome étant importante, l'électrophorèse en champ pulsé (PFGE) a été choisie car cette technique permet de séparer de gros fragments d'ADN (voir le chapitre sur le Principe général de l'électrophorèse en champ pulsé).

Avant de réaliser des essais sur le génome de la bactérie, il a été nécessaire de déterminer l'enzyme de restriction à utiliser pour digérer l'ADN en fragments et de valider l'activité des différentes endonucléases qui seront utilisées dans ce travail.

Choix de l'enzyme de restriction

Pour le choix de l'enzyme de restriction, un clivage du génome de *Bacillus pumilus* SAFR-032 (souche entièrement séquencée et proche de celle utilisée dans l'étude) avec différentes enzymes est simulé sur le site <http://insilico.ehu.eus/digest/index.php?mo=Bacillus>. Le choix s'est porté sur l'enzyme de restriction NotI qui reconnaît la séquence 5'-GCGGCCGC-3'. Elle permet d'obtenir 16 fragments de tailles suffisamment différentes pour réaliser une bonne séparation sur gel, comme le montre le Tableau 23 sur lequel on peut observer :

- la position du clivage par NotI au niveau de la séquence de *Bacillus pumilus* SAFR-032 (colonne 1)
- la longueur des fragments obtenus (colonne 2)
- le classement par taille des fragments (colonne 3)
- la répartition sur gel PFGE à 1,2% d'agarose des fragments avec une proposition de marqueur de taille, en l'occurrence Lambda (colonne 4).

Tableau 23 : Résultats de la simulation de digestion du génome de *Bacillus pumilus* SAFR-032 par l'enzyme de restriction NotI.

Cleavage Position	Length of sequence	Length of sequence (sorted)	PFGE
64987	64990	664455	727.5 kb
334299	269312	536724	485.5 kb
542061	207762	501515	388.0 kb
853795	311734	401904	291.0 kb
1390519	536724	311734	194.0 kb
1395986	5467	269312	97.0 kb
1407111	11125	227085	48.5 kb
1478345	71234	207762	
1880249	401904	145086	
2025335	145086	144839	
2147441	122106	122106	
2374526	227085	71234	
2519365	144839	64990	
2538492	19127	19127	
3040007	501515	11125	
3704462	664455	5467	

PFGE
1.2 % Agarose
Lambda Ladder

La digestion du génome de *Bacillus pumilus* ATCC 27142 a été effectuée avec NotI. Le calcul de la taille des différents fragments de l'ADN de *Bacillus pumilus* est réalisé à partir des trois gels obtenus (Figure 73). Le logiciel Image J est utilisé. La taille des fragments du génome est obtenue grâce au marqueur de taille Lambda (Bio-Rad), comme proposé par la simulation. La Figure 74 valide l'activité de l'enzyme Not I par l'obtention de fragment d'ADN et montre la répartition de la taille des différents fragments qui s'échelonnent de 41 kb à 829,2 kb. La taille des fragments est identique d'une culture à l'autre. Le protocole mis au point est reproductible (Figure 74). La taille des fragments obtenue est reportée dans le Tableau 24. La somme de la taille des fragments est égale à 3,4 Mb. En comparaison, la taille du génome de *Bacillus pumilus* SAFR-032 (souche qui a été séquencée, source NCBI) est de 3,7 Mb.

Les résultats obtenus avec la simulation de digestion de la souche *Bacillus pumilus* SAFR-032 (Tableau 23) montrent que plusieurs fragments sont très proches les uns des autres (voir la flèche et la taille des fragments entourés). Cette observation que certaines bandes ne peuvent pas être distinguées sur le gel PFGE peut expliquer l'écart de 0,3 Mb. Sur la Figure 73, la bande numéro 11 possède l'intensité la plus importante et correspond à la taille des fragments entourés dans la simulation.

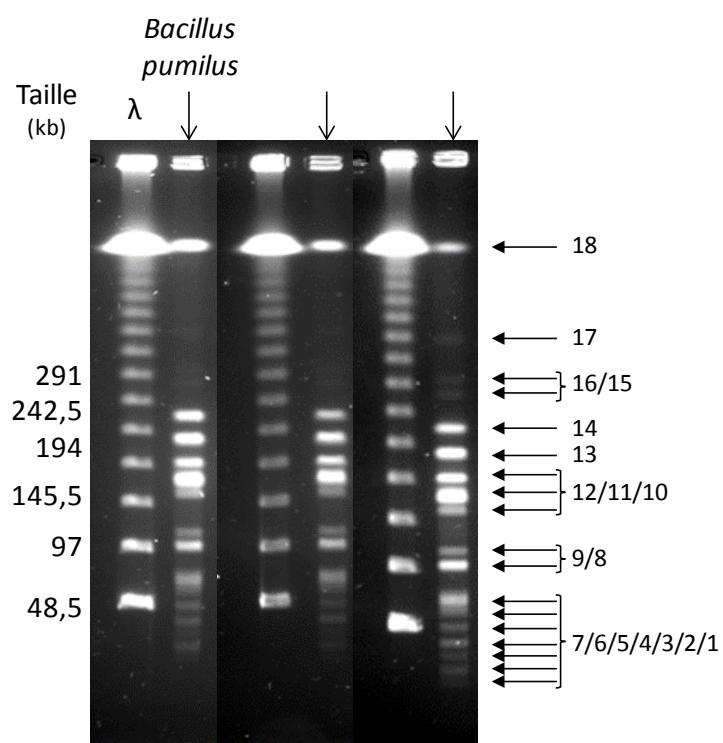


Figure 73 : PFGE avec, à gauche, le marqueur de taille Lambda et, à droite, le génome extrait des spores de *Bacillus pumilus* après digestion par NotI.

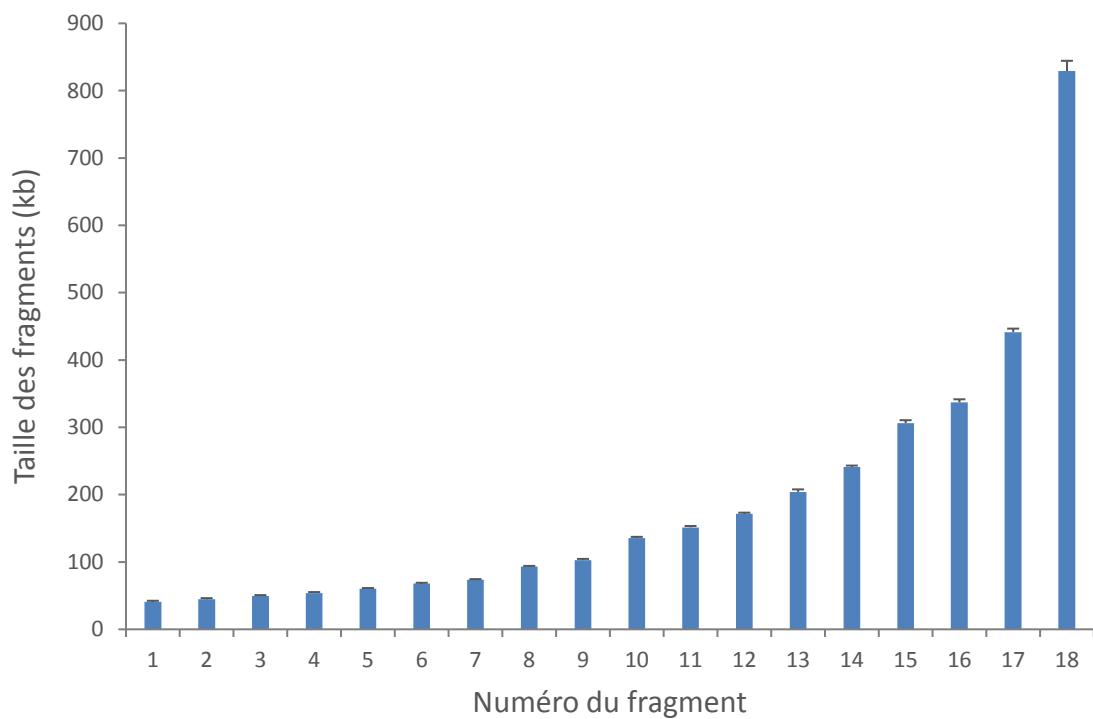


Figure 74 : Répartition de la taille des différents fragments du génome de *Bacillus pumilus* après digestion par NotI obtenus à partir de 3 PFGE différentes.

Tableau 24 : Taille des fragments de *Bacillus pumilus* obtenus après digestion avec NotI

Numéro du fragment	Taille des fragments (kb)
1	829,2
2	441,4
3	337
4	306,3
5	241
6	204,1
7	171,6
8	151,4
9	135,6
10	102,7
11	93,4
12	73,6
13	67,8
14	60,5
15	53,9
16	49,4
17	44,6
18	41

Vérification de l'activité des Endonucléases

Des essais préliminaires ont été réalisés pour valider l'activité des Endonucléases IV et V sur de l'ADN endommagé par l'exposition à des stress comme les UV ou la présence de H_2O_2 dans le milieu. Les endonucléases sont des nucléases qui coupent un acide nucléique en fragment plus courts. Elles sont capables de couper au sein de la chaîne contrairement aux exonucléases qui n'attaquent que les nucléotides situés aux extrémités des fragments.

L'Endonucléase IV permet de révéler la présence de sites apurinique/apyrimidique, dits sites AP. Ces sites correspondent à la présence, sur un brin d'ADN, d'une délétion d'une base purine (adénine ou guanine) ou pyrimidine (thymine ou cytosine). L'enzyme va reconnaître ce type de dommage et créer une coupure sur le brin complémentaire. La T4 Endonucléase V permet de révéler la présence de dimères de pyrimidine. Cela correspond à une lésion moléculaire résultant d'une réaction photochimique entre des résidus de thymines ou cytosines adjacents, sur un même brin d'ADN. L'endonucléase coupe le brin opposé au dommage détecté (Figure 75).

La Nucléase S1, quant à elle, détecte les cassures simple brin. Elle est donc utilisée pour révéler la création de ce type de cassure par le faisceau d'électrons. La combinaison de cette enzyme avec l'une des endonucléases présentées précédemment permet également de révéler les cassures simple brin induites par la présence de site AP (site apurinique ou apyrimidique) ou de dimères de pyrimidine.

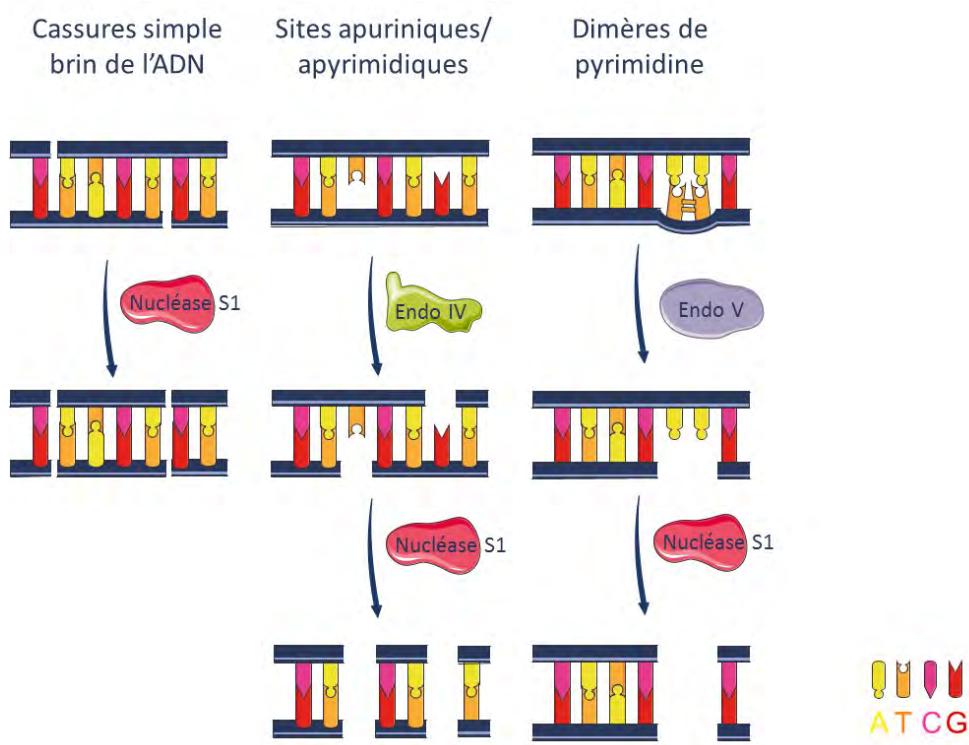


Figure 75 : Principe de fonctionnement de la Nucléase S1 et des Endonucléases IV et V.
C : Cytosine, G : Guanine, A : Adénine et T : Thymine.

La détection des dommages se fait sur le gel grâce à la comparaison des bandes des échantillons exposés par rapport au témoin (intensité de fluorescence, forme, position). Comme l'ADN n'est pas dénaturé, seules les cassures double brin pourront être détectées. Les enzymes utilisées pour révéler les différents types de dommage sont présentées dans le Tableau 25.

Tableau 25: Enzymes utilisées pour révéler les différents types de dommages en utilisant la PFGE.

Type de dommages				
	Cassures double brin induit par le traitement	Cassures simple brin induit par le traitement	Site AP	Dimères de pyrimidine
Nucléase S1	-	+	+	+
Endonucléase IV	-	-	+	-
Endonucléase V	-	-	-	+

Le gel présenté en Figure 76 révèle que le témoin (puits 1) présente différentes bandes correspondant aux différents brins d'ADN digérés par l'enzyme de restriction NotI. Le protocole utilisé n'induit donc pas de cassures double brin qui auraient conduit à une absence de bandes et à l'apparition de « smears ». Les mêmes bandes, avec une intensité similaire, sont obtenues avec l'ajout de la Nucléase S1 (puits 2). Cette dernière permettant de détecter les cassures simple brin, il est ainsi possible de conclure que le protocole mis au point n'induit pas non plus de cassures simple brin.

Dans le cas des échantillons traités avec les UV à une longueur d'onde de 254 nm, le puits 3 a un profil similaire à celui du puits 1. Le traitement n'a donc pas induit de cassures double brin. L'ajout de la Nucléase S1 conduit à l'apparition de « smears » (puits 4). Le traitement par UV induit donc des cassures simple brin. L'ajout de l'Endonucléase IV (puits 5) ne révèle pas la présence de sites AP étant donné le profil identique à celui du témoin. L'addition de la Nucléase S1 et de l'Endonucléase IV (puits 6) conduit à l'apparition d'un « smear ». Son profil est identique à celui obtenu en puits 4 où seulement la Nucléase S1 était présente. Par conséquent, l'ajout de l'Endonucléase IV ne change pas le profil ce qui signifie que le traitement UV ne conduit pas à la création de site AP. Dans le puits 7, l'ajout de l'Endonucléase V montre la présence de dimères de pyrimidine avec un « smear » qui sort presque du gel, l'absence totale de bande et une intensité de signal faible. De nombreux fragments sont sortis du gel du fait de leur faible taille. Le traitement UV a donc conduit à la création d'un nombre important de dimères de pyrimidine qui sont révélés même en l'absence de la Nucléase S1. Des dimères de pyrimidine ont dû se créer sur des brins complémentaires conduisant à des coupures de part et d'autres des brins et, ainsi, à la création de fragments d'ADN. L'ajout de la Nucléase S1 révèle une absence totale de signal (puits 8). Tous les fragments d'ADN sont sortis du gel ce qui signifie qu'ils étaient de très petite taille et que la quantité de dimères de pyrimidine était très importante suite au traitement.

Les mêmes essais ont été réalisés en présence de peroxyde d'hydrogène (H_2O_2). Le puits 9 étant similaire au puits témoin, aucune cassure double brin n'est révélée. L'ajout de la Nucléase S1 (puits 10) montre la présence d'un léger « smear » traduisant la présence de cassures simple brin. Le puits 11 est similaire au puits témoin ce qui ne permet pas de conclure quant à la création de sites AP suite au traitement. Par contre, le puits 12 où la Nucléase S1 est ajoutée à l'Endonucléase IV révèle la présence de ces sites par l'apparition d'un « smear ». La présence de l'Endonucléase seule ne montre pas de création de dimères de pyrimidine suite au traitement étant donné que le profil est identique à celui du témoin. L'ajout de la Nucléase S1 permet de révéler la présence de dimères de pyrimidine, en quantité moins importante que les sites AP.

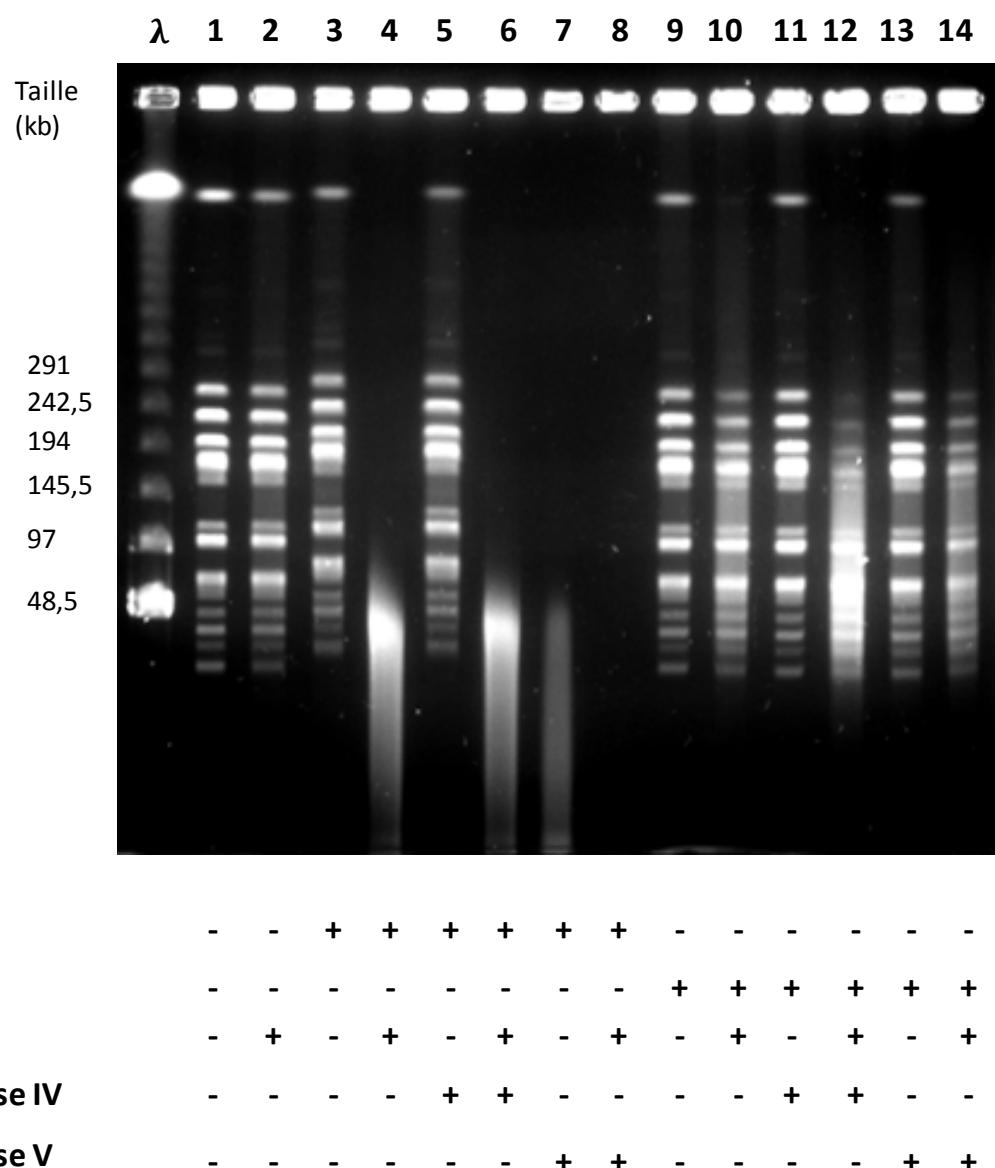


Figure 76 : PFGE sur l'ADN extrait de *Bacillus pumilus* sous forme sporulée n'ayant pas subi de traitement par les faisceaux d'électrons.

Le marqueur de taille est Lambda (48,5-1 000 kb, Bio-Rad).

En conclusion, les UV conduisent à la création de cassures simple brin et à une quantité importante de dimères de pyrimidine. Le peroxyde d'hydrogène induit des cassures simple brin, la création de sites AP et de dimères de pyrimidine. Ces constatations confirment ce qui a déjà été montré dans la littérature et viennent ainsi valider l'activité des enzymes utilisées par la suite pour l'analyse de l'intégrité de l'ADN [128,163,164].

Bacillus pumilus sous forme végétative

Deux types de traitement ont été appliqués pour les bactéries végétatives :

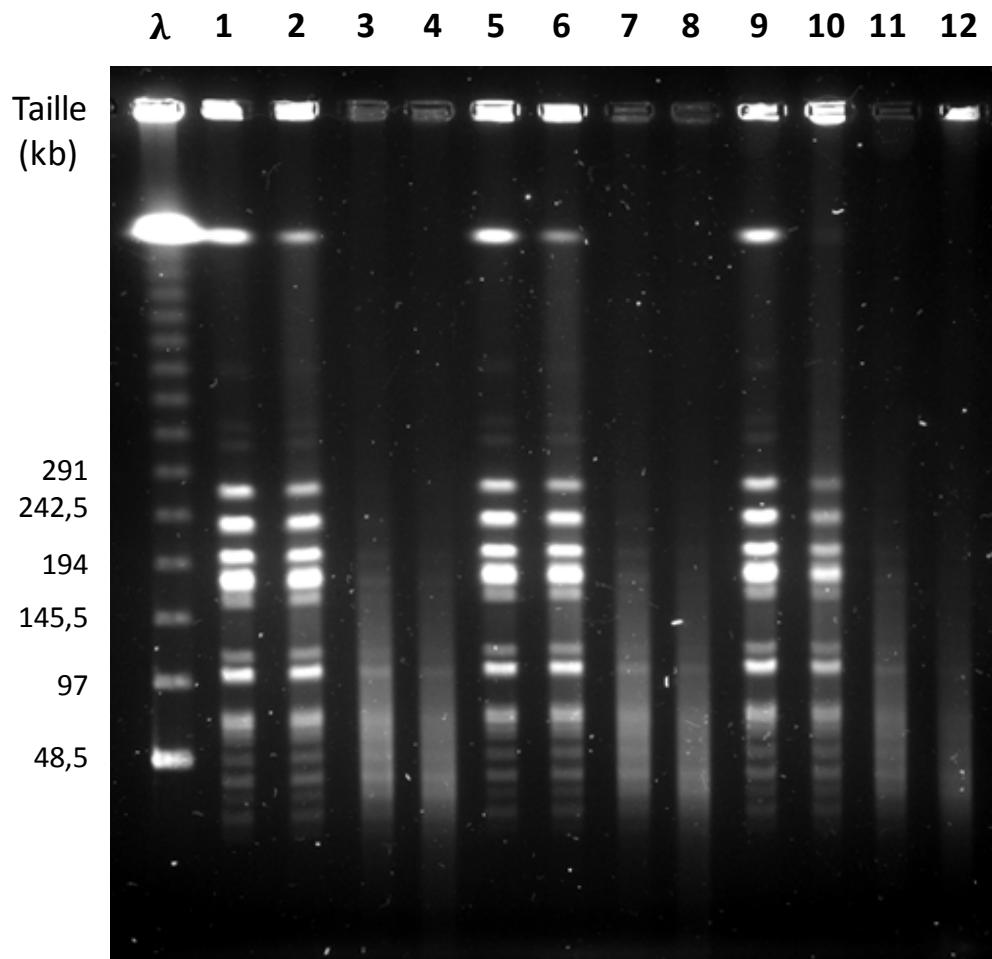
1. 2 impulsions de 10 ns à 100 Hz et 2 cm de la fenêtre d'extraction ce qui correspond à la dose permettant d'avoir une diminution logarithmique de $6 \log_{10}$
2. 10 impulsions de 10 ns à 100 Hz et 2 cm de la fenêtre d'extraction ce qui correspond à la dose déposée pour les essais sur les spores.

Pour le premier type de traitement, la diminution logarithmique obtenue est de $6,7 \pm 0,4 \log_{10}$. Le gel est présenté en Figure 77. Les puits 1 et 2 valident le protocole en ne révélant pas de cassures double ou simple brin, respectivement. Dans le puits 3, il apparaît clairement que des cassures double brin surviennent après l'exposition au faisceau d'électrons. Le puits 4, par l'ajout de la Nucléase S1, permet de montrer que des cassures simple brin sont apparues car le « smear » obtenu a migré plus loin que sans l'ajout de l'enzyme.

Les puits 5 et 6 confirment que l'ajout de l'Endonucléase IV n'induit pas de cassures double brin (puits 5) ni simple brin (puits 6) à l'ADN du témoin. En effet, les bandes obtenues sont comparables à celles obtenues pour les témoins des puits 1 et 2. La présence de l'Endonucléase IV dans le puits 7 montre la présence d'un « smear » qui a un profil identique à celui du puits sans Endonucléase IV (puits 3). Dans le puits 8, l'ajout de la Nucléase S1 ne permet pas de révéler de cassures simple brin supplémentaires par rapport au puits 5 ce qui signifie que le traitement ne semble pas induire la création de sites AP.

Les puits 9 et 10 confirment que l'ajout de l'Endonucléase V n'induit pas de cassures double brin ni simple brin, respectivement. En effet, les bandes obtenues sont comparables à celles obtenues pour les témoins des puits 1 et 2. Le profil de migration obtenu au niveau du puits 11 en présence de l'Endonucléase V ne présente pas de différence avec celui obtenu dans le puits 3. Cependant, l'ajout de la Nucléase S1 permet de constater que le « smear » obtenu migre plus loin dans le gel comparativement au puits 4. Des dimères de pyrimidine sont mis en évidence.

Le traitement par faisceau d'électrons induit donc des cassures simple et double brin ainsi que la création de dimères de pyrimidine au niveau de l'ADN des bactéries traitées.



Traitements	-	-	+	+	-	-	+	+	-	-	+	+
Nucléase S1	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+
Endonucléase IV	-	-	-	-	+	+	+	+	-	-	-	-
Endonucléase V	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+

Figure 77: PFGE sur *Bacillus pumilus* sous forme végétative sans traitement (puits 1, 2, 5, 6, 9 et 10) et après 2 impulsions de 10 ns à 100 Hz et 2 cm (puits 3, 4, 7, 8, 11 et 12).

Pour le second traitement, la dose déposée est équivalente à celle déposée lors du traitement des spores. Elle est 5 fois plus élevée que celle déposée lors du premier type de traitement. Le gel obtenu est présenté en Figure 78. La réalisation de deux essais avec des doses déposées différentes va permettre de comparer si l'augmentation de la dose conduit à une augmentation des dommages. Les puits 1 et 2 permettent de révéler que le protocole d'extraction de l'ADN ne conduit pas à la création de cassures double et simple brin, respectivement. Les fragments obtenus après le traitement avec NotI sont en effet ceux attendus. Le puits 3 correspond aux bactéries traitées avec 10 impulsions de 10 ns. Les bandes correspondant aux fragments d'ADN ont complètement disparues et un « smear » d'intensité très faible est présent en bas du gel. Par conséquent, le traitement appliqué a créé des cassures double brin au niveau de l'ADN.

Dans le puits 4, la Nucléase S1 est présente. Un « smear » est également obtenu. Il est très difficile de percevoir une différence entre le puits 3 et le puits 4.

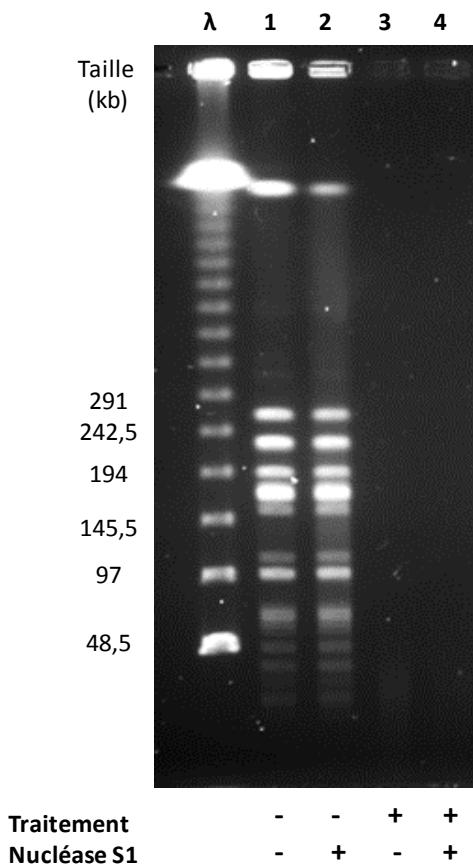


Figure 78 : PFGE sur *Bacillus pumilus* sous forme végétative sans traitement (puits 2 et 3) et après 10 impulsions de 10 ns à 100 Hz et 2 cm (puits 4 et 5).
Le marqueur de taille est Lambda (48,5-1 000 kb ; Bio-Rad).

La comparaison des gels montre que les cassures au niveau de l'ADN sont plus importantes quand la dose déposée augmente. En effet, le « smear » obtenu au niveau des puits 3 et 4 pour 10 impulsions est presque entièrement sorti du gel contrairement au gel obtenu dans le cas de 2 impulsions.

Bacillus pumilus sous forme sporulée

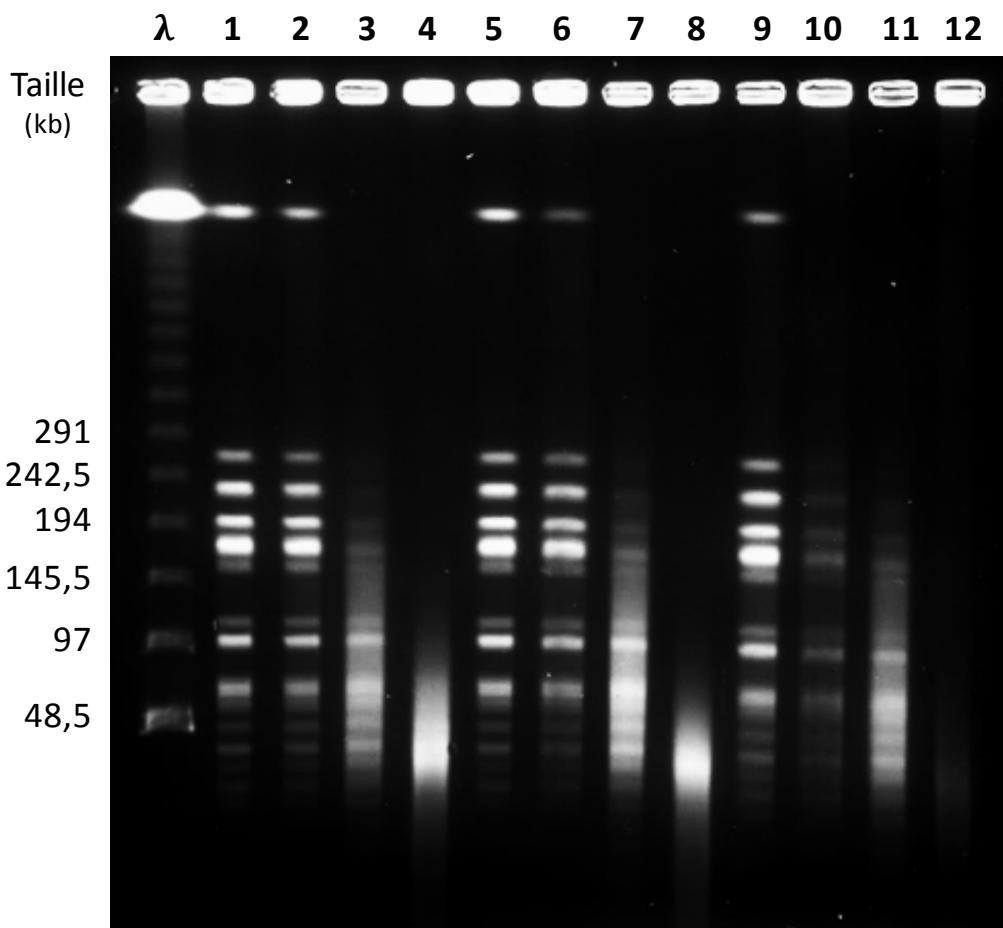
Les échantillons ont été traités avec 10 impulsions de 10 ns à 100 Hz et à une distance de 2 cm de la fenêtre d'irradiation. Une comparaison de l'intégrité de l'ADN entre les échantillons témoin et les essais est présentée en Figure 79.

Les puits 1 et 2 permettent de valider que le protocole d'extraction de l'ADN ne conduit pas à des cassures double ou simple brin, respectivement. Les profils de migration sont identiques

à celui obtenu en Figure 73. Il est donc possible d'utiliser ces puits comme référence pour l'analyse des puits essais. Dans le puits 3, aucune enzyme, hormis NotI, n'est mise au contact de l'ADN. La présence de « smears » dans ce puits met donc en évidence la présence de cassures double brin suite au traitement. L'ajout de la Nucléase S1, dans le puits 4, montre l'apparition d'un « smear » plus bas dans le gel par rapport à celui du puits 3. L'ajout de la Nucléase S1 conduit à la production de plus petits fragments révélant que des cassures simple brin sont produites par le traitement.

Les puits 5 et 6 ne montrent pas de différences avec le puits 1 et 2, puits témoins. Les bandes sont distribuées de manière identique et aucun « smear » n'est visible. L'ajout de l'Endonucléase IV dans le milieu et l'absence de modifications des bandes montrent que le protocole ne crée pas de site AP. Les échantillons vont ainsi pouvoir être analysés. Dans le puits 7, un « smear » apparaît ce qui révèle une modification de l'ADN. L'aspect de ce « smear » est identique à celui du puits 3. L'ajout de l'Endonucléase IV ne conduit pas à de nouvelles cassures des fragments. Le puits 9 présente également un « smear » mais avec un profil identique à celui du puits 5. Par conséquent, l'ajout de l'Endonucléase IV ne révèle pas de sites AP produits par le traitement par faisceaux d'électrons.

Les puits 9 et 10 servent de validation du protocole d'extraction. Le puits 9 ne montre pas de dégradation de l'ADN. Le protocole n'induit pas une création importante de dimères de pyrimidine qui conduirait à la création de cassures double brin en présence de l'Endonucléase V. Le profil obtenu en puits 11 est semblable à celui du puits 3 et ne permet pas de mettre en évidence la présence de dimères de pyrimidine suite au traitement. Par contre, dans le puits 10, une perte de signal au niveau des bandes est observée. L'ajout de l'Endonucléase V combiné à l'action de la Nucléase S1, révèle la présence de dimères de pyrimidine sur l'échantillon témoin. Par conséquent, la dégradation plus importante des fragments du puits 12 par rapport au puits 4 peut révéler soit la présence de dimères de pyrimidine soit la dégradation des fragments au contact de cette enzyme. Ce résultat est assez surprenant car un tel phénomène ne sera pas observé avec les spores préparées pour les décharges électriques.



Traitement	-	-	+	+	-	-	+	+	-	-	+	+
Nucléase S1	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+
Endonucléase IV	-	-	-	-	+	+	+	+	-	-	-	-
Endonucléase V	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+

Figure 79 : PFGE sur les souches de *Bacillus pumilus* sous forme sporulée sans traitement (puits 2, 3, 6 et 7) et après 10 impulsions de 10 ns à 100 Hz et 2 cm (puits 4, 5, 8 et 9).
Le marqueur de taille est Lambda (48,5-1 000 kb ; Bio-Rad).

En conclusion, différents types de lésions ont été détectées. Chez les bactéries végétatives, des cassures double et simple brin ont été mises en évidence ainsi que la présence de dimères de pyrimidine. L'occurrence de ces cassures est liée à la dose reçue par la bactérie. Pour les spores, des cassures double et simple brin ainsi que la possible présence de dimères de pyrimidine suite au traitement ont été révélées par les gels. Ces dommages permettent d'expliquer, au moins en partie, le phénomène conduisant à la mort bactérienne. Tout d'abord, les cassures double brin sont des lésions létales majeures. Elles peuvent être réparées par la bactérie soit par recombinaison homologue soit par jonction d'extrémités non homologues. La recombinaison homologue consiste en la résection 5'-3' des brins d'ADN, puis, un ADN homologue est utilisé pour recopier la région perdue lors de la cassure. La réparation par jonction d'extrémités non

homologues soude directement les deux extrémités de la liaison [165]. *Ce type de dommages est le plus complexe à réparer pour la bactérie. Les autres dommages détectés (cassures simple brin et dimères de pyrimidine) sont également des facteurs conduisant à l'activation du système de réparation de l'ADN. Si les enzymes de réparation ne sont pas fonctionnelles, ces réparations ne pourront pas se faire ce qui conduira à la mort de la bactérie.*

3.6.3. Etude des effets au niveau des protéines

Les protéines jouent un rôle essentiel pour la survie des bactéries que ce soit pour réparer les dommages à l'ADN ou encore réguler les échanges avec le milieu extérieur. Il est donc également important de s'intéresser à l'effet du traitement sur les protéines.

Deux méthodes ont été utilisées :

- L'analyse sur gel SDS-PAGE
- L'analyse par spectrométrie de masse.

Le gel SDS-PAGE permet d'évaluer l'intégrité des protéines. La migration des bandes dans ce type de gel dépend du poids moléculaire des protéines. Une dégradation peut conduire à la création de fragments de taille inférieure, qui vont migrer plus vite dans le gel. La disparition de certaines bandes, leur atténuation ou l'apparition de « smear » par rapport au puits témoin sont révélateurs de cassures au niveau des liaisons peptidiques. Si trop peu de protéines sont affectées, il ne sera pas possible de les détecter. L'identification des protéines dégradées ne sera pas possible. Ces deux limites de la méthode peuvent être compensées par l'utilisation de la spectrométrie de masse (MS). Après digestion des protéines, ces dernières vont être dégradées en petits fragments peptidiques. La MS révèle l'intensité des peptides présents et permet de faire une comparaison entre les échantillons témoin et les échantillons irradiés. Il est ainsi possible de quantifier et d'identifier les protéines dont la proportion varie entre le témoin et l'essai.

Ces analyses ont été effectuées en triplicat sur la forme végétative et la forme sporulée de *Bacillus pumilus*.

Bacillus pumilus sous forme végétative

Gel SDS-PAGE

Pour être certain de déposer la même quantité de protéines dans chaque puits, un dosage des protéines est effectué à l'aide du kit DC Protein Assay II (Bio-Rad). Les résultats du dosage sont présentés dans le Tableau 26. Les concentrations de protéines dans les échantillons sont similaires pour les triplicatas ce qui montre la reproductibilité du protocole d'extraction.

Les essais ont été réalisés en triplicata à partir de trois cultures différentes.

Tableau 26 : Dosage des protéines contenues dans les échantillons à partir de différentes cultures de *Bacillus pumilus* végétative avant et après le traitement avec 2 impulsions de 10 ns à 2 cm et 100 Hz.

Végétatives	Concentration en protéines des échantillons (mg/mL)				
	1	2	3	Moyenne sans dilution	Ecart-type
Témoin culture 1, dilution 1/4	0,696	0,669	0,631	2,661	0,131
Essai culture 1, dilution 1/4	0,718	0,718	0,772	2,943	0,125
Témoin culture 2, dilution 1/4	0,712	0,669	0,658	2,719	0,115
Essai culture 2, dilution 1/4	0,745	0,696	0,707	2,863	0,103
Témoin culture 3, dilution 1/4	0,756	0,685	0,712	2,871	0,142
Essai culture 3, dilution 1/4	0,729	0,723	0,739	2,921	0,033

Le gel obtenu sur les trois cultures de *Bacillus pumilus* est présenté ci-dessous. Dans les puits numérotés 1, 3 et 5, il s'agit des témoins. Les différentes bandes obtenues sont comparées avec celles des puits 2, 4 et 6, respectivement, qui correspondent à des bactéries ayant reçues 2 impulsions à 2 cm et 100 Hz. Le profil est identique entre les témoins et les essais. Par conséquent, il n'est pas possible de révéler de modifications au niveau des protéines extraites par le gel SDS-PAGE, soit parce qu'il n'y a pas de modifications, soit parce qu'elles sont minimales et de ce fait non décelables. Le génome de *Bacillus pumilus* comprend 3894 gènes dont 3741 codant pour des protéines (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genome>). La technique d'extraction ne permet pas d'extraire toutes les protéines, comme nous le verrons dans le paragraphe suivant. Il est difficile sur un gel SDS-PAGE de pouvoir observer un changement au niveau des protéines si une majorité de protéines n'est pas touchée.

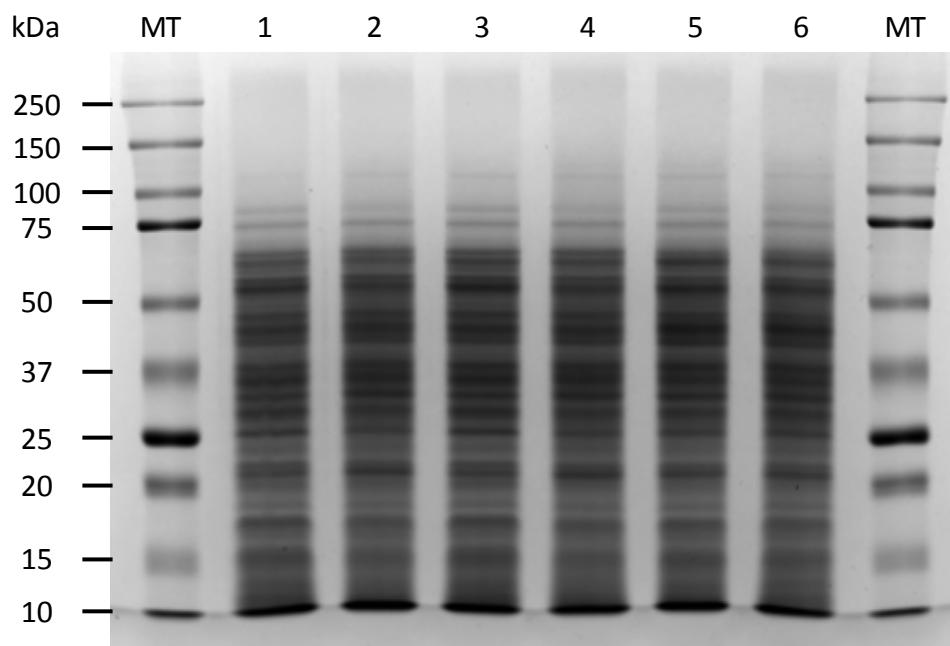


Figure 80 : Gel SDS-PAGE de la forme végétative de *Bacillus pumilus* avant (puits 1, 3 et 5) et après (puits 2, 4 et 6) traitement par les faisceaux d'électrons.

MT est le marqueur de taille Precision Plus Protein Standards Kaleidoscope

Une analyse protéomique a donc été réalisée afin de pouvoir détecter les protéines extraites et de comparer leur quantité entre les témoins et les essais. Cette technique permettra également d'identifier la quantité de peptides détectés entre le témoin et l'essai.

Analyse par spectrométrie de masse

Stratégies pour révéler les protéines affectées par le traitement

Afin de révéler le maximum de protéines potentiellement endommagées par le traitement, deux stratégies sont mises en œuvre :

- A partir des protéines : cette méthode est classiquement utilisée pour l'identification et la quantification de protéines sur- ou sous-exprimées. L'analyse est réalisée à partir de la liste des protéines identifiées. Les protéines sont validées par le logiciel Proline selon des seuils de validation admis. La sur- ou sous-expression est évaluée par le ratio entre les échantillons « essai » et « témoin » et une valeur statistique après un t-test avec une p-value<0,05.
- A partir des peptides spécifiques : l'analyse se fait à partir des fichiers bruts regroupant l'ensemble des peptides identifiés. Le ratio entre les échantillons « essai » et « témoin » est calculé pour identifier les peptides sur- et sous-exprimés. Seuls les peptides spécifiques d'une protéine sont utilisés. En effet, les autres peptides non-spécifiques, dit partagés, peuvent correspondre à plusieurs protéines et biaiser la révélation de la protéine sous-exprimée. Par conséquent, l'étude ne permettra pas de révéler toutes les protéines sur- et sous-exprimées par le traitement mais permettra de compléter la première stratégie.

Classification des protéines de *Bacillus pumilus*

Il est apparu intéressant de connaître la répartition des protéines au sein de la bactérie *Bacillus pumilus*, correspondant au taxon 1408. Un taxon correspond à une entité d'êtres vivants regroupés parce qu'ils possèdent des caractères communs. Le site QuickGO a été utilisé car il regroupe un nombre important d'informations sur *Bacillus pumilus*. L'ensemble des gènes répertoriés sur le site est analysé de manière à obtenir des camemberts de répartition. La Figure 81 montre la classification des protéines en fonction du terme de localisation qui leur est associé, nommé terme GO. Chaque segment de camembert donne le nombre de protéines et leur proportion. Parmi les grandes catégories, 35% des protéines identifiées sont membranaires, 33% font partie intégrante de la membrane, c'est-à-dire ont au moins une partie de leur séquence dans la région hydrophobe de la membrane, 9% sont présentes au niveau de la membrane plasmique, 11% se trouvent dans le cytoplasme. Il est important de noter que plusieurs identifications de localisation peuvent correspondre à une même protéine et, à l'inverse, que l'ensemble des protéines référencées n'a pas forcément de localisation connue. Ce camembert ne représente donc pas la répartition de l'ensemble des protéines de

Bacillus pumilus au sein de la bactérie mais montre la répartition des protéines en fonction de leur(s) terme(s) GO.

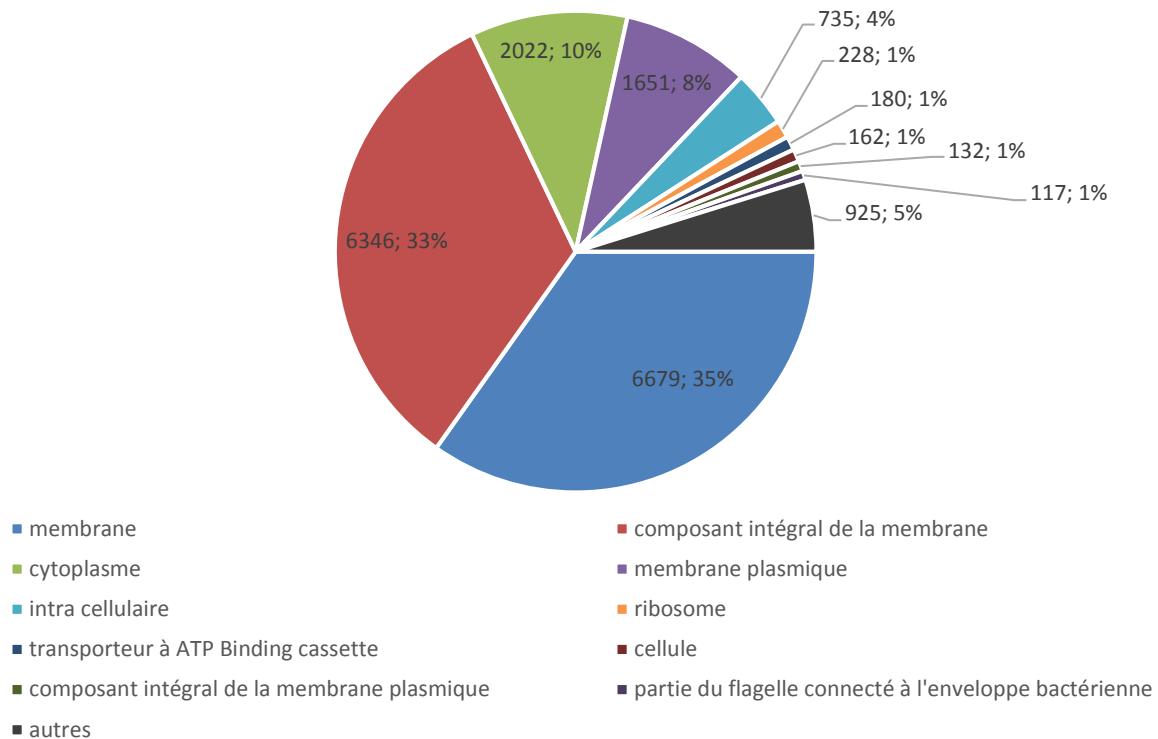


Figure 81 : Répartition de la localisation des protéines de *Bacillus pumilus* dans la base de données QuickGO.

Il en est de même pour les processus biologiques. Les grandes catégories pour cette classification sont les protéines impliquées dans les procédés d'oxydo-réduction (6%), la régulation de la transcription (5%), les procédés métaboliques (5%), le transport transmembranaire (5%), la transcription (4%) et la phosphorylation (3%). Il existe 692 autres processus biologiques dans lesquels sont classées les protéines de *Bacillus pumilus*.

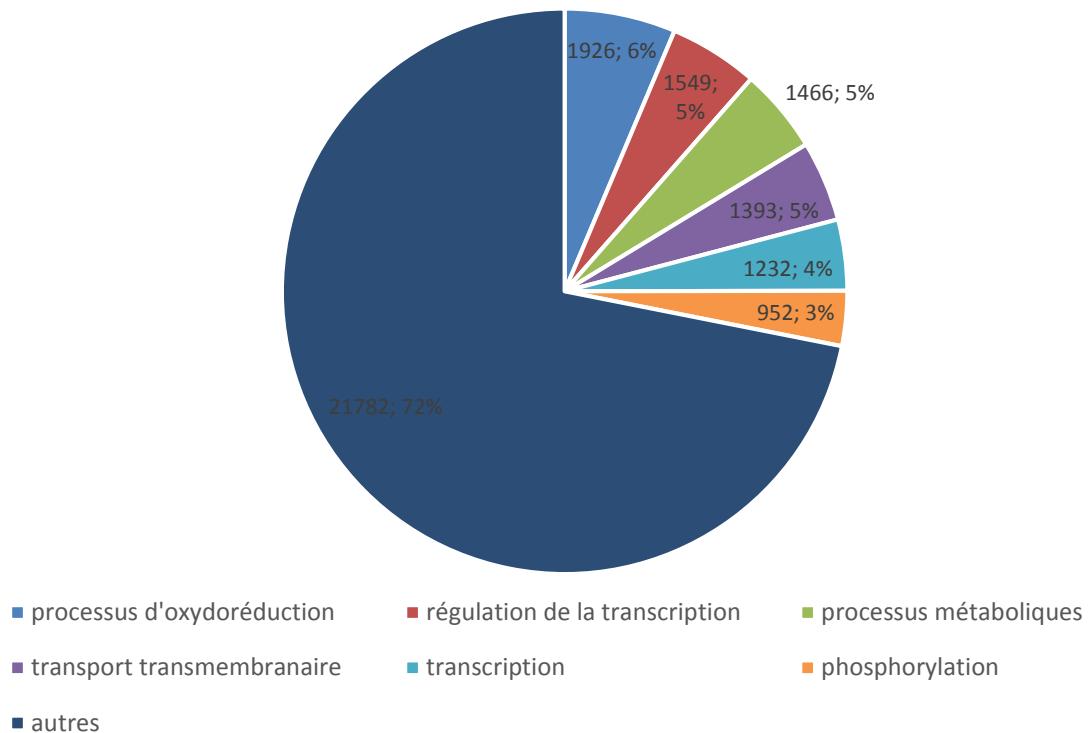


Figure 82 : Répartition des processus biologiques des protéines de *Bacillus pumilus* dans la base de données QuickGO.

Analyse des protéines extraites

L'extraction des trois échantillons biologiques a permis d'identifier en moyenne 1422 protéines pour le témoin et 1318 protéines pour l'essai.

Analyse quantitative à partir des protéines

Cette stratégie permet de déterminer toute variation de protéine entre deux conditions. Une protéine variante est révélée ; elle est sous-exprimée 2,9 fois chez l'essai par rapport au témoin (Figure 83). Il s'agit d'une aminohydrolase dont la localisation n'est pas connue mais qui est classée dans les processus métaboliques, c'est-à-dire les réactions chimiques et les voies par lesquelles les organismes vivants transforment les substances chimiques. Des processus métaboliques transforment typiquement de petites molécules, mais incluent aussi des processus macromoléculaires comme la réparation et la réPLICATION de l'ADN et la synthèse et la dégradation de protéines [155]. La dégradation de cette protéine pourrait expliquer l'effet bactéricide induit par le faisceau d'électrons sur *Bacillus pumilus*.

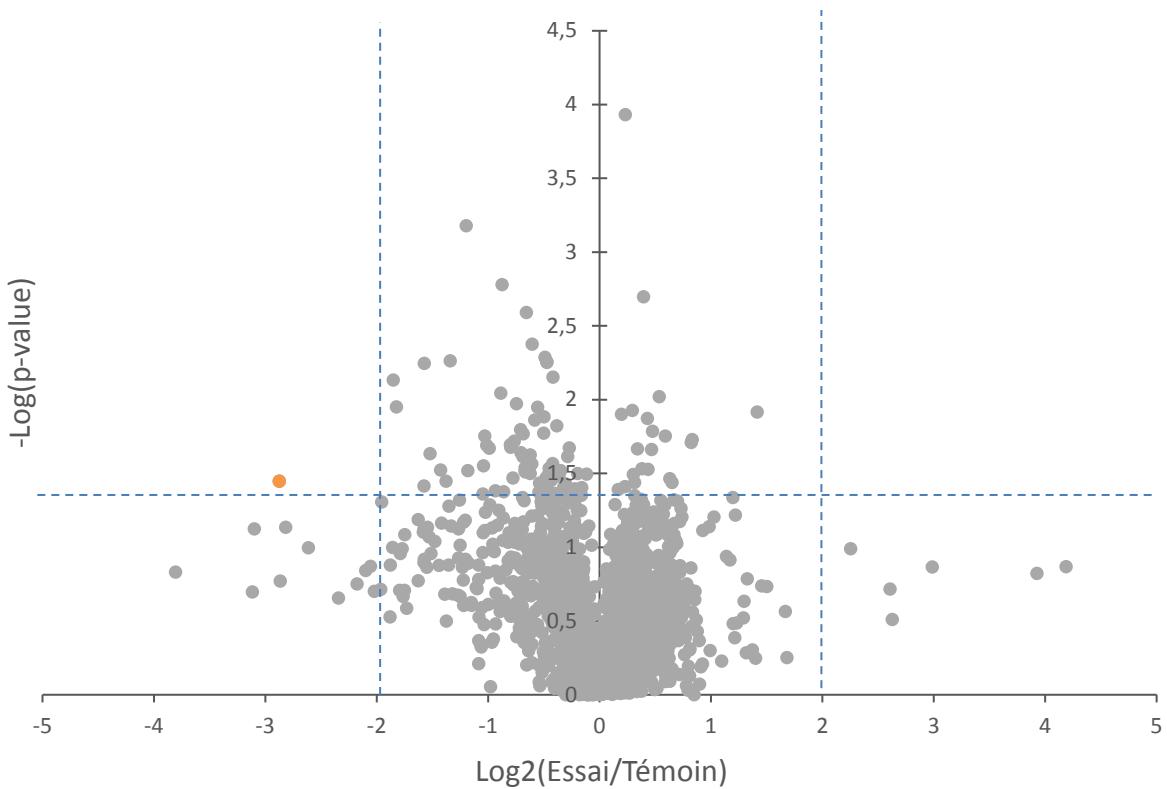


Figure 83 : Volcanoplot représentant le ratio entre les protéines révélées sur les échantillons essais et témoin pour *Bacillus pumilus* sous forme végétative.

Analyse quantitative à partir des peptides spécifiques

Pour rappel, seuls les peptides spécifiques seront considérés car ils permettent de remonter directement aux protéines. Dans notre cas, la proportion de peptides spécifiques par rapport à l'ensemble des peptides identifiés est d'environ 32%.

L'analyse quantitative est basée sur l'intégration du signal MS relatif à un peptide. Lorsqu'il ne possède pas de données d'intensité de signal, on parle alors de valeur manquante.

L'analyse quantitative est réalisée selon quatre critères résumés dans le Tableau 27.

Tableau 27 : Résumé des quatre critères considérés pour l'analyse quantitative à partir des peptides. Le T représente les valeurs obtenues pour témoin et le E celles pour l'essai.

Critère	Paramètre obtenu pour un peptide	Valeur
T/E	Ratio d'intensité entre témoin et essai	>4
	p-value	<0,05
E absent	Ratio d'intensité entre témoin et essai	Infinie (<i>pas de valeur pour l'essai</i>)
	p-value	<0,05
E/T	Ratio d'intensité entre témoin et essai	<0,25
	p-value	<0,05
T absent	Ratio d'intensité entre témoin et essai	0 (<i>pas de valeur pour le témoin</i>)
	p-value	<0,05

Les peptides spécifiques répondant à l'un des critères ci-dessus sont répertoriés. Cette liste va permettre de révéler les protéines affectées par le traitement. Le numéro d'accession correspondant au gène codant pour la protéine est entré dans le logiciel QuickGO. Il va nous donner les différents termes GO (Gene Ontology) correspondant à chaque protéine. Le terme GO est le terme qui décrit soit la localisation de la protéine dans la bactérie, soit le processus biologique dans lequel la protéine est impliquée. Une même protéine peut avoir plusieurs termes GO de localisation. Il en est de même pour les processus biologiques. *A contrario*, il est possible que certaines protéines n'aient pas de localisations ou de processus biologiques répertoriés dans la banque de données de QuickGO.

La Figure 84 résume les différentes étapes qui permettront d'accéder à ces termes GO.

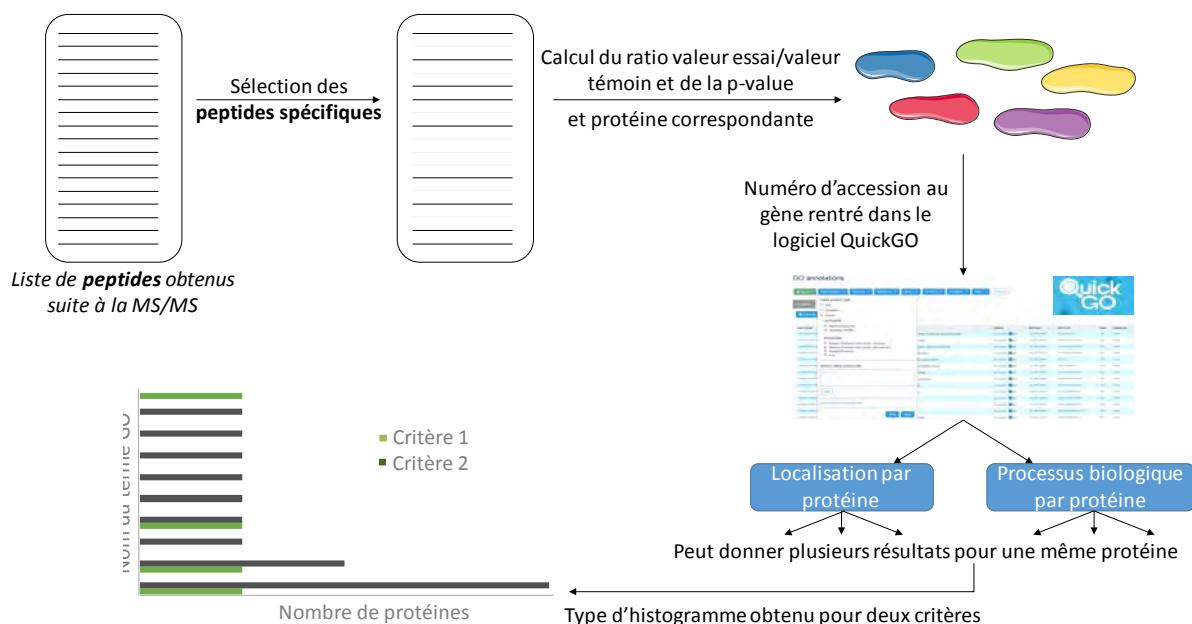


Figure 84 : Résumé des étapes de l'analyse protéomique quantitative à partir des peptides.

Dans le cas présent, la liste des protéines identifiées est présentée en Annexe 2 : Liste des protéines sous-exprimées chez *Bacillus pumilus* après le traitement par le faisceau d'électrons et en Annexe 3 : Liste des protéines surexprimées chez *Bacillus pumilus* après le traitement par le faisceau d'électrons. Le Tableau 28 résume le nombre de protéines identifiées pour chaque critère.

Tableau 28 : Nombre de protéines quantifiées après l'application de 2 impulsions de 10 ns à 2 cm et 100 Hz pour *Bacillus pumilus*.

Critère	Nombre de protéines quantifiées
T/E	7
E absent	2
E/T	4
T absent	1

A partir de la liste des protéines obtenues, le logiciel va donner les différents termes GO correspondant à chaque protéine.

Nous commencerons par présenter les résultats de localisation obtenus. Pour le critère 'T/E', seulement 2 protéines sont répertoriées dans la base de données. Pour l'une d'entre elle, deux termes GO sont référencés : membrane et membrane plasmique ce qui conduit à l'obtention de 3 termes GO pour ce critère. Pour le critère 'E absent', le logiciel n'a aucune donnée de localisation pour les 2 protéines révélées.

La Figure 85 résume la localisation des protéines. L'analyse révèle que le traitement induit des modifications au niveau de la membrane et du cytoplasme. Ces modifications peuvent soient être dues à des dommages au niveau de la protéine, soient être expliquées par une moins bonne extraction des protéines suite au traitement.

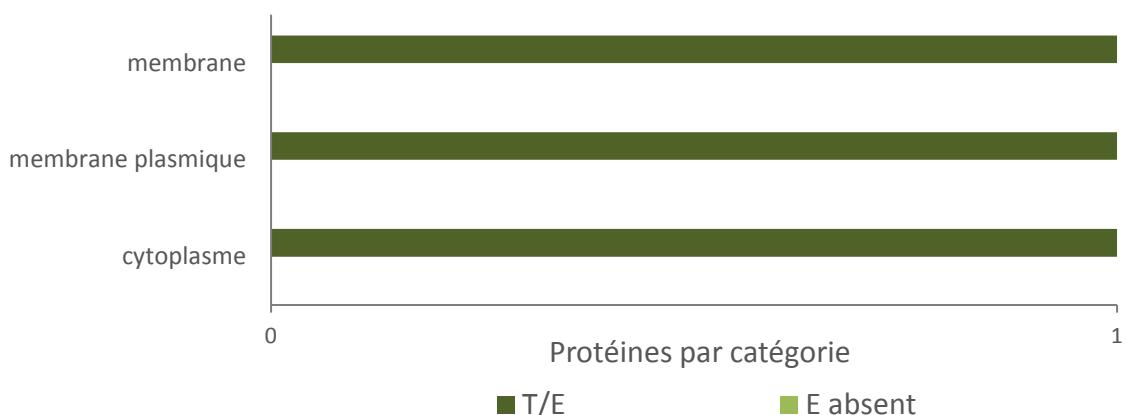


Figure 85 : Localisation des protéines sous-exprimées par le traitement après 2 impulsions de 10 ns à 100 Hz et 2 cm sur *Bacillus pumilus*.

Le T/E représente le ratio entre le témoin et l'essai pour un peptide spécifique donné. Le E absent correspond aux protéines dont la quantité de peptide spécifique est nulle pour l'essai.

Dans le cas de l'analyse des processus biologiques, toutes les protéines répondant au critère 'T/E' sont répertoriées dans la base de données des processus biologiques et une protéine pour le critère 'E absent'. Comme précédemment, certaines protéines ont plusieurs termes GO. En effet, la catégorie processus de biosynthèse de la valine est une sous-catégorie des processus de biosynthèse des acides aminés à chaîne ramifiée, elle-même sous-catégorie du processus de biosynthèse des acides aminés (Figure 86). Ces trois termes correspondent cependant à une seule protéine.

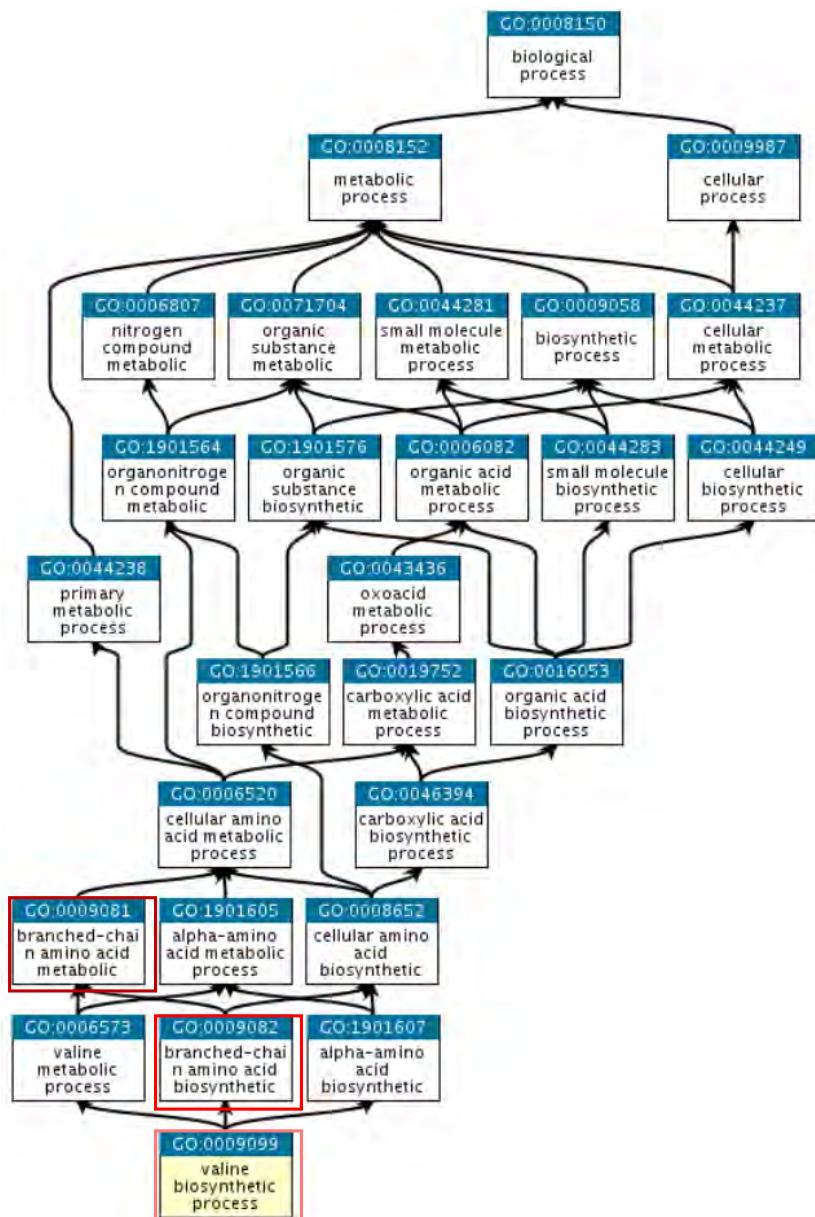


Figure 86 : Représentation typique des termes GO obtenus avec le logiciel QuickGO. Chaque case représente un terme GO. Les liens entre les différents termes sont matérialisés par une flèche noire. Encadré en rouge, un exemple de trois termes GO obtenus pour une même protéine.

La Figure 87 rassemble les processus biologiques des protéines sous-exprimées après le traitement. La voie la plus représentée est celle de la biosynthèse des acides aminés à chaîne ramifiée (isoleucine, leucine ou valine). Le processus biologique de biosynthèse des acides aminés désigne les réactions chimiques et les voies conduisant à la formation d'acides aminés [155]. Dans la catégorie 'T/E', seulement une protéine n'est pas répertoriée. Il est donc possible de dire que les voies principalement affectées par le traitement sont les processus biologiques conduisant à la synthèse des acides aminés, qui conduiront ensuite aux protéines. L'altération de ces voies par le traitement peut expliquer le phénomène bactéricide de la technologie. Il est également possible que le traitement ait engendré des modifications, par exemple au niveau de la membrane, conduisant à une moins bonne accessibilité de ces protéines lors du protocole d'extraction.

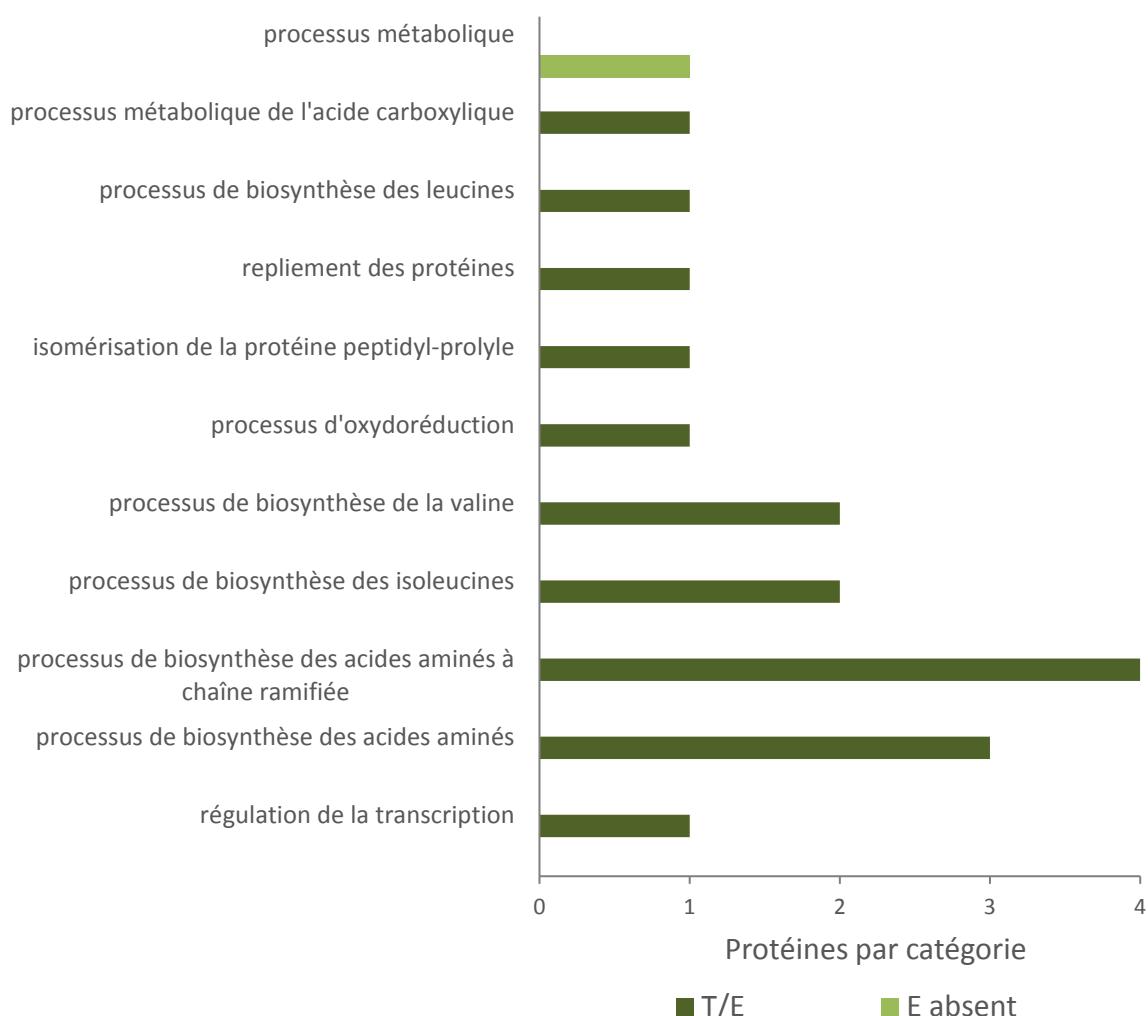


Figure 87 : Processus biologiques des protéines sous-exprimées par le traitement après 2 impulsions à 100 Hz et 2 cm sur *Bacillus pumilus*.

Le T/E représente le ratio entre le témoin et l'essai pour un peptide spécifique donné. Le E absent correspond aux protéines dont la quantité de peptide spécifique est nulle pour l'essai.

Pour les deux critères révélant une surexpression de la protéine, une analyse des termes GO de localisation est faite. Pour le cas ‘E/T’, seulement une protéine sur les 4 est répertoriée et aucune pour le critère ‘T absent’. La protéine révélée est une protéine du cytoplasme, la L-lactate déshydrogénase. Cette enzyme catalyse la transformation du pyruvate en L-lactate, utilisé chez les bactéries lactiques en substitution au processus de respiration [155].

Dans la base de données des processus biologiques, pour le critère ‘E/T’, 2 protéines sont répertoriées et une protéine pour le critère ‘T absent’. Une protéine peut être impliquée dans différents processus biologiques. C'est d'ailleurs ce qui ressort ici avec 2 protéines répertoriées pour le critère ‘E/T’ et 7 processus biologiques correspondant. La Figure 88 résume les processus biologiques des protéines.

Au vu des conditions d'analyse, la surexpression de protéines ne peut être expliquée que par une meilleure accessibilité de ces protéines lors de l'extraction.

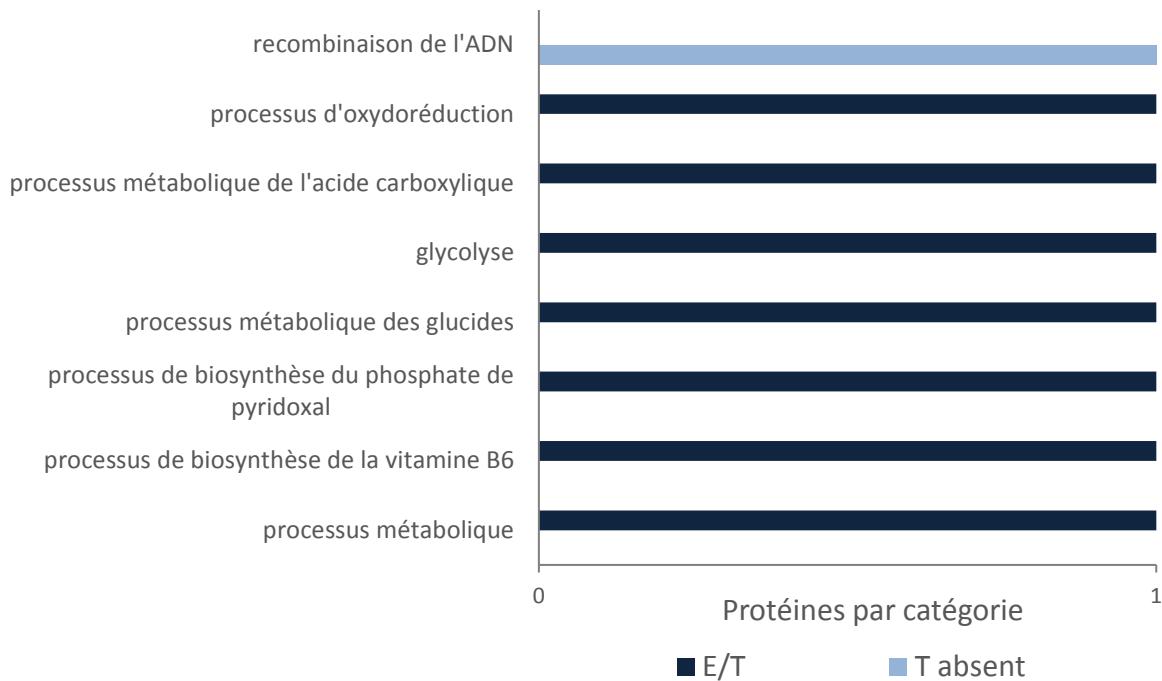


Figure 88 : Processus biologiques des protéines surexprimées après le traitement après 2 impulsions à 100 Hz et 2 cm sur *Bacillus pumilus*.

Le E/T représente le ratio entre le témoin et l'essai pour un peptide spécifique donné. Le T absent correspond aux protéines dont la quantité de peptide spécifique est nulle pour le témoin.

Pour résumer, l'analyse avec le gel SDS-PAGE n'a pas révélé de dégradation des protéines après le traitement. En revanche, cette expérience a permis à l'équipe ‘Protéomiques et Spectrométrie de masse des biomolécules’ de l'IPBS, de valider que la quantité de protéines était suffisante pour l'analyse protéomique.

Une analyse protéomique a ensuite été faite. La protéine révélée par l'analyse des protéines a également été décelée par l'analyse des peptides spécifiques dans le cas 'T/E'. Cette observation montre la complémentarité des méthodes.

L'analyse quantitative à partir des peptides spécifiques a permis de révéler des protéines qui ont subi une modification après irradiation que ce soit une sous- ou une surexpression. Pour les protéines qui sont sous-exprimées après le traitement, il y a des protéines du cytoplasme et de la membrane. Le procédé affecte donc l'ensemble de la bactérie. Pour les protéines surexprimées, une protéine du cytoplasme est révélée, les autres n'étant pas référencées dans la base de données de QuickGO. Cette analyse a également permis de voir qu'un nombre important de processus est affecté par le traitement avec notamment les processus de biosynthèse des acides aminés. L'effet bactéricide des faisceaux d'électrons pulsés pourrait donc venir d'une dégradation des protéines.

Bacillus pumilus sous forme sporulée

Gel SDS-PAGE

La concentration en protéines des différents essais est reportée dans le Tableau 29. Les valeurs de concentration des triplicats sont similaires. Le protocole employé est donc reproductible d'une expérience à l'autre.

Tableau 29 : Dosage des protéines contenues dans les échantillons à partir d'une solution de spores de *Bacillus pumilus*.

Spores	Concentration en protéines des échantillons (mg/mL)				
	1	2	3	Moyenne sans dilution	Ecart-type
Témoin culture 1, dilution 1/2	0,439	0,444	0,454	0,891	0,016
Essai culture 1, dilution 1/2	0,485	0,469	0,464	0,945	0,021
Témoin culture 2, dilution 1/2	0,480	0,469	0,428	0,918	0,054
Essai culture 2, dilution 1/2	0,480	0,480	0,454	0,942	0,030
Témoin culture 3, dilution 1/2	0,510	0,495	0,495	1,000	0,018
Essai culture 3, dilution 1/2	0,551	0,541	0,541	1,089	0,012

Le gel SDS-PAGE obtenu est présenté en Figure 89. Les puits numérotés 1, 3 et 5 correspondent aux témoins. Les différentes bandes obtenues sont comparées avec celles des puits 2, 4 et 6, respectivement, qui correspondent aux spores de *Bacillus pumilus* traitées par 10 impulsions à 2 cm et 100 Hz. Comme pour les formes végétatives, les profils ne révèlent pas la formation de « smear », ni d'apparition ou de disparition de bandes. Il n'est pas possible de révéler de modifications au niveau des protéines extraites par le gel SDS-PAGE.

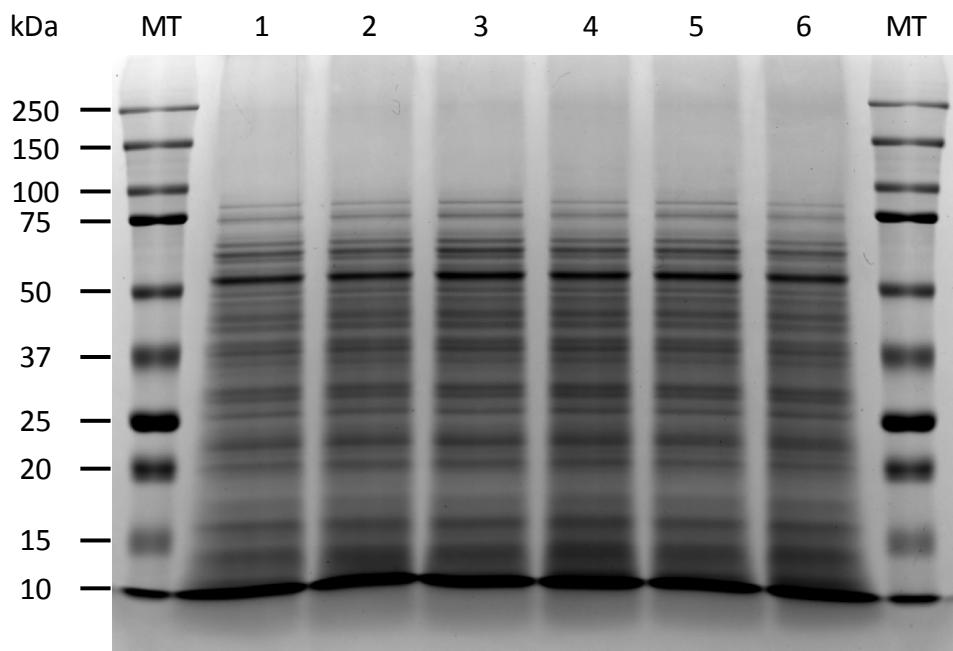


Figure 89 : Gel SDS-PAGE des spores de *Bacillus pumilus* avant (puits 1, 3 et 5) et après (puits 2, 4 et 6) traitement par les faisceaux d'électrons.

MT est le marqueur de taille Precision Plus Protein Standards Kaleidoscope

L'analyse protéomique permettra de comparer les différentes protéines extraites entre les échantillons témoin et essai.

Analyse par spectrométrie de masse

Analyse des protéines extraites

L'extraction des trois échantillons biologiques a permis d'identifier une moyenne de 1266 protéines pour le témoin et 1249 protéines pour l'essai.

Analyse quantitative à partir des protéines

En considérant les hypothèses décrites dans le chapitre 2.14 « Etude des protéines/Extraction et analyse des données », l'analyse quantitative à partir des protéines ne révèle aucune protéine sur- ou sous-exprimées entre les témoins et les essais (Figure 90).

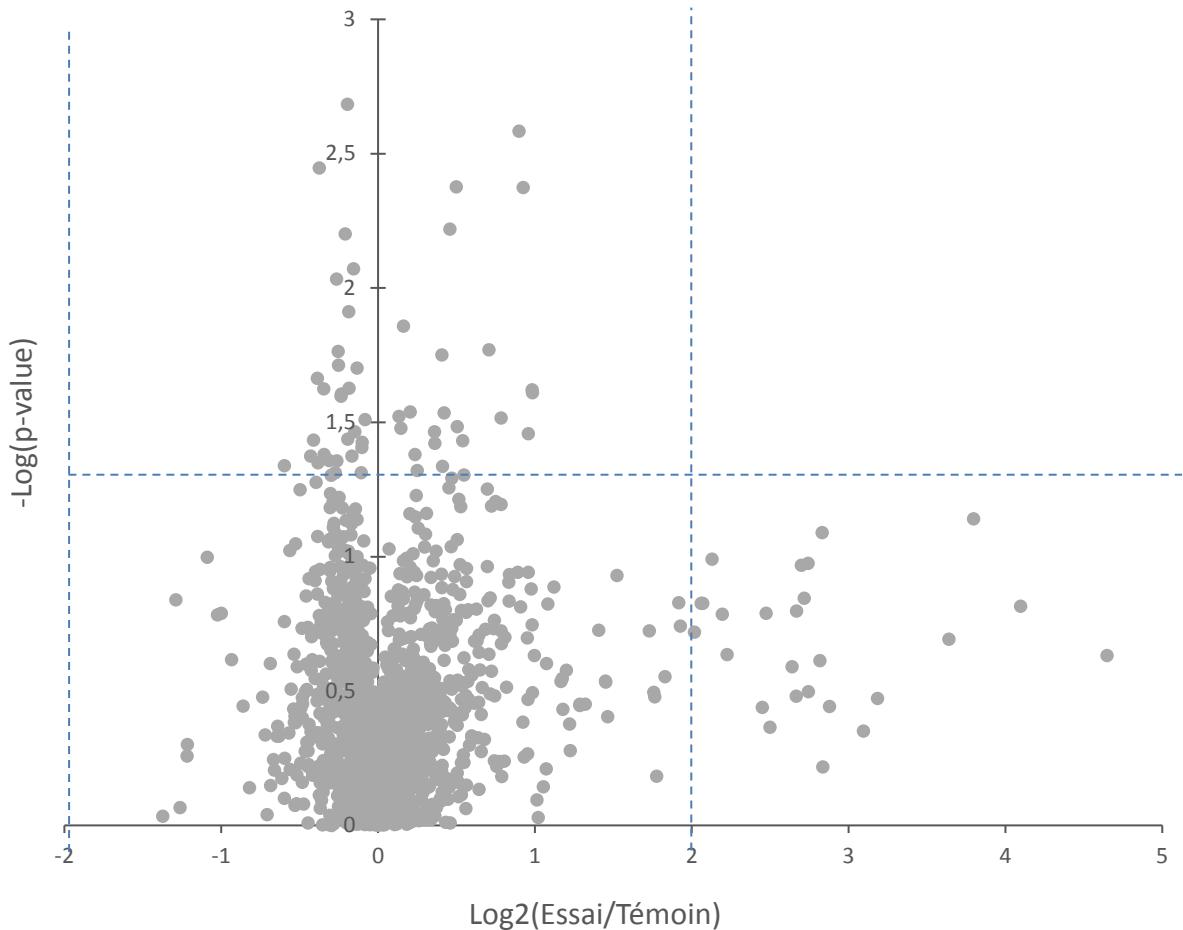


Figure 90 : Volcanoplot représentant le ratio entre les protéines révélées sur les échantillons essais et témoin pour les spores de *Bacillus pumilus*.

Analyse quantitative à partir des peptides spécifiques

Pour les spores de *Bacillus pumilus*, la proportion de peptides spécifiques par rapport à l'ensemble des peptides identifiés est d'environ 34%.

La stratégie consistant à analyser les peptides spécifiques est complémentaire à celle des protéines. En effet, cette stratégie a permis de révéler de nouvelles protéines d'intérêt. La liste des protéines d'intérêt se trouve en Annexe 4 : Liste des protéines sous-exprimées chez les spores de *Bacillus pumilus* après le traitement par le faisceau d'électrons et Annexe 5 : Liste des protéines surexprimées chez les spores de *Bacillus pumilus* après le traitement par le faisceau d'électrons. Le Tableau 30 résume les résultats obtenus avec cette approche en fonction du critère considéré.

Tableau 30 : Nombre de protéines quantifiées après l'application de 10 impulsions à 2 cm et 100 Hz pour *Bacillus pumilus* sporulé

Critère	Nombre de protéines quantifiées
T/E	2
E absent	4
E/T	8
T absent	0

Dans un premier temps une analyse de la localisation des protéines sous-exprimées a été faite. Pour le critère 'T/E', les 2 protéines sont répertoriées dans la base de données de localisation et une protéine sur les 4 pour le critère 'E absent'. Sur les 2 protéines du critère 'T/E', une protéine possède deux termes GO, membrane et composant intégral de la membrane. Pour le critère 'E absent', la protéine est également classée dans ces deux catégories. Il est possible de constater que le traitement crée des dommages au niveau des protéines membranaires et cytoplasmiques. La Figure 91 présente la localisation des protéines révélées dans le cas des protéines sous-exprimées après le traitement.

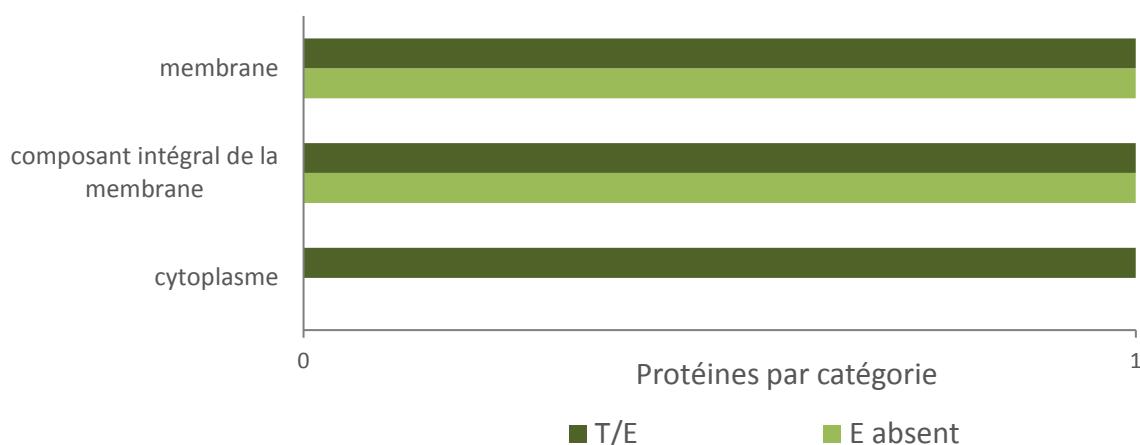


Figure 91 : Localisation des protéines sous-exprimées par le traitement après 10 impulsions à 100 Hz et 2 cm sur *Bacillus pumilus* sporulé.

Le T/E représente le ratio entre le témoin et l'essai pour un peptide spécifique donné. Le E absent correspond aux protéines dont la quantité de peptide spécifique est nulle pour l'essai.

Ensuite, la base de données des processus biologiques répertorie une protéine pour le critère 'T/E' et trois protéines pour le critère 'E absent'. La protéine correspondant au critère 'T/E' a 3 termes GO correspondant : le sauvetage de l'inosine monophosphate, le processus métabolique des nucléosides et le sauvetage des nucléotides puriques. Pour le critère 'E absent', l'une des trois protéines répertoriées a deux termes GO correspondants : le processus métabolique et le cycle de Krebs. Le cycle de Krebs étant une sous-catégorie des processus métaboliques. Les deux autres protéines sont impliquées, pour l'une, dans le processus

métabolique des lipides et, pour l'autre, dans les processus de biosynthèse. La Figure 92 présente les différents processus identifiés.

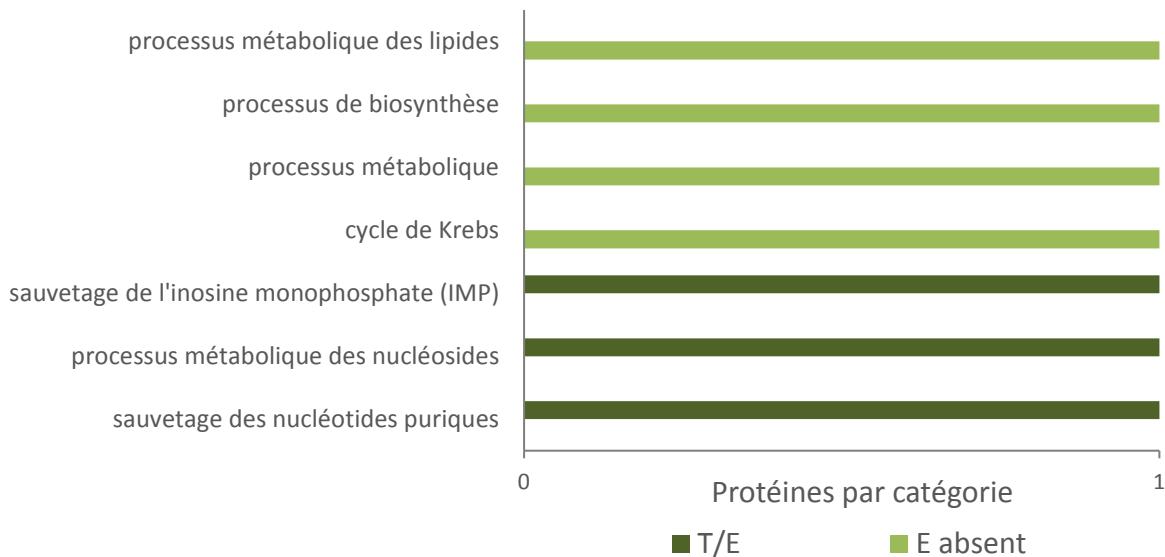


Figure 92 : Processus biologiques des protéines sous-exprimées par le traitement après 10 impulsions à 100 Hz et 2 cm sur *Bacillus pumilus sporulé*.

Le T/E représente le ratio entre le témoin et l'essai pour un peptide spécifique donné. Le E absent correspond aux protéines dont la quantité de peptide spécifique est nulle pour l'essai.

Dans un second temps, les protéines surexprimées post-traitement sont analysées en commençant par l'analyse de leur terme GO de localisation.

Pour le 'E/T', seulement 3 protéines sur les 8 identifiées sont répertoriées dans la base de données de localisation. Parmi ces protéines, une protéine est membranaire et répertoriée avec différents termes GO (membrane, composant intégral de la membrane, intracellulaire, membrane plasmique). Elle est nommée secD et correspond à une sous-unité du complexe nommé secDF nécessaire à la translocation de protéines à travers la membrane chez *Bacillus subtilis* [166]. Les deux autres protéines sont cytoplasmiques. L'une d'elles fait partie du complexe enzymatique du cycle de Krebs. Le cycle de Krebs est situé à un carrefour des métabolismes glucidique, lipidique et protéique. Il permet de dégrader le glucose, les acides gras ou les protéines afin de produire de l'énergie sous forme d'ATP.

La Figure 93 présente les résultats obtenus.

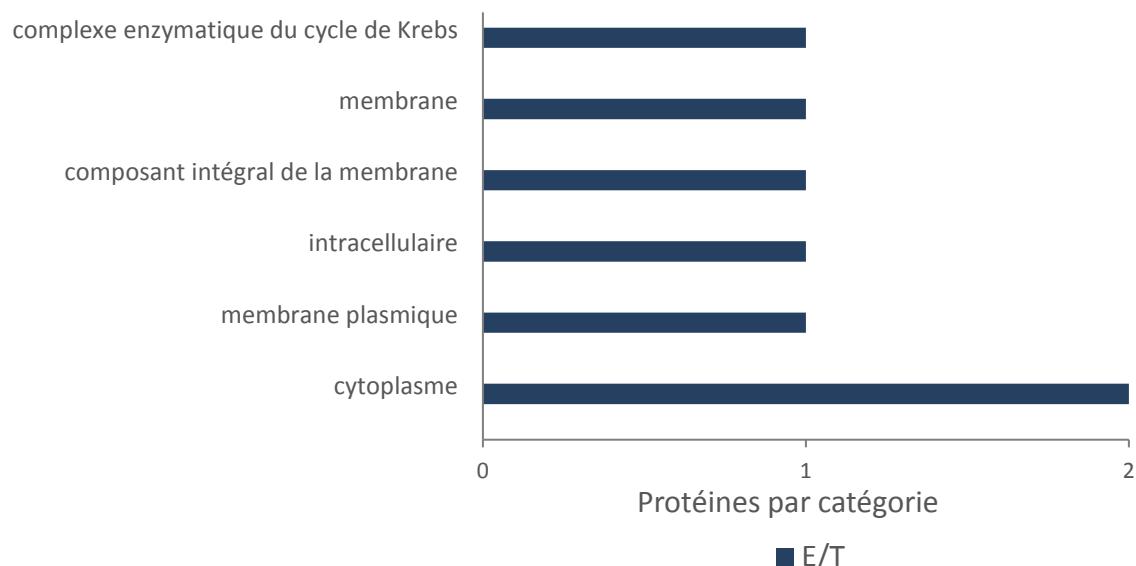


Figure 93 : Localisation des protéines mieux extraites suite au traitement après 10 impulsions à 100 Hz et 2 cm sur *Bacillus pumilus sporulé*.

Le E/T représente le ratio entre l'essai et le témoin pour un peptide spécifique donné.

Pour les processus biologiques, le critère 'E/T' répertorie 8 protéines dont 5 référencées dans la base de données de QuickGO. Le logiciel associe ces 5 protéines à 13 termes GO différents. Le traitement par faisceaux d'électrons conduit à une meilleure extraction des protéines impliquées dans des processus biologiques ayant lieu dans le cytoplasme (le cycle de Krebs, par exemple) ou au niveau de la membrane (le transport des protéines, par exemple). La Figure 94 indique les processus biologiques des protéines d'intérêt.



Figure 94 : Processus biologiques des protéines mieux extraites par le traitement après 10 impulsions à 100 Hz et 2 cm sur *Bacillus pumilus sporulé*.

Le E/T représente le ratio entre l'essai et le témoin pour un peptide spécifique donné.

En conclusion, l'analyse avec le gel SDS-PAGE n'a pas permis de mettre en évidence de dégradation des protéines après le traitement. En revanche, le gel a permis à l'équipe 'Protéomiques et Spectrométrie de masse des biomolécules' de l'IPBS, de valider que la quantité de protéines était suffisante pour l'analyse protéomique.

L'utilisation de deux stratégies d'analyse a permis de révéler différents types de protéines affectées par le traitement, présentes à la fois au niveau de la membrane et du cytoplasme. Ces protéines sont impliquées dans différents processus biologiques et la dégradation de ces macromolécules peut expliquer la mort bactérienne suite au traitement. La meilleure extraction de certaines protéines après le traitement suggère également que d'autres interactions entre le faisceau et la bactérie peuvent exister.

En revanche, ces deux stratégies ne permettent pas d'identifier toutes les protéines affectées par le traitement. Un autre point limitant est la non-connaissance de toutes les protéines de *Bacillus pumilus*, tant au niveau de leur localisation que de leur implication dans des processus biologiques.

Enfin, la comparaison des protéines sous- et surexprimées par le traitement, entre la forme végétative et la forme sporulée, ne révèle pas de protéines communes. L'organisation différente de ces deux formes affecte certainement l'efficacité d'extraction des protéines.

Globalement, dans ce chapitre, les essais menés sur Bacillus pumilus pour expliquer l'efficacité du générateur de faisceau d'électrons pulsés ont permis de révéler que la fréquence de répétition des impulsions ne modifie pas l'efficacité du système. C'est la dose reçue par les bactéries qui va dicter la diminution logarithmique obtenue. L'observation de la paroi des bactéries n'a pas révélé de modifications morphologiques que ce soit pour la forme végétative ou sporulée. Cependant, les mesures d'hydrophobie de la paroi des bactéries végétatives ont montré une diminution de ce paramètre. Une dégradation des acides teichoïques pourrait expliquer cette observation. C'est l'une des perspectives de recherches envisagées pour la suite des travaux. Par contre, l'architecture intracellulaire ne présente pas de changement après le traitement. Pour la forme végétative, les analyses de l'ADN génomique montrent l'apparition de cassures simple et double brin ainsi que de dimères de pyrimidine. Pour la forme sporulée, seules les cassures simple et double brin ont été clairement mises en évidence.

Enfin, l'analyse des protéines, que ce soit pour les bactéries sous forme végétative ou sporulée, a mis en évidence :

- *Une moins bonne extraction ou une dégradation des protéines membranaires et cytoplasmiques suite au traitement, affectant différents processus biologiques indispensables à la survie des bactéries.*
- *Une meilleure extraction des protéines membranaires ou cytoplasmiques laissant entendre une modification au niveau, par exemple, de la membrane des bactéries.*

Chapitre 4. Étude des effets des décharges électriques

L'objectif de ce chapitre est d'étudier les effets du traitement par décharges électriques sur les bactéries. Au préalable des expériences sur les bactéries, le courant et la tension délivrés par les décharges électriques seront mesurés. Ensuite, le résultat des expériences sur plusieurs souches sera présenté. Il permettra de sélectionner la souche la plus résistante pour la suite des essais. Différents paramètres (composition du milieu et concentration bactérienne) seront alors testés afin d'évaluer leur influence sur l'efficacité d'éradication. L'isolation de l'effet des ROS et des UV créés par la décharge dans l'eau permettra de confirmer l'importance de ces deux phénomènes dans l'efficacité du système. Enfin, différentes expériences seront présentées afin de comprendre l'effet bactéricide de la technologie. Comme dans le chapitre précédent, des techniques de microscopie seront utilisées pour observer l'intégrité et l'organisation de la paroi des microorganismes afin de détecter des dommages éventuels suite au traitement. Cette étude se conclura par l'analyse de l'intégrité de l'ADN et des protéines de la bactérie après le traitement.

4.1. Présentation de la problématique

Le générateur de décharges électriques présenté précédemment au chapitre 1.3.4 «Comparaison avec d'autres techniques utilisant des décharges électriques» a été développé dans le but de décontaminer l'eau des tours aéroréfrigérantes. La circulaire DGS n°2002/273 du 2 mai 2002 relative à la diffusion du rapport du Conseil Supérieur d'Hygiène Publique de France concernant la gestion du risque lié aux légionnelles, datant de novembre 2001, préconise la mise en œuvre de mesures de prévention visant l'ensemble des installations pouvant être à l'origine de cas de légionellose, dont les tours aéroréfrigérantes. Les recommandations portent sur la conception et la maintenance des installations à risque afin de lutter contre la prolifération de la bactérie ainsi que sur les modalités de surveillance de l'état de contamination des tours. Trois niveaux de concentration en légionnelles dans l'eau des TAR assortis d'actions correspondantes à mener sont préconisés :

- Niveau cible : $< 10^3$ UFC *legionella* spp./L
- Niveau d'alerte : $> 10^3$ UFC *legionella* spp./L
- Niveau d'action : $> 10^5$ UFC *legionella* spp./L.

Afin de s'assurer que le traitement permet de passer du niveau d'action au niveau cible, une diminution d'au moins $2 \log_{10}$ est fixée pour la suite de l'étude.

Les légionnelles étant des bactéries de classe 2, il n'était pas possible de les manipuler dans nos locaux. *Escherichia coli*, bactérie Gram négative comme *Legionella pneumophila*, est choisie pour faire des tests préliminaires pour le choix de la souche de référence. En parallèle, nous avons également travaillé sur la souche de *Bacillus pumilus* (forme végétative et sporulée). La forme sporulée est hautement résistante aux stress environnants. Si l'objectif d'une diminution de $2 \log_{10}$ est atteint avec la technologie sur cette souche, l'efficacité sur les légionnelles n'en sera que meilleure. *Bacillus pumilus* sous forme sporulée pourra, après validation, servir de référence.

4.2. Configuration des essais

Les paramètres qui peuvent être modifiés sur cette technologie sont :

- la fréquence de répétition des impulsions
- le nombre d'impulsions appliquées.

Dans les paragraphes suivants, le choix des différents paramètres sera décrit et justifié en fonction de l'objectif de la manipulation.

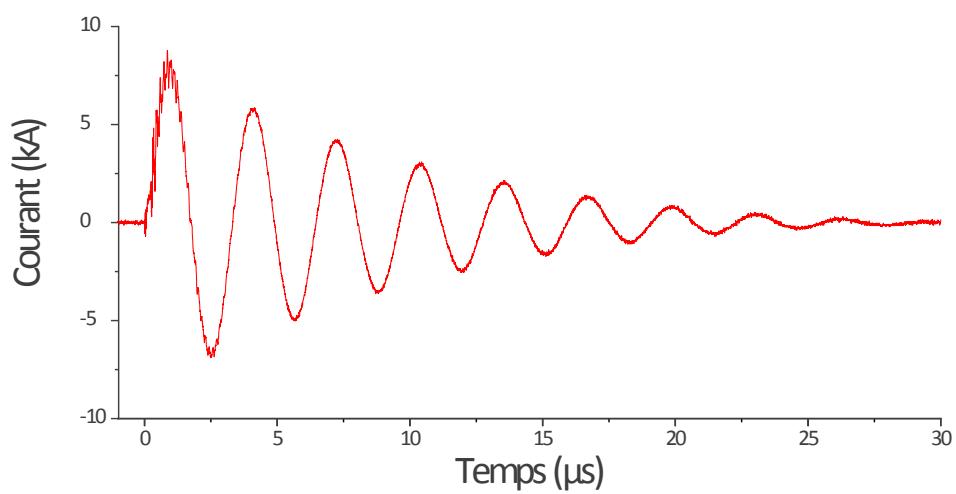
Les paramètres utilisés lors des essais sont une alimentation 30 kV négative, un générateur de Marx avec 5 étages et des capacités de 0,2 μ F, une fréquence de répétition de 10 Hz, une distance inter-électrode de 2 mm et une conductivité de 0,22 mS/cm pour l'eau du robinet et 0,14 mS/cm pour l'eau distillée. Les mesures de courant et de tension ont été faites à partir de ces critères.

4.3. Mesure des signaux de courant et de tension

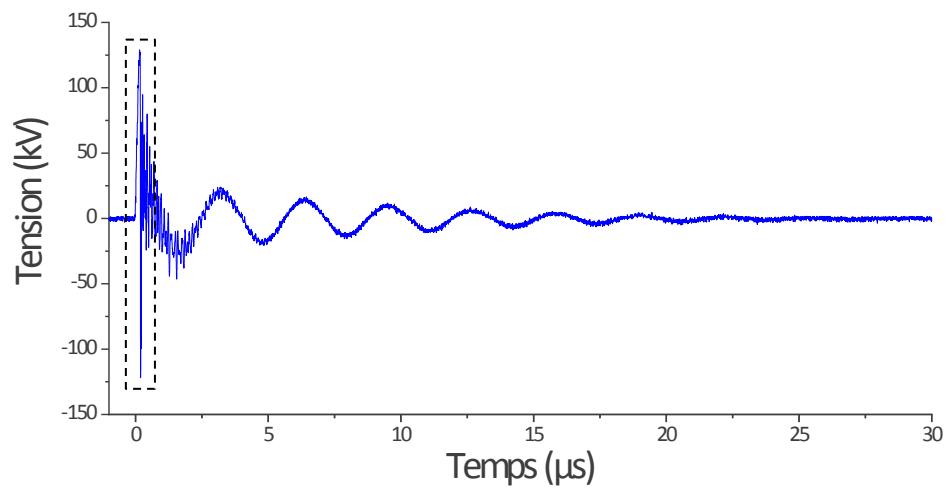
Les signaux de courant et de tension sont obtenus à l'aide d'un capteur de type Rogowski en entrée du Marx et d'un diviseur résistif situés en entrée et en sortie du Marx, respectivement (Figure 35, page 67).

Les signaux présentés Figure 95 sont ceux obtenus à l'aide d'un oscilloscope Tektronix DPO 3034. D'après les signaux, il est considéré que les impulsions sont amorties en 30 μ s. La valeur du courant maximum est de 8,5 kA et de 120 kV pour la tension. Le front de montée (pris entre 0 et 100%) mesuré pour le signal de tension est de 177 ns pour une distance inter-électrode de 2 mm. La décharge délivrée par le générateur est donc de type supersonique.

a)



b)



c)

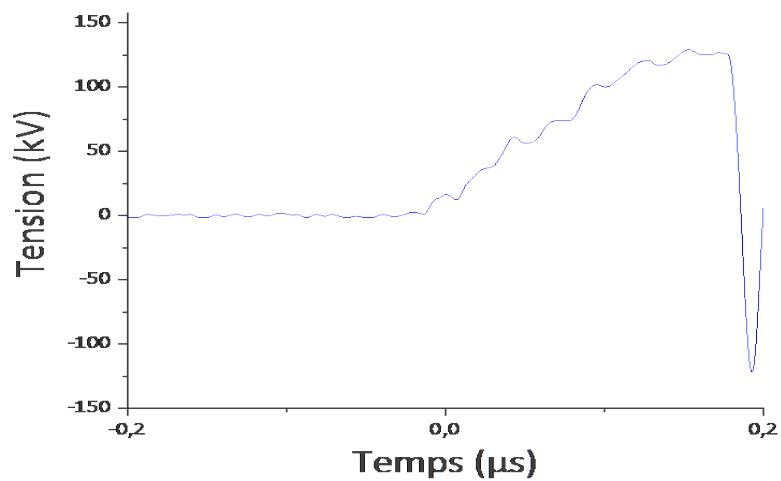


Figure 95 : Courbes de courant a), de tension b) données par les capteurs situés en sortie du Marx et zoom sur le signal de tension c).

4.4. Efficacité du traitement

4.4.1. Choix de la souche de référence

L'efficacité de la technologie a été déterminée avec une fréquence de répétition des impulsions de 10 Hz. A cette fréquence, la puissance consommée par la machine est de 5.6 kWh. *Escherichia coli* et *Bacillus pumilus* sont les deux souches utilisées dans le cadre de ce travail à une concentration de 1×10^6 CFU/mL.

Escherichia coli

Les premiers essais sont réalisés sur *Escherichia coli* qui est une espèce Gram négative comme *Legionella pneumophila*. Des essais préliminaires en duplicit sont faits en appliquant 10, 15 et 20 impulsions à une fréquence de répétition de 10 Hz. Les résultats montrent une diminution logarithmique relativement faible de 0,38 ; 0,67 et 1 (Figure 96). Le nombre d'impulsions est donc augmenté afin d'atteindre l'objectif d'une diminution de 2 \log_{10} . L'application de 500 impulsions a permis d'obtenir une diminution de 4,04 \log_{10} pour *E. coli*. Ces essais sont réalisés en triplicat.

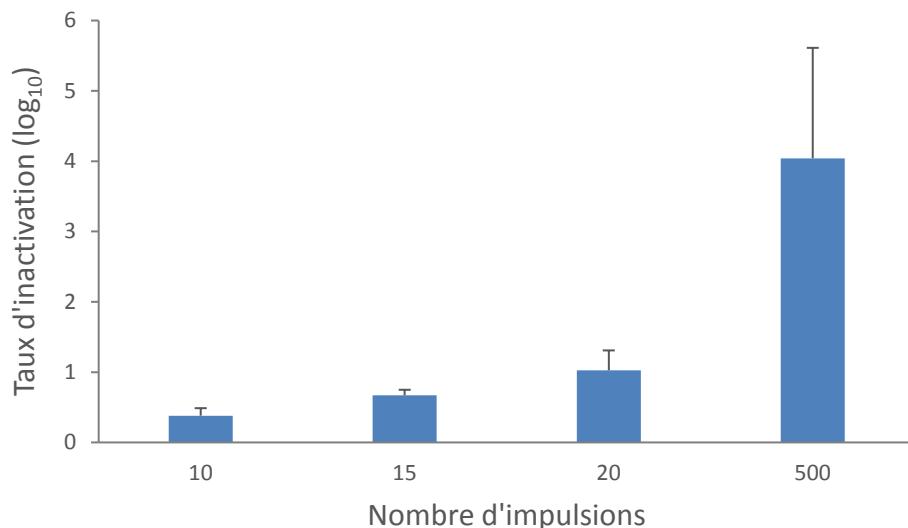


Figure 96 : Efficacité des décharges électriques sur la souche *Escherichia coli* en fonction du nombre d'impulsions appliquées.

Bacillus pumilus

Dans le cas de *Bacillus pumilus*, ce microorganisme peut se trouver sous deux formes dans la nature : la forme végétative et la forme sporulée. D'après la littérature [32], il est plus difficile d'éliminer des bactéries sous forme sporulée que sous forme végétative. Des essais ont été réalisés pour confirmer qu'avec le générateur de décharges électriques la même constatation est faite. Les résultats présentés en Figure 97 confirment le fait que la forme végétative est plus facile à éradiquer que la forme sporulée de *Bacillus pumilus*.

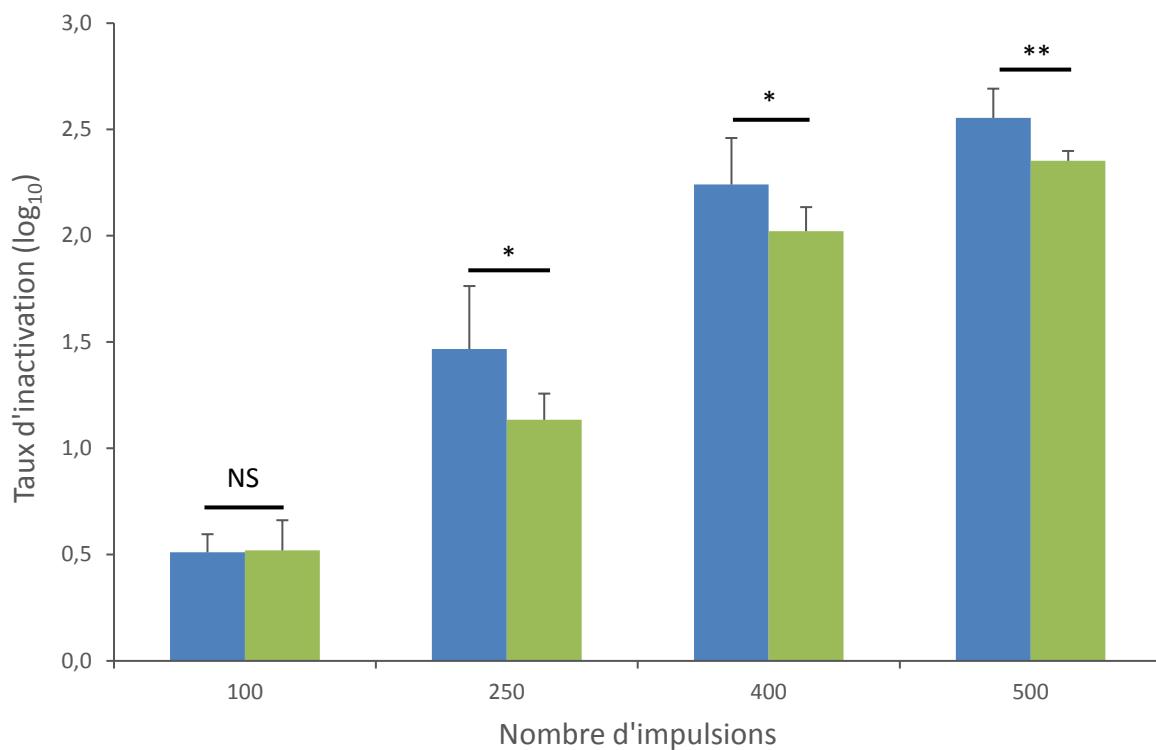


Figure 97 : Efficacité du traitement pour les bactéries végétatives (en bleu) et les spores (en vert) de *Bacillus pumilus*. L'analyse statistique a été faite avec un test de Student (* P<0,05 ; ** P<0,01).

La souche la plus résistante est *Bacillus pumilus* et sa forme sporulée est moins sensible au traitement que la forme végétative. La suite de l'étude sera donc réalisée sur *Bacillus pumilus* sous forme sporulée. Les 2 log₁₀ sont atteints après 500 impulsions à 10 Hz.

4.4.2. Etude de l'effet de différents paramètres

Effet de la composition du milieu

L'application finale des décharges électriques est la décontamination de l'eau des tours aéroréfrigérantes. Par conséquent, il est important de savoir si la composition de l'eau du robinet peut influencer l'efficacité du traitement. L'efficacité du traitement est testée pour

une concentration de 1×10^6 UFC/mL dans de l'eau distillée ayant une conductivité de 2 $\mu\text{S}/\text{cm}$ ou de l'eau du robinet à 500 $\mu\text{S}/\text{cm}$ et à température ambiante. La Figure 98 représente la diminution logarithmique obtenue pour chaque milieu après l'application de 500 impulsions à 10 Hz. Aucune différence d'efficacité n'est constatée entre ces deux milieux : 2,3 \log_{10} de diminution pour l'eau distillée et 2,2 \log_{10} de diminution pour l'eau du robinet.

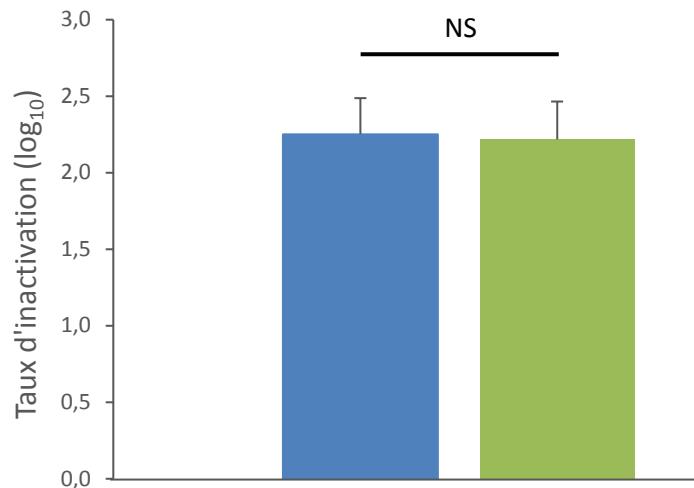


Figure 98 : Efficacité sur *Bacillus pumilus* sous forme sporulée après 500 impulsions à 10 Hz dans de l'eau distillée (à gauche) et de l'eau du robinet (à droite). L'analyse statistique a été faite avec un test de Student (NS $P > 0,05$).

Effet de la concentration bactérienne

Les arcs électriques dans l'eau créent différents phénomènes dont la génération d'UV. Ce phénomène serait prédominant dans l'effet bactéricide de la technologie [101]. La concentration en microorganismes va modifier la turbidité du milieu et ainsi limiter l'efficacité des décharges. Deux concentrations bactériennes sont testées : 1×10^6 UFC/mL et 1×10^7 UFC/mL. Une diminution de 2,25 \log_{10} et de 2,17 \log_{10} est obtenue, respectivement. L'analyse statistique montre que cette différence n'est pas significative. Ces résultats montrent que dans la gamme de concentration étudiée, l'efficacité n'est pas réduite. Cette expérience ne permet pas de mettre en évidence l'importance des UV dans l'efficacité des décharges électriques dans l'eau. Une autre expérience est donc menée et présentée au paragraphe suivant.

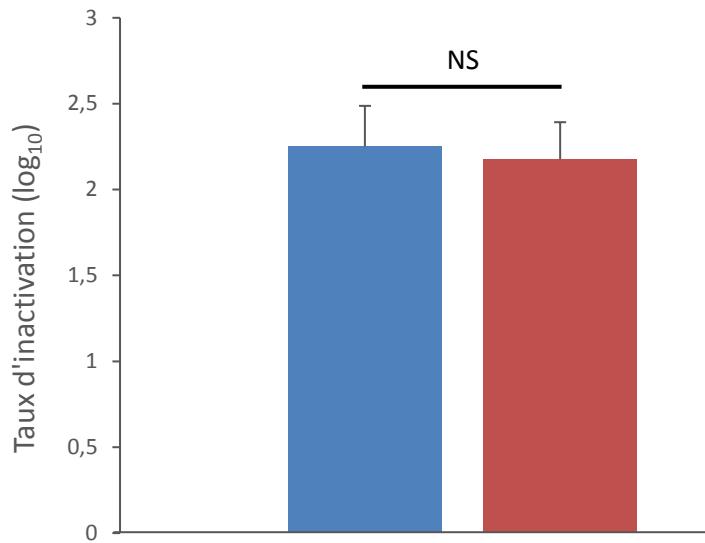


Figure 99 : Efficacité sur *Bacillus pumilus* sous forme sporulée après 500 impulsions à 10 Hz à une concentration de 1×10^6 CFU/mL (à gauche) et 1×10^7 CFU/mL (à droite). L'analyse statistique a été faite avec un test de Student (NS $P > 0,05$).

Effet des UV

Une cuvette en Quartz est placée en haut du volume d'eau déposé dans la cuvette. Dans ce cas, les UV peuvent passer à travers le Quartz et la solution est isolée des autres paramètres bactéricides. L'efficacité des UV seuls peut ainsi être évaluée.

Les résultats montrent que la diminution logarithmique obtenue avec ce traitement aux UV est proportionnelle au nombre d'impulsions appliquées par le générateur (Figure 100).

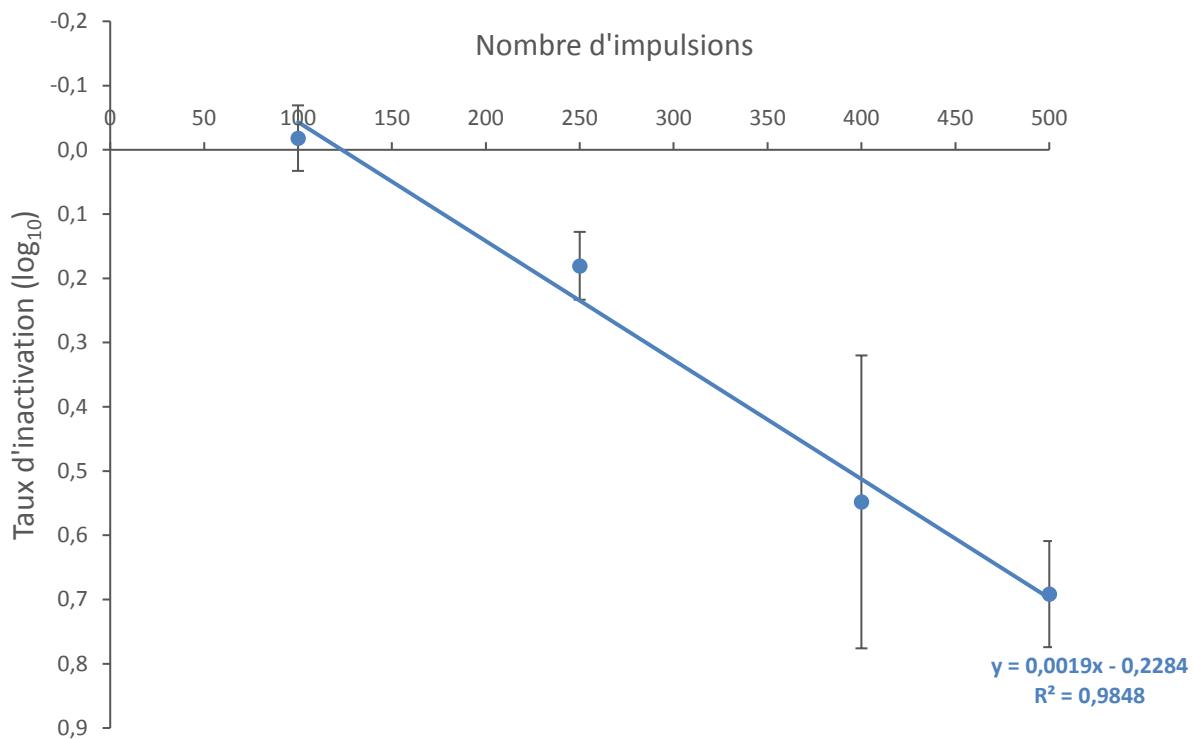


Figure 100 : Evolution de l'efficacité des UV sur *Bacillus pumilus* sous forme sporulée en fonction du nombre d'impulsions.

La quantité de photons émis est évaluée en utilisant comme réactif l'oxalate de fer. La réaction entre les photons et l'oxalate de fer conduit à la production de Fer II.

Une gamme étalon réalisée à partir de sulfate d'ammonium Fer II est réalisée pour établir un lien entre la concentration en Fer II et la DO_{510 nm} associée. La courbe correspondant à l'évolution de la DO_{510 nm} en fonction de la concentration en Fer II permettra ensuite de remonter à la quantité de Fer II créé lors de l'exposition de l'oxalate de Fer III aux rayonnements UV (Figure 101).

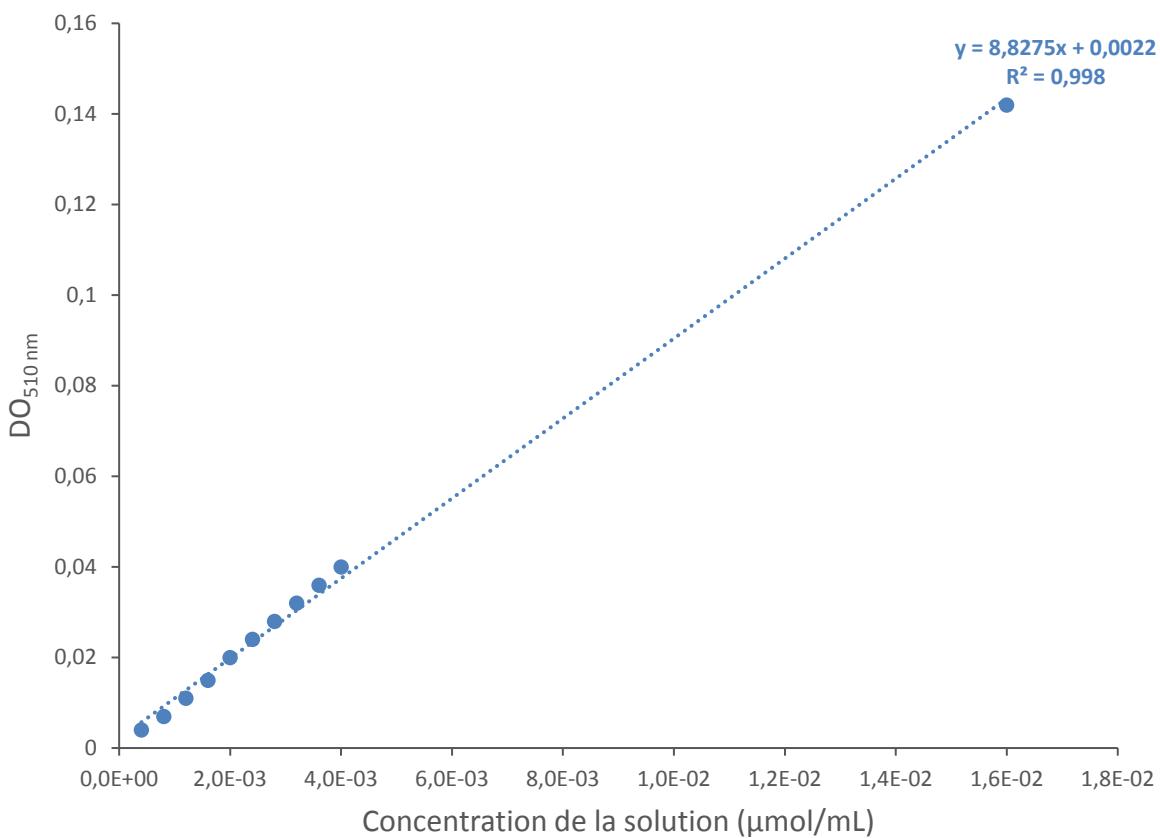


Figure 101 : Courbe étalon pour la mesure de la quantité de Fer II dans la solution par mesure de la DO_{510 nm}.

L'équation de la courbe permet de déterminer la concentration en Fer II dans la cuvette de mesure.

$$[Fe^{2+}] = \frac{DO_{510 \text{ nm}} - 0,0022}{8,8275} \quad (\text{équation 13})$$

La cuvette en Quartz contenant la solution d'oxalate de Fer III est placée à 11,589 cm des électrodes produisant la décharge électrique (cf Figure 41). La surface de la fenêtre en Quartz exposée aux rayonnements UV est de 3,85 cm². Il est considéré que le rendement quantique, c'est-à-dire la quantité d'ions ferreux réduits par photon absorbé, est de 1,26 et la fraction absorbée de 1 [140].

Les résultats obtenus sont présentés Figure 102. L'obtention d'une droite représentant l'évolution de la DO_{510 nm} en fonction du nombre d'impulsions permet de valider que l'oxalate de Fer III a bien été préparé mais également que la production de rayonnements UV est proportionnelle au nombre d'impulsions.

La quantité de photons produite a été calculée selon la formule suivante :

$$\text{Quantité de photons} = \frac{[Fe^{2+}] \times N_A \times V1/V2 \times S1/S2}{R_q} \quad (\text{équation 14})$$

Avec $[Fe^{2+}]$: la quantité en Fer II dans les 3,6 mL de la cuvette en mol
 N_A : le nombre d'Avogadro en mol^{-1}
 V_1 : le volume de l'échantillon irradié en cm^3 , $3,85\text{ cm}^3$
 V_2 : le volume de l'échantillon total dans la cuvette en cm^3 , $3,85\text{ cm}^3$
 S_1 : la surface de la sphère d'émission $S_1 = \pi \times (\text{Distance électrode cuvette})^2$ en cm^2 , 422 cm^2
 S_2 : la surface de la fenêtre en Quartz $S_2 = \text{Longueur de la cuvette exposée au traitement} \times \text{Largeur de la cuvette en cm}^2$, $3,85\text{ cm}^2$
 R_q : le rendement quantique, 1,26 [100,140].

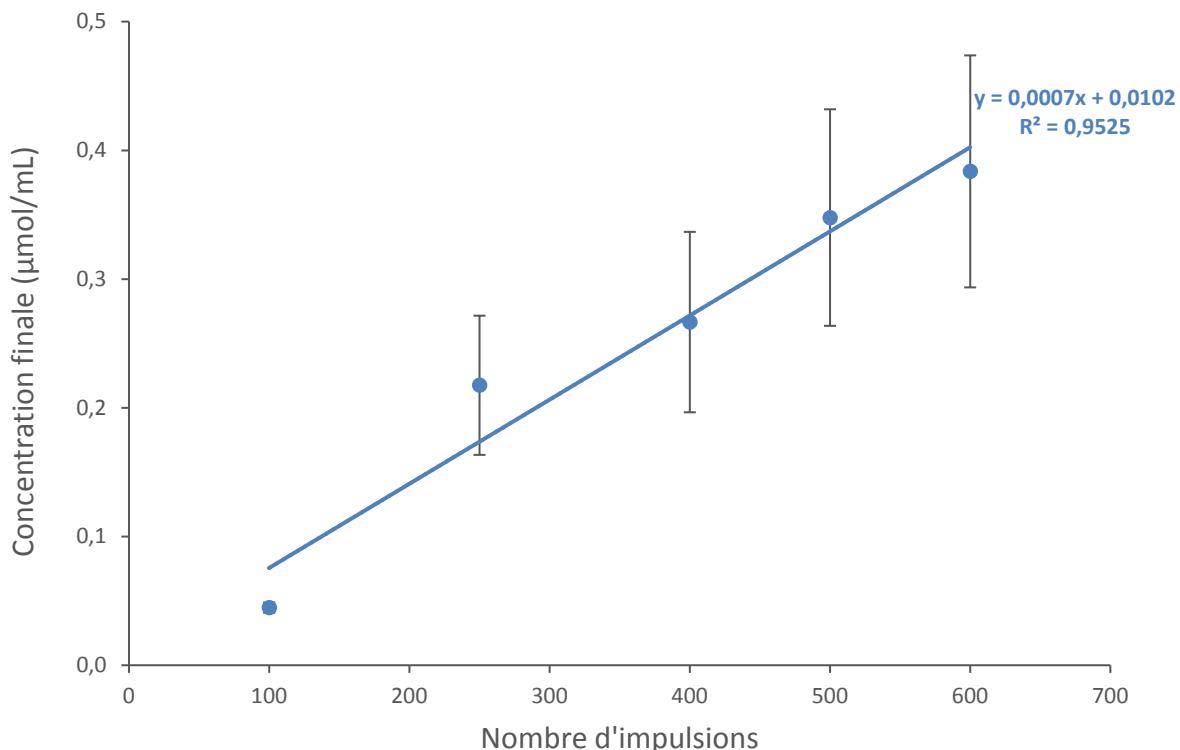


Figure 102 : Evolution de la concentration en Fer II en fonction du nombre d'impulsions.

La Figure 103 montre l'évolution de l'efficacité du traitement lorsque la solution se trouve dans la cuvette en Quartz, en fonction de la quantité de photons produits par le générateur. L'essai est réalisé en triplicat à partir de 3 cultures différentes. La p-value relative à la quantité d'UV produite varie de 9% à 26%. Il n'est donc pas possible d'affirmer que la quantité de photons et la diminution logarithmique obtenue sont proportionnelles. Cependant, il semble y avoir une relation linéaire entre ces deux paramètres.

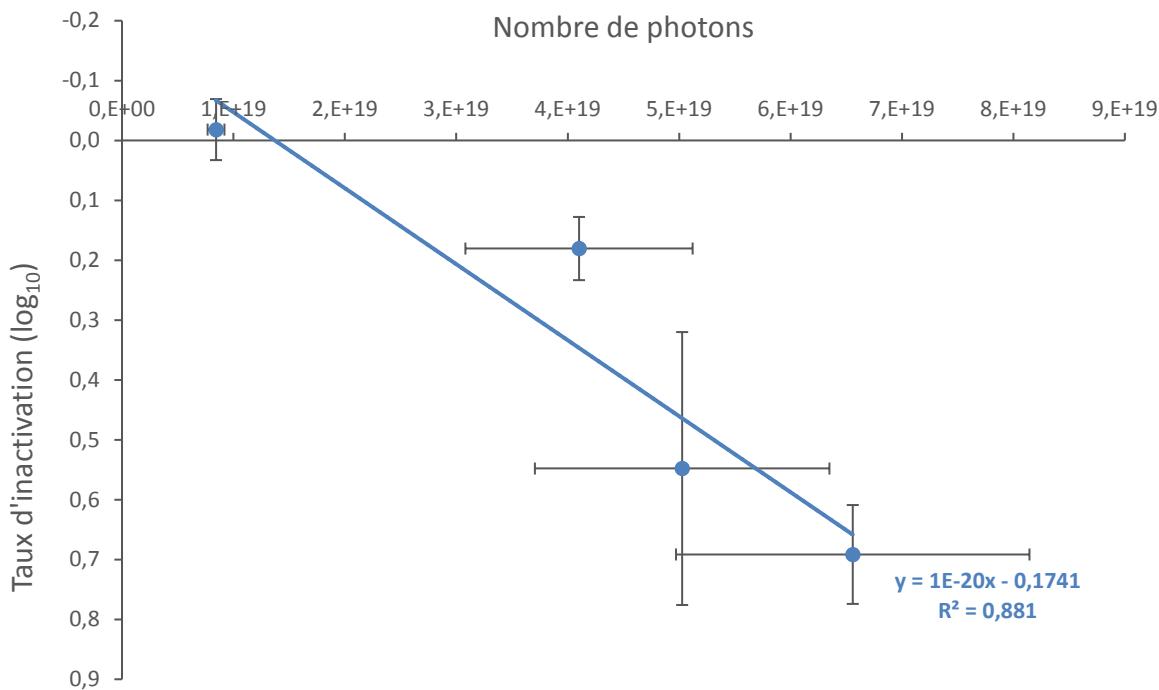


Figure 103 : Evolution de l'efficacité en fonction du nombre de photons produits.

Effet des ROS

Des espèces réactives sont également créées et permettent d'augmenter l'effet bactéricide de la technologie. Avant d'évaluer l'influence de ce paramètre, la quantité de peroxyde d'hydrogène produite après 500 impulsions à 10 Hz, composé faisant partie des ROS créés, va être évaluée.

Le kit utilisé pour faire cette mesure est composé de peroxydase, une enzyme provenant du raifort très utilisé en biochimie pour son action catalytique dans les réactions d'oxydo-réduction. Cette enzyme catalyse la réaction de réduction du peroxyde d'hydrogène en eau :



Dans la réaction chimique écrite ci-dessus, AH_2 est le substrat réducteur de la peroxydase (10-acetyl-3, 7-dihydroxyphenoxazine), qui une fois réduit donne A un composé fluorescent de teinte violette ($\lambda_{\text{excitation}} = 540 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{emission}} = 590 \text{ nm}$).

La courbe correspondant à l'évolution de la lumière émise à 590 nm en fonction de la concentration en peroxyde d'hydrogène permet de remonter à la quantité de peroxyde créé lors de l'application des 500 impulsions à 10 Hz.

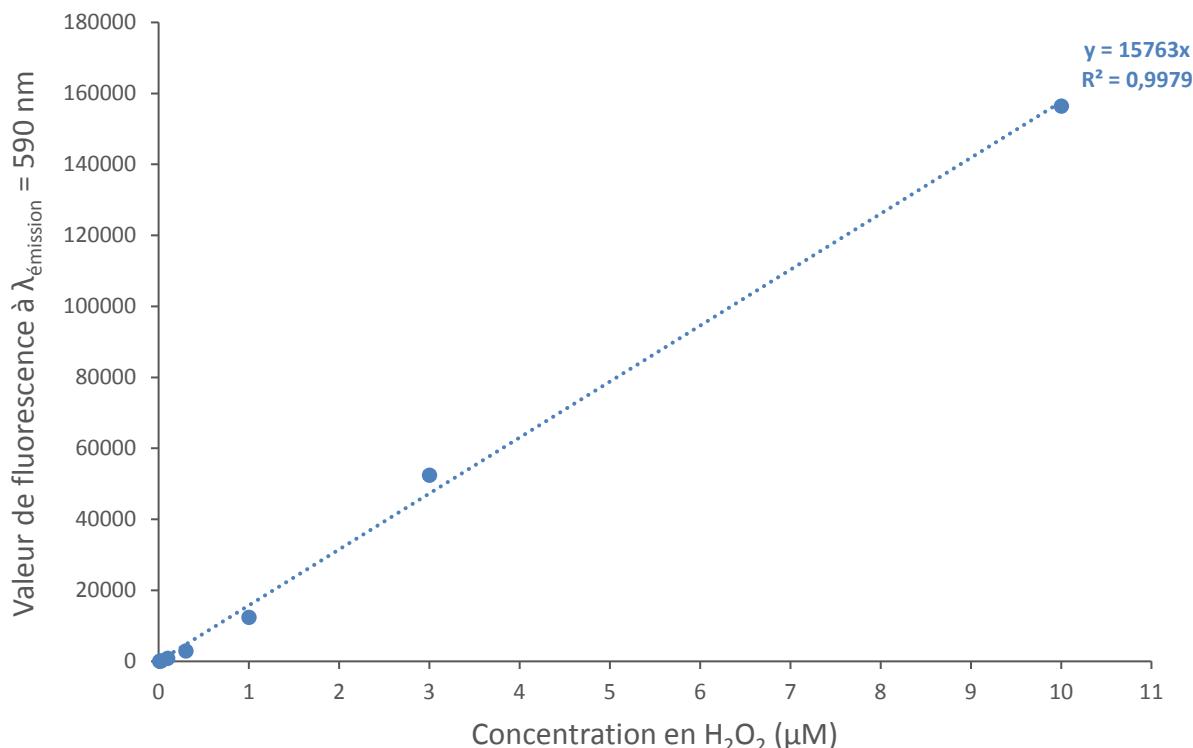


Figure 104 : Courbe de la gamme étalon représentant la valeur de fluorescence à 590 nm en fonction de la concentration en peroxyde d'hydrogène.

L'équation de la courbe permet de déterminer la concentration en peroxyde d'hydrogène dans la solution :

$$[\text{peroxyde d'hydrogène}] = \frac{\text{Valeur de fluorescence à } \lambda_{\text{émission}} \text{ à } 590 \text{ nm}}{15763} \quad (\text{équation 16})$$

Différents milieux ont été testés : l'eau du robinet, l'eau distillée et l'eau distillée contenant du pyruvate à 1mM. Aucune différence significative en matière de concentration en H_2O_2 n'a été constatée entre l'eau du robinet et l'eau distillée avec une concentration de 3,5 μM pour l'eau du robinet et de 3,9 μM pour l'eau distillée (Figure 105). Ce résultat confirme les expériences menées précédemment qui montrent la même efficacité du traitement sur *Bacillus pumilus* sous forme sporulée (cf Figure 98).

L'ajout de pyruvate dans l'eau à une concentration finale de 1 mM diminue de manière significative la quantité de H_2O_2 produite (Figure 105). Le pyruvate est connu pour son rôle de protection contre les radicaux d'oxygène et son effet antioxydant [136]. La Figure 106 montre que la présence de pyruvate diminue de manière significative l'efficacité du traitement en passant d'une diminution de $2,25 \log_{10}$ à $1,78 \log_{10}$.

La mesure de la quantité d' H_2O_2 dans le milieu a permis de révéler que l'ajout du pyruvate à 1 mM représente 30% de la concentration obtenue dans l'eau distillée sans pyruvate. Cette expérience permet de confirmer que les espèces réactives créées lors des décharges électriques dans l'eau contribuent significativement à l'efficacité du traitement.

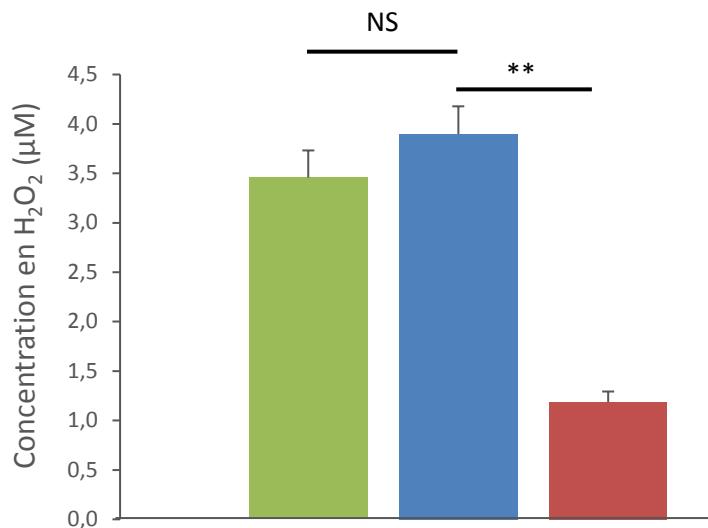


Figure 105 : Concentration en H_2O_2 en fonction du milieu testé après l'application de 500 impulsions à 10 Hz : l'eau du robinet (en vert), l'eau distillée (en bleu) et l'eau distillée contenant du pyruvate à 1 mM (en rouge). L'analyse statistique a été faite avec un test de Student (** $P < 0,01$).

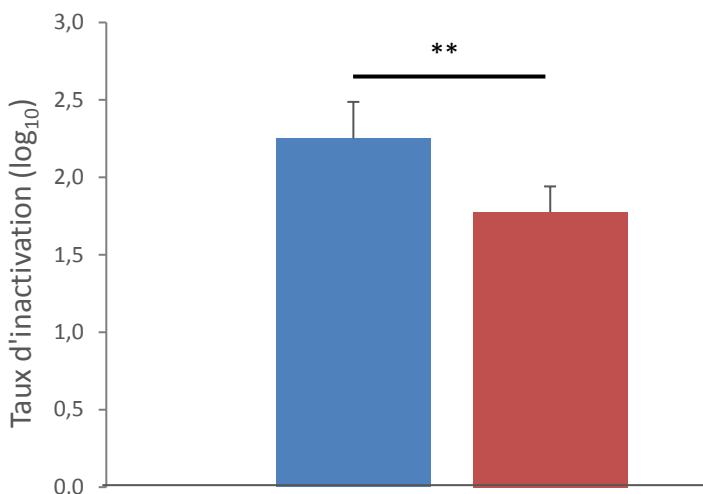


Figure 106 : Différence d'efficacité sur les spores de *Bacillus pumilus* après 500 impulsions à 10 Hz entre un milieu composé uniquement d'eau distillée (à gauche) et un milieu contenant du pyruvate à 1 mM (à droite). L'analyse statistique a été faite avec un test de Student (** $P < 0,01$).

Effet de la phase de croissance des spores de *Bacillus pumilus*

A partir des données présentées au chapitre « 3.5.2 Etude de l'effet de différents paramètres/Effet de la phase de croissance des microorganismes/*Bacillus pumilus* sous forme sporulée », des essais ont été réalisés afin d'évaluer si une différence d'efficacité est constatée

entre les spores et les spores qui commencent à germer (cultivés pendant 50 min à 37°C). Pour ce faire, 500 impulsions sont appliquées à une fréquence de répétition de 10 Hz. L'efficacité obtenue est inférieure à celle des essais précédents dans les mêmes conditions (cf Figure 97). Un problème au niveau du compteur de tir a été constaté. En effet, certains n'ont pas été comptabilisés ce qui explique l'écart. Cependant, la comparaison entre les deux conditions est toujours possible. Après une analyse statistique de la diminution logarithmique obtenue pour les deux conditions (réalisées en triplicat à partir de 3 cultures différentes), aucune différence significative n'est observée entre les spores non stimulées thermiquement et les spores incubées 50 min à 37°C (Figure 107).

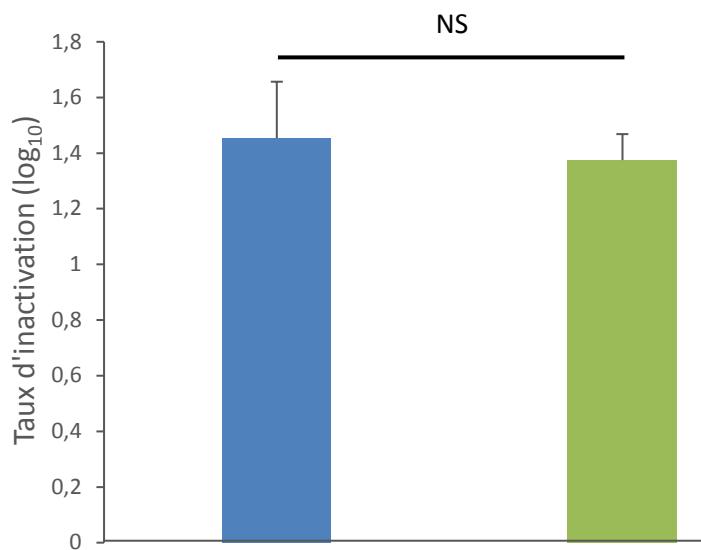


Figure 107 : Efficacité du traitement du traitement en fonction de l'état de la spore. A gauche, les spores non stimulées thermiquement et, à droite, les spores incubées 50 min à 37°C. L'analyse statistique a été faite avec un test de Student (NS $P>0,05$).

4.5. Détermination des mécanismes responsables de l'inactivation bactérienne

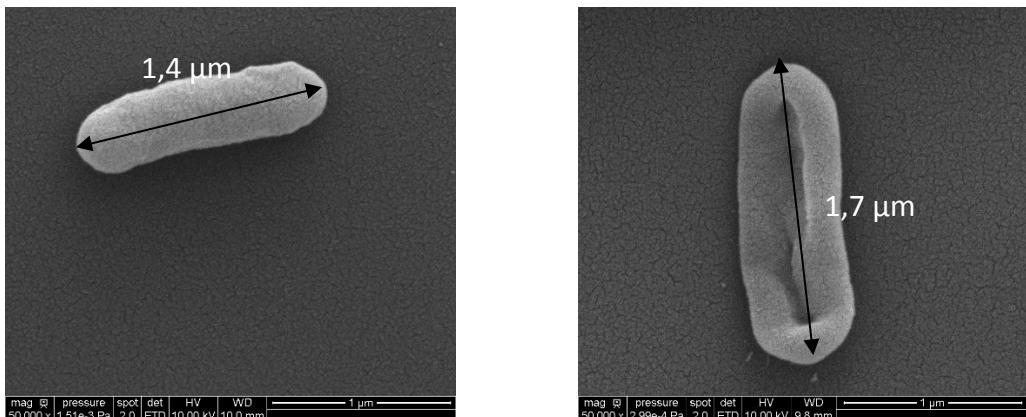
Après avoir évalué l'influence de différents paramètres sur la mortalité des bactéries, cette partie va permettre de caractériser l'état des bactéries après le traitement. Comme dans le chapitre précédent, la détermination des mécanismes responsables de l'inactivation bactérienne a été menée en utilisant, dans un premier temps, différentes techniques de microscopie complémentaires (AFM, MEB et MET). Dans un second temps, l'analyse de l'ADN a été faite à l'aide d'une PFGE. Enfin, l'intégrité des protéines sera évaluée en utilisant un gel SDS-PAGE, puis, en réalisant une analyse protéomique.

Les parties d'observation microscopique et l'étude de l'ADN ont fait l'objet d'une publication dans le journal PLOS ONE en Annexe 6 : Publication 'Electrical discharges in water induce spores' DNA damage'.

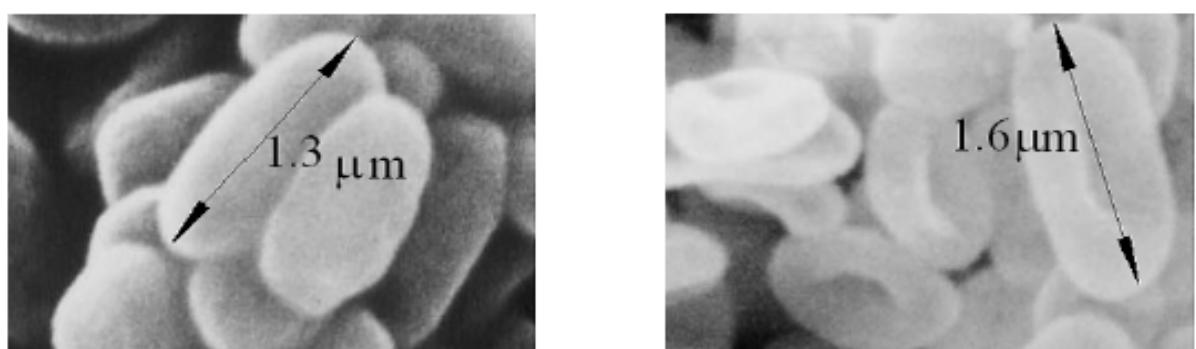
4.5.1. Etude des effets au niveau de la paroi bactérienne

Bacillus pumilus sous forme végétative

Afin d'évaluer l'altération structurale des bactéries après l'application des décharges électriques, différentes techniques de microscopie ont été employées. La MEB va permettre d'observer l'enveloppe de la bactérie. La Figure 108 est représentative des résultats obtenus après l'observation de certaines de bactéries. Elle permet de comparer la morphologie des bactéries témoin avec celle des bactéries soumises à 500 impulsions à 10 Hz. Un affaissement de l'enveloppe bactérienne est mis en évidence qui ne permet plus de contenir la pression de turgescence. Ces images sont similaires à celles obtenues par Abe *et al.* après l'application d'ondes de choc dans une suspension sur des *Vibrio* sp (Figure 109) [167].



*Figure 108 : Observation de la paroi de *Bacillus pumilus* par MEB.*
L'image de gauche montre la morphologie de la bactérie témoin dans l'eau distillée. La photographie de droite est une bactérie traitée avec 500 impulsions à 10 Hz dans un volume de 8 litres d'eau distillée. Les images choisies sont représentatives de l'ensemble des bactéries observées.



*Figure 109 : Observation d'une espèce marine de *Vibrio* avant (à gauche) et après (à droite) l'application d'une onde de choc en solution ayant pour vitesse 266 m/s, d'après [167].*

Une comparaison des longueurs et largeurs des bactéries, avant et après le traitement, est effectuée. Il est constaté une augmentation de la longueur des bactéries traitées avec une

valeur de $1,65 \pm 0,27 \mu\text{m}$ et de $1,55 \pm 0,24 \mu\text{m}$ pour les bactéries témoin (Figure 110). La même constatation peut être faite avec les mesures de largeur. Pour l'échantillon témoin, la largeur moyenne est de $0,45 \pm 0,04 \mu\text{m}$ et de $0,59 \pm 0,06 \mu\text{m}$ pour l'échantillon essai (Figure 111). Ces mesures ont été faites sur un échantillon de 178 bactéries pour le témoin et 157 bactéries pour l'essai.

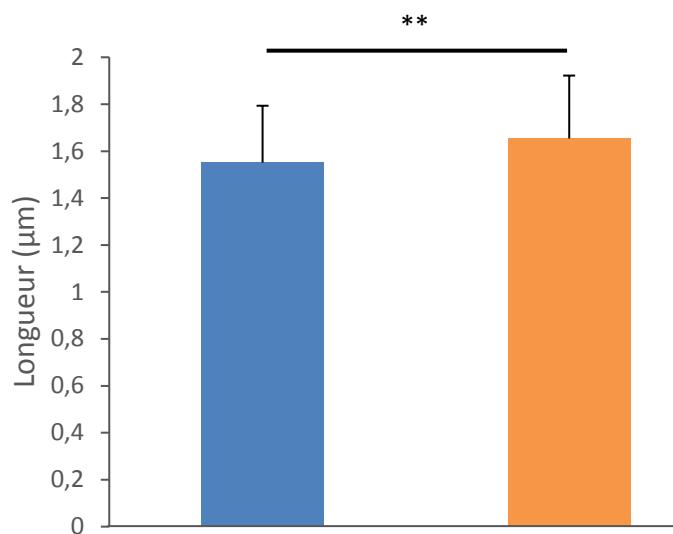


Figure 110 : Détermination de la longueur de *Bacillus pumilus* avant le traitement (à gauche) et après 500 impulsions à 10 Hz (à droite) dans un volume de 8 L d'eau distillée. L'analyse statistique a été faite avec un test de Student (** $P < 0,01$).

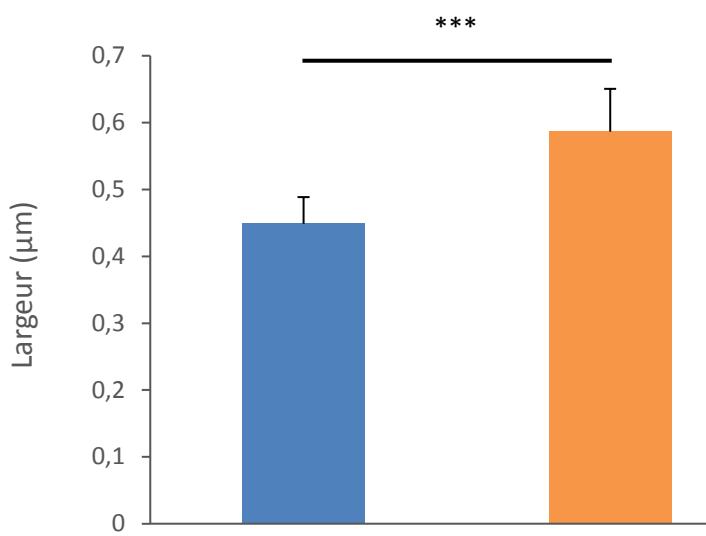


Figure 111 : Détermination de la largeur de *Bacillus pumilus* avant le traitement (à gauche) et après 500 impulsions à 10 Hz (à droite) dans un volume de 8 L d'eau distillée. L'analyse statistique a été faite avec un test de Student (** $P < 0,0001$).

L'utilisation d'une autre technique de microscopie électronique, la MET, permet de compléter ces observations. La Figure 112 montre les résultats obtenus sur les mêmes échantillons que précédemment en MET. L'observation des bactéries témoin montre une totale occupation de l'espace intérieur de la bactérie par le cytoplasme. En revanche, sur l'image de droite, après l'application de 500 impulsions à 10 Hz, le centre de la bactérie apparaît en blanc. Cela traduit une fuite de matériel du cytoplasme vers l'extérieur de la bactérie. Cette observation confirme les premières conclusions faites en MEB.

L'observation de la paroi et de la membrane plasmique avec un grossissement de 50 000x ne permet pas de révéler d'altération de l'enveloppe bactérienne. Les dommages causés par le traitement sont vraisemblablement trop petits pour pouvoir être observés avec cette technique de microscopie.

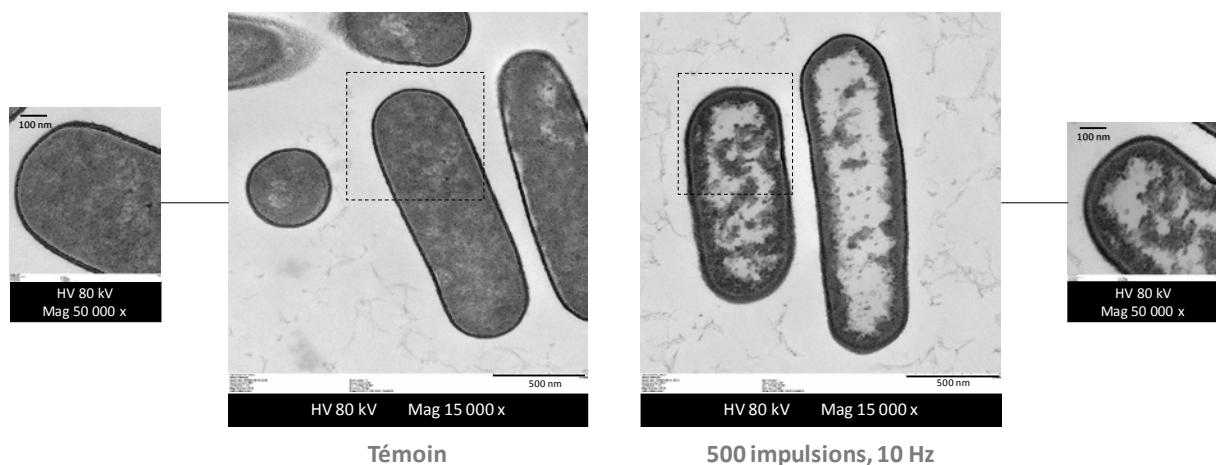


Figure 112 : Observation de l'organisation de *Bacillus pumilus* par MET.

L'image de gauche montre la morphologie de la bactérie avant d'avoir été traitée par des décharges électriques. La photographie de droite montre, quant à elle, des bactéries traitées avec 500 impulsions à 10 Hz dans 8 L d'eau distillée stérile. Les carrés en pointillés indiquent la zone dans laquelle le zoom a été effectué pour les images situées de part et d'autre de la vue globale de la bactérie. Les images choisies sont représentatives de l'ensemble des bactéries observées.

Comme dans le cas des essais effectués pour le faisceau d'électrons, l'iodure de propidium est utilisé pour révéler une perméabilisation de la membrane bactérienne. Les résultats obtenus sont présentés en Figure 113. Le niveau de fluorescence des bactéries témoin par rapport aux bactéries traitées a été évalué sur un échantillon de 781 bactéries témoin et 641 bactéries traitées. Les valeurs d'intensité de fluorescence obtenues sont très faibles, en moyenne 773 ± 162 pour les témoins et 544 ± 87 pour les bactéries traitées. Il n'a donc pas été mis en évidence de perméabilisation irréversible de la paroi par l'utilisation de l'iodure de propidium. La Figure 113 est une image type donnée par le microscope à fluorescence.

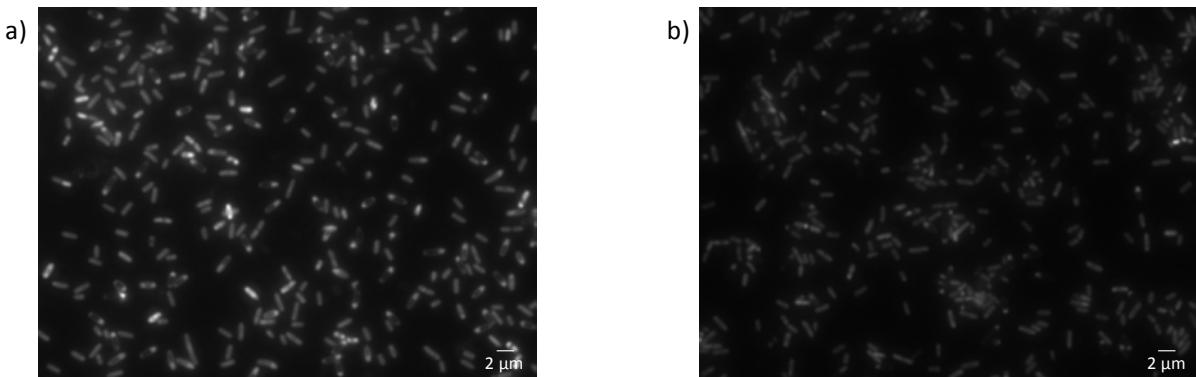


Figure 113 : Observation de la forme végétative de *Bacillus pumilus* avant (a) et après (b) l'application de 500 impulsions à 10 Hz.

Une approche complémentaire est utilisée pour mettre en évidence la perméabilité. Elle vise à évaluer la quantité de protéines et d'ADN présente dans le milieu. En effet, leur présence dans le surnageant traduirait une fuite du matériel contenu dans le cytoplasme. La quantité d'ADN et de protéines dans le surnageant est mesurée en utilisant un spectrophotomètre nécessitant un faible volume (NanoDropTM, Thermo ScientificTM). Les mesures se font à 260 nm pour l'ADN et 280 nm pour les protéines. Les résultats sont présentés dans le Tableau 31. La comparaison des valeurs obtenues pour les échantillons témoins (T1 et T2) avec ceux des échantillons essais (E1 et E2) ne permet pas de révéler la présence de ces macromolécules dans le milieu. En effet, la plage d'analyse du NanoDrop est de 4 à 1 500 ng/μL d'ADN. La quantité d'ADN mesurée est donc trop faible.

Tableau 31 : Résultats de la mesure d'absorbance à 260 nm pour l'ADN et 280 nm pour les protéines dans le milieu.

Echantillons	Q _{ADN} (ng/μL)	A ₂₆₀	A ₂₈₀	A ₂₆₀ A ₂₈₀
T1	0,9	0,018	-0,009	-1,97
E1	1,3	0,025	-0,004	-6,26
T2	0,5	0,010	-0,015	-0,66
E2	1,14	0,028	-0,003	-10,62

Bacillus pumilus sous forme sporulée

L'intégrité de l'enveloppe cellulaire des spores est cruciale pour leur survie. L'observation de cette enveloppe est faite par l'utilisation de différents outils de microscopie : l'AFM et la MEB. L'observation de l'organisation interne de la bactérie est également un élément important qui peut révéler des dégradations suite au traitement. La MET est utilisée pour répondre à cette problématique.

Pour les spores non traitées (Figure 114 a et b), la présence de crêtes sporales est observée en AFM. Ces crêtes ont déjà été observées par Pillet *et al.* sur la même souche bactérienne [40]. Après l'exposition aux décharges électriques, les crêtes sporales sont toujours visibles.

Aucun dommage n'est mis en évidence. La Figure 114 montre un exemple typique d'images obtenues.

Une mesure de la rugosité à partir de 15 images de hauteur provenant de spores différentes est effectuée. Pour les spores témoins, une rugosité de 9 ± 6 nm est obtenue et $6,5 \pm 3$ nm, pour les spores traitées. L'analyse statistique ne révèle pas de différences significatives entre les deux conditions (Figure 115).

Grâce à la fonctionnalisation de la pointe avec une molécule hydrophobe, le 1-dodécylmercaptane, une mesure de l'adhésion de la paroi est possible. A partir de 10 images de hauteur provenant de spores différentes, l'adhésion des spores témoins est de $215,7 \pm 121$ pN. Pour les spores essais, 12 bactéries ont été analysées et la valeur d'adhésion obtenue est de $171,1 \pm 96$ pN. L'analyse statistique ne révèle pas de différences significatives entre les deux conditions (Figure 116).

Afin de compléter ces résultats, des analyses complémentaires sont réalisées avec d'autres outils de microscopie.

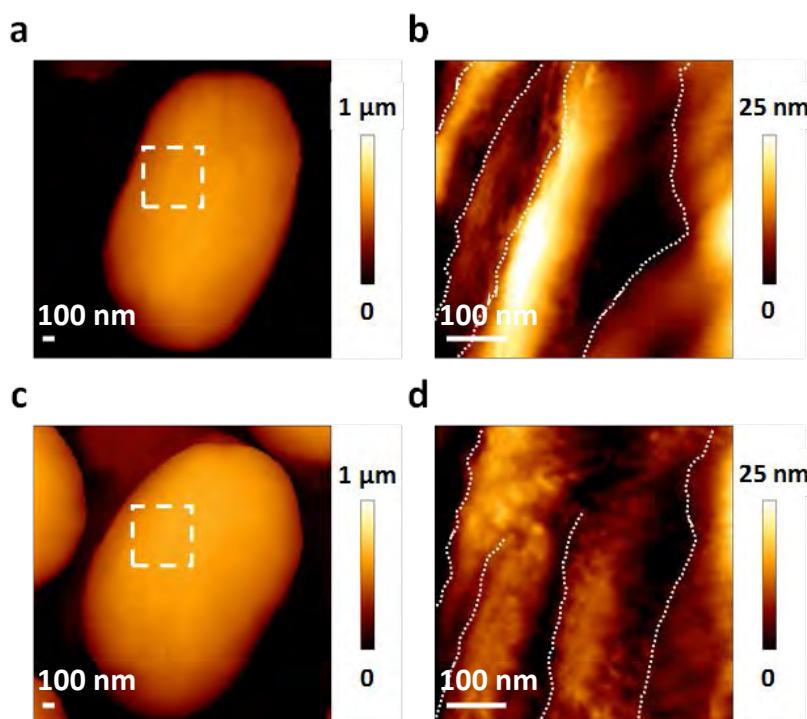


Figure 114 : Observation de la paroi des spores par AFM liquide avant et après l'application des décharges électriques.
a) Image d'une spore non traitée, b) zoom sur une partie de la spore (indiqué par le carré blanc) indiquant les crêtes de surface (lignes en pointillées), c) Image d'une spore traitée avec 500 impulsions et 10 Hz, d) zoom sur une partie de la spore traitée avec en pointillées blanc les crêtes, e) Analyse statistique de la rugosité réalisée sur 15 spores par condition. En noir, les spores témoins et en gris les spores traitées. Les images sont représentatives de l'ensemble des bactéries observées.

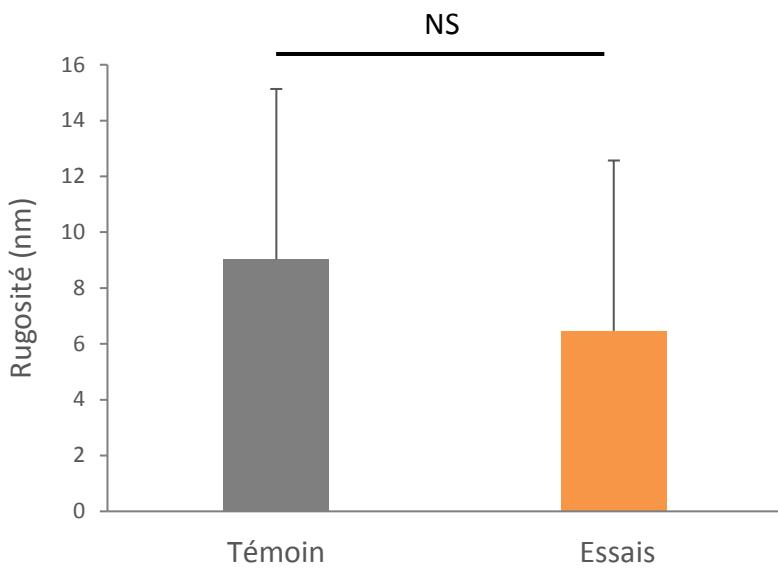


Figure 115 : Rugosité des bactéries témoins (en gris) et traitées (en orange). L'étude est réalisée sur 15 bactéries par condition. L'analyse statistique a été faite avec un test de Student (NS $P>0,05$).

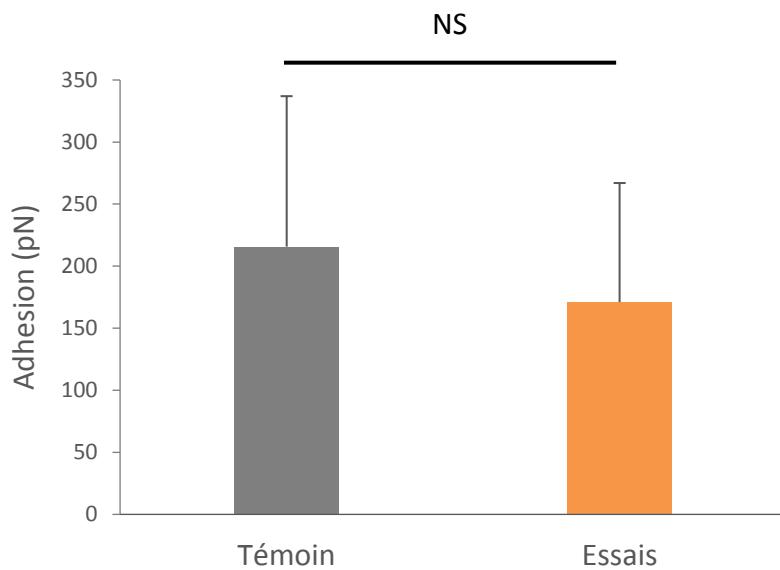


Figure 116 : Force d'adhésion de la pointe à la surface des bactéries témoins (en gris) et traitées (en orange). L'étude a été réalisée sur 10 bactéries pour le témoin et 12 pour l'essai. L'analyse statistique a été faite avec un test de Student (NS $P>0,05$).

La paroi des bactéries est donc ensuite observée par MEB. La Figure 117 est un exemple d'images obtenues avec un grossissement 50 000x. Elle permet de mettre en évidence la présence de crêtes sporales pour les spores témoins comme pour les spores irradiées (flèches blanches). La MEB ne révèle pas de dommages au niveau de la paroi. La taille des dommages est peut-être trop faible pour être détectée par cette technique.

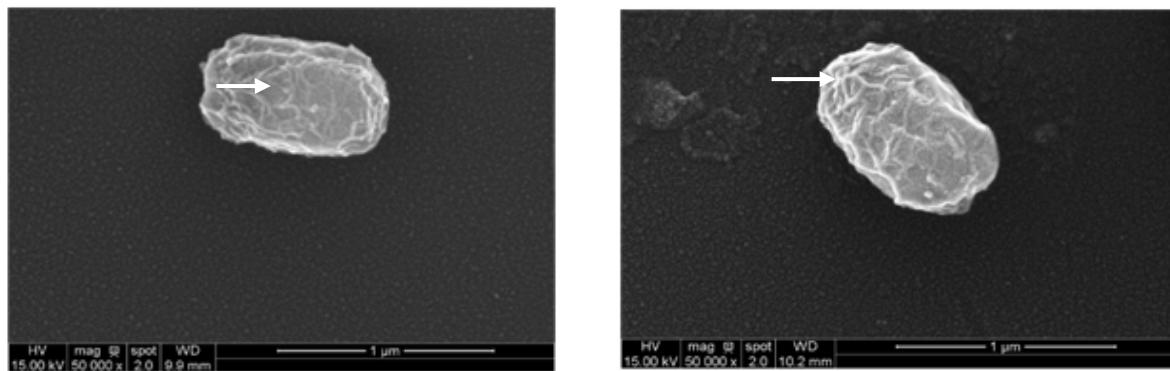


Figure 117 : Observation de la paroi des spores de *Bacillus pumilus* par MEB.

L'image de gauche montre la morphologie de la spore avant d'avoir subi les décharges électriques dans l'eau distillée. La photographie de droite est une spore traitée avec 500 impulsions à 10 Hz dans un volume de 8 litres. Les flèches indiquent la présence de crêtes sporales. Les images choisies sont représentatives de l'ensemble des bactéries observées.

Un autre indicateur peut être un changement de taille de la bactérie traduisant un échange de matériel entre la bactérie et le milieu environnant. A partir des images de MEB, une mesure du volume des spores est effectuée. Comme il est montré en Figure 118, le volume des spores reste identique entre l'échantillon témoin et l'échantillon exposé. Le volume moyen pour les spores témoin est de $0,20 \mu\text{m}^3 \pm 0,03$ contre $0,20 \mu\text{m}^3 \pm 0,02$ pour les spores traitées. Il ne semble donc pas y avoir de dommage important pouvant avoir un effet sur l'intégralité de la paroi suite au traitement par décharges électriques.

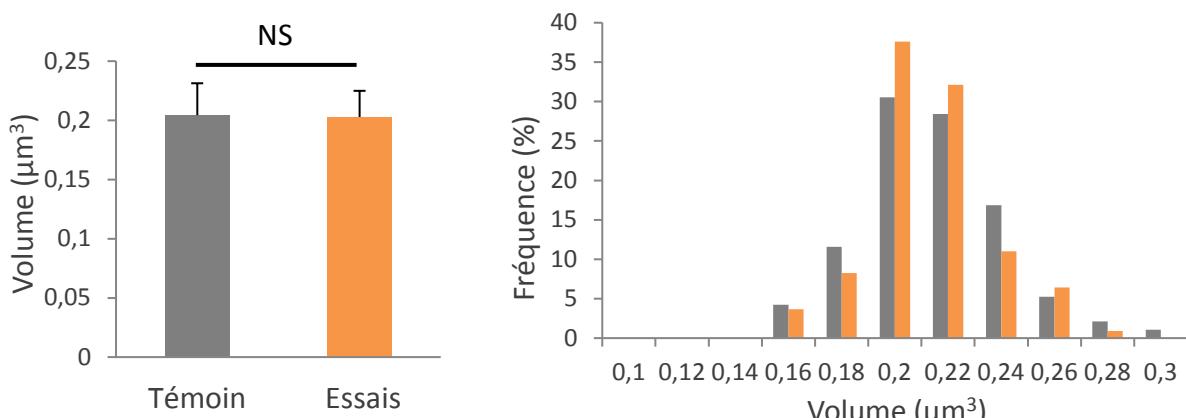


Figure 118 : Comparaison du volume des spores à l'aide des images de MEB.

A gauche, la mesure du volume des spores des échantillons témoins (en gris) et des échantillons exposés à 500 impulsions, 10 Hz dans 8 litres d'eau distillée (en orange). Il a été supposé que la largeur des spores correspondait à la hauteur de ces dernières pour évaluer le volume. Une étude statistique avec le test de Student a été menée sur les 95 bactéries mesurées par condition (NS $P>0,05$). A droite, la fréquence de distribution des volumes calculés est reportée.

Les deux techniques employés (AFM et MEB) n'ont pas révélé de modification de l'intégrité de la paroi sporale. Il a été décidé d'utiliser la MET pour accéder à l'organisation interne des différentes parties constituant la spore. En Figure 119, il est facile de distinguer le cœur, le cortex et le manteau de la spore. Sur le zoom à 100 000x, il est même possible de distinguer clairement les différentes couches du manteau. Enfin, aucun matériel n'est visible à l'extérieur de la spore traitée ce qui aurait pu montrer une modification de l'intégrité de la spore.

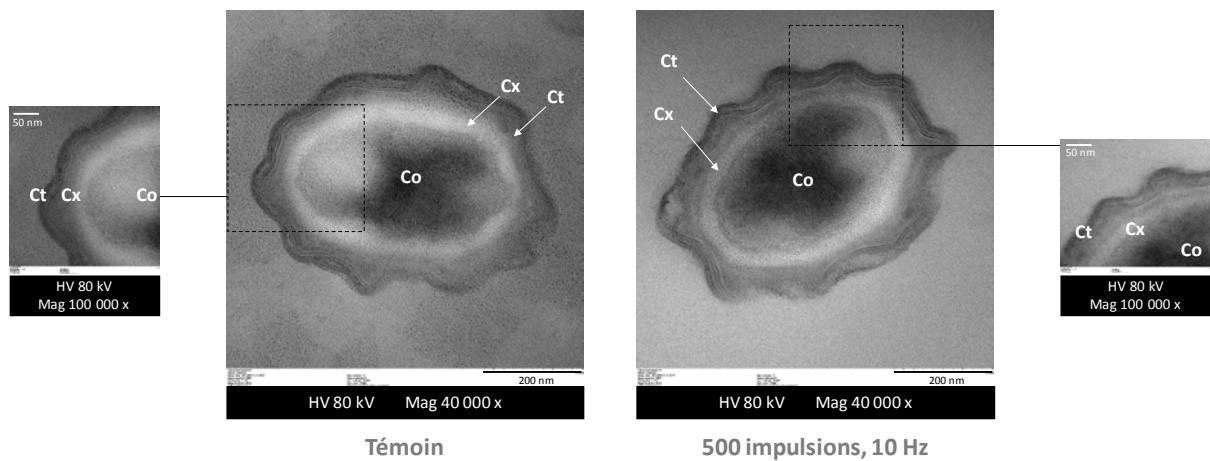


Figure 119 : Observation de l'organisation des spores de *Bacillus pumilus* par MET.

L'image de gauche montre la morphologie de la spore avant le traitement par décharges électriques. La photographie de droite est une spore traitée avec 500 impulsions à 10 Hz dans 8 litres d'eau distillée stérile. Le carré en pointillé indique la zone dans laquelle le zoom a été effectué pour les images situées de part et d'autres de la vue globale de la bactérie.

L'échelle de taille pour les vues globales est de 200 nm et de 50 nm pour les zooms. Les images choisies sont représentatives de l'ensemble des bactéries observées.

Co : Cœur (Core), Cx : Cortex et Ct : Manteau (Coat).

L'observation de l'intégrité de la paroi et de l'architecture intracellulaire de la bactérie a permis de mettre en évidence un affaissement de l'enveloppe bactérienne dans le cas de l'application de décharges électriques sur la forme végétative de *Bacillus pumilus*. Cette observation peut expliquer l'effet bactéricide de la technologie. En revanche, pour la forme sporulée, aucune modification en terme de morphologie ou de volume n'est constatée.

4.5.2. Etude des effets au niveau de l'ADN

Le calcul de la taille des fragments a été présenté précédemment dans le paragraphe 3.7.2.

L'électrophorèse a été effectuée en utilisant le système CHEF-DR III (Bio-Rad) à 14°C pendant 18 h avec un champ électrique de 6V/cm et une durée d'impulsion évoluant de 1 à 50 s avec un angle de 120°. La Nucléase S1 permet de reconnaître les sites ayant subi des ruptures simple brin et de couper l'autre brin d'ADN situé en face. L'Endonucléase IV est spécifique des sites abasiques et l'Endonucléase V reconnaît les dimères de pyrimidine.

Bacillus pumilus sous forme végétative

Une PFGE a été réalisée sur la forme végétative de *Bacillus pumilus* après l'application de 500 impulsions à 10 Hz et dans 8 L d'eau distillée stérile. Les résultats de la Figure 120 montrent que les échantillons témoins (puits 1 et 2) présentent un ADN en partie dégradé. En effet, les bandes correspondant aux différents fragments de l'ADN digéré par NotI sont bien visibles mais des « smears » sont également présents. Le temps de transport des bactéries dans la solution de traitement d'ITHPP vers l'IPBS, ou leur conditionnement, n'est pas adapté pour ce type d'analyse et l'ADN des bactéries a été dégradé. Il est tout de même intéressant de noter que l'ajout de la Nucléase S1 dans l'échantillon essai conduit à un « smear » plus important que dans les autres puits. Il peut donc être supposé que l'application des décharges électriques sur les bactéries végétatives conduit à la création de cassures simple brin.

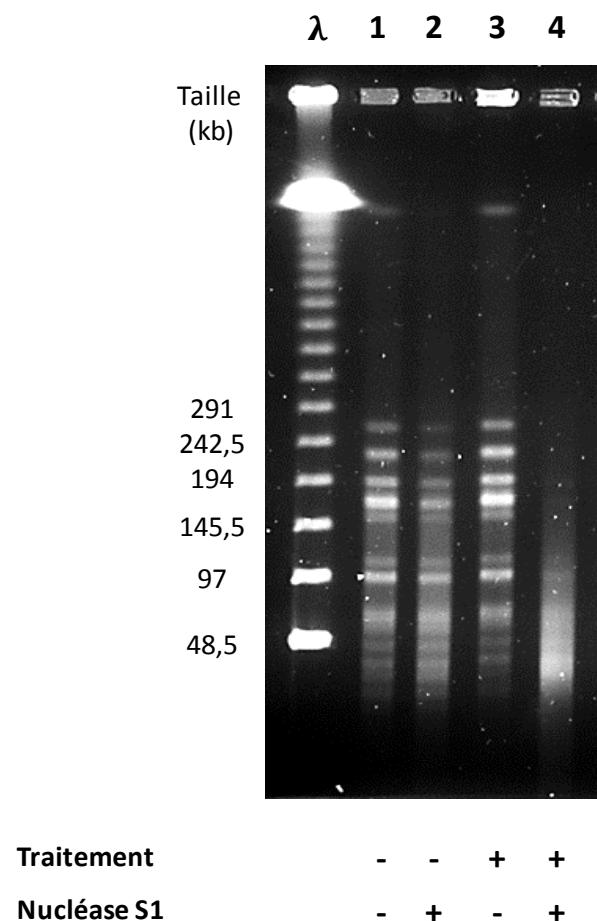


Figure 120 : PFGE sur *Bacillus pumilus* sous forme végétative sans traitement (puits 1 et 2) et après 500 impulsions à 10 Hz

(puits 3 et 4).

Le marqueur de taille est Lambda (48,5-1 000 kb ; Bio-Rad).

Bacillus pumilus sous forme sporulée

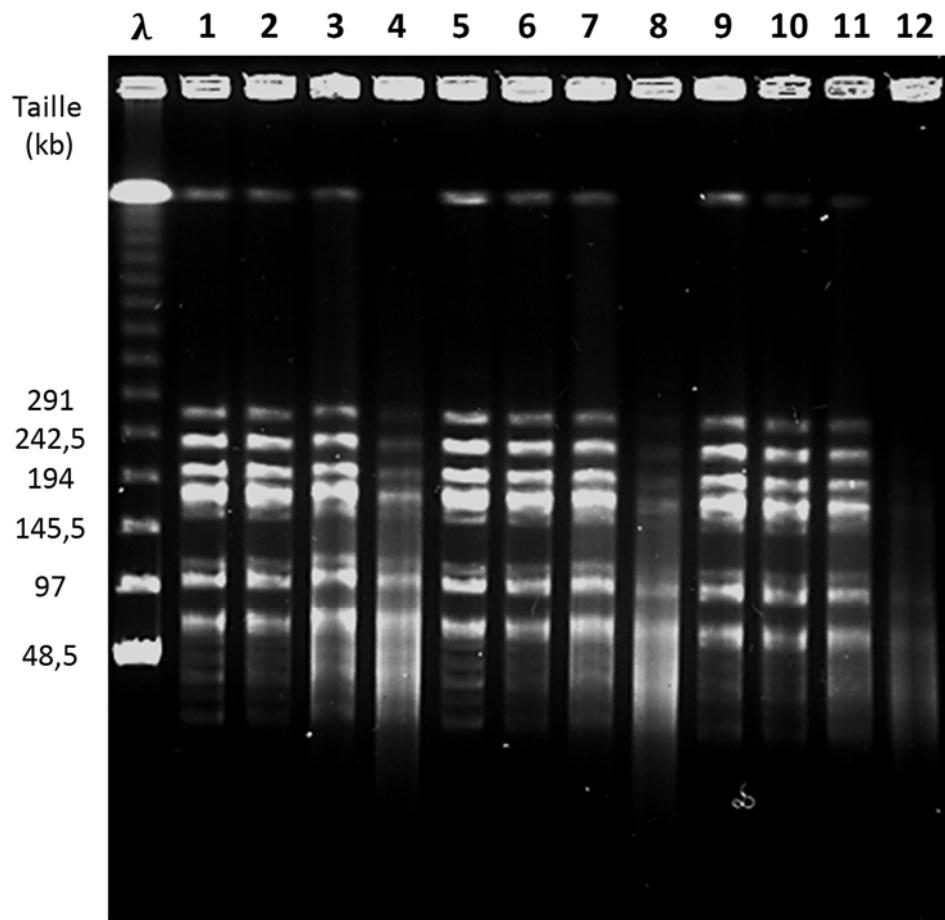
Une comparaison de l'intégrité de l'ADN entre les échantillons témoins (puits 1, 2, 5, 6, 9 et 10) et les essais (puits 3, 4, 7, 8, 11 et 12) est présentée en Figure 121. Les échantillons essais ont été traités avec 500 impulsions à 10 Hz dans un volume de 8 L. La concentration en bactéries de la solution était de $2,6 \times 10^7$ UFC/mL.

Les puits 1 et 2 confirment que le protocole d'extraction de l'ADN sporal n'induit pas de cassures double brin (puits 1) ou simple brin (puits 2). En effet, les bandes obtenues sont celles attendues et correspondent aux témoins présentés dans la Figure 76 et aucun « smear » n'est présent. Dans le puits 3, les différentes bandes observées sur le témoin sont toujours présentes mais un « smear » est également constaté. Cela traduit la présence de cassures double brin au niveau de l'ADN. Après l'ajout de l'enzyme de restriction Nucléase S1 (puits 4), la présence de bandes du puits témoin est toujours observée mais avec des intensités beaucoup plus faibles, notamment pour le brin d'ADN le plus long (bande du haut). Cela signifie que le traitement induit des dommages au niveau de l'ADN par la création de coupures simple brin. Au vu du profil obtenu, l'extinction quasi-totale de la bande 1 Mb laisse à penser que le nombre de bases entre deux cassures est majoritairement supérieur à 48,5 kb.

Les puits 5 et 6 confirment que l'ajout de l'Endonucléase IV n'induit pas de cassures double brin (puits 5) ni simple brin (puits 6). En effet, les bandes obtenues sont celles attendues et correspondent aux témoins des puits 1 et 2. En revanche, dans le puits 7, les différentes bandes présentes sur le témoin sont toujours observées mais on constate également la présence de « smears ». Le profil est identique à celui obtenu en puits 3. L'ajout de l'Endonucléase IV ne permet pas de révéler la présence de sites AP. L'ajout de la Nucléase S1 (puits 8) conduit à la création de cassures visibles sur le gel (« smear » plus important qu'en puits 7). L'allure est cependant identique à celle obtenue en puits 4. Par conséquent, le traitement n'a pas conduit à la production de sites AP, ou pas de manière suffisante, pour qu'ils soient détectés.

Les puits suivants révèlent la présence de dimères de pyrimidine par l'ajout dans le milieu de l'Endonucléase V. Comme précédemment, les puits 9 et 10 montrent que la présence de l'enzyme n'induit pas de cassures double brin (puits 9) ni simple brin (puits 10). En effet, les bandes obtenues correspondent aux témoins des puits 1 et 2. Le puits 11 montre l'apparition de « smears » similaires à ceux obtenus au niveau du puits 3. La présence de dimère de pyrimidine est mise en évidence au niveau du puits 12 par l'ajout de la Nucléase S1. En effet, en comparant les résultats du puits 12 avec ceux du puits 4, il est à noter que le « smear » obtenu est plus diffus. Le traitement conduit donc à la création de dimères de pyrimidine.

Ces remarques permettent d'expliquer, au moins en partie, le phénomène conduisant à la mort bactérienne. Tout d'abord, l'apparition d'une cassure double brin au niveau de l'ADN est critique pour le maintien de l'intégrité chromosomique. Des mécanismes de réparation existent. Mais, dans le cas où les lésions sont trop importantes, la bactérie peut s'engager dans le processus de mort cellulaire, c'est le phénomène d'apoptose. De plus, la présence de modifications au niveau de l'ADN, les cassures simple brin, la présence de dimères de pyrimidine, sont également des facteurs pouvant conduire à la mort bactérienne.

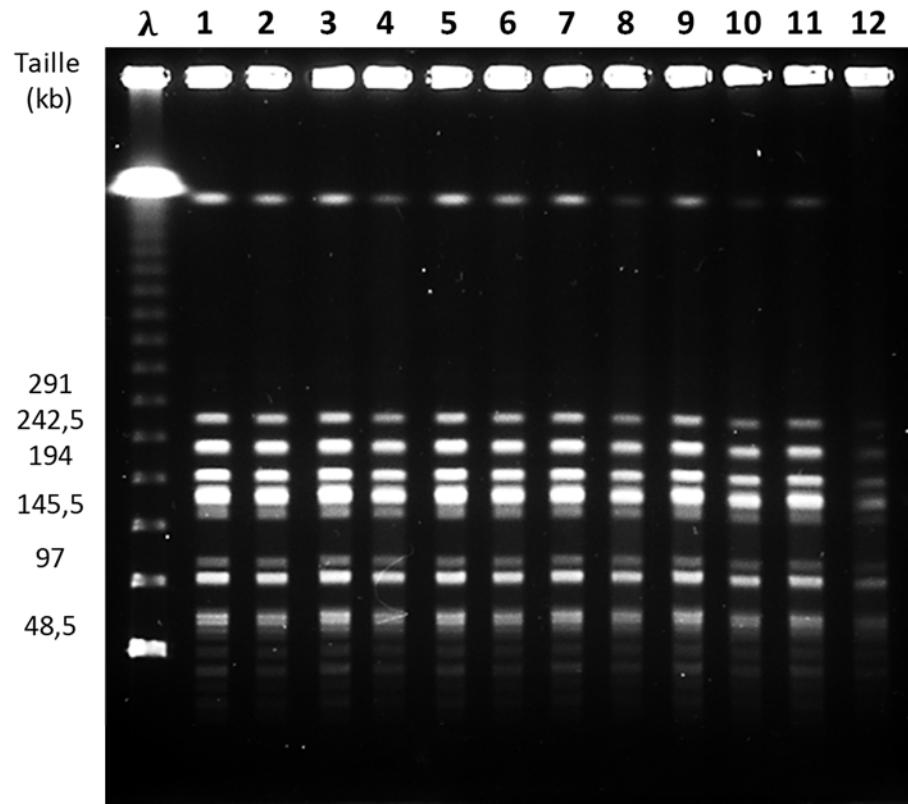


Traitement	-	-	+	+	-	-	+	+	-	-	+	+
Nucléase S1	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+
Endonucléase IV	-	-	-	-	+	+	+	+	-	-	-	-
Endonucléase V	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+

Figure 121 : PFGE sur les souches de *Bacillus pumilus* sous forme sporulée sans traitement (puits 1, 2, 5, 6, 9 et 10) et après 500 impulsions à 10 Hz (puits 3, 4, 7, 8, 11 et 12).
Le marqueur de taille est Lambda (48,5-1 000 kb ; Bio-Rad).

Dans un second temps, l'effet des UV sur la dégradation de l'ADN est étudié. Une suspension de spores a donc été placée dans une cuvette en Quartz afin de ne laisser passer que les UV. Les spores sont ainsi isolées des autres phénomènes physico-chimiques produits lors de l'application des décharges électriques dans l'eau. Aucune différence entre les différents puits témoin (puits 1, 2, 5, 6, 9 et 10) et essai (puits 3, 4, 7, 8 et 11) n'est visible. Seul le puits 12 montre une diminution de l'intensité des bandes traduisant la présence de dimères de pyrimidine suite à l'application des impulsions. La Figure 122 montre les résultats obtenus. Il est possible que la dégradation de l'ADN constatée au niveau de la Figure 121 soit due à un effet combiné de plusieurs phénomènes. Par exemple, les cavitations ultrasoniques

augmentent les performances biocides des UV [112]. Dans tous les cas, l'effet bactéricide des UV montré dans ce chapitre au paragraphe 'Etude de l'effet de différents paramètres/Effet des UV' conduit surement à d'autres modifications au sein de la spore.



Traitement	-	-	+	+	-	-	+	+	-	-	+	+
Nucléase S1	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+
Endonucléase IV	-	-	-	-	+	+	+	+	-	-	-	-
Endonucléase V	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+

Figure 122 : PFGE sur *Bacillus pumilus* sous forme sporulée dans une cuvette en Quartz sans traitement (puits 1, 2, 5 et 6) et après 500 impulsions à 10 Hz (puits 3, 4, 7 et 8).
Le but de cette expérience est d'évaluer l'effet des UV sur l'ADN des spores.

4.5.3. Etude des effets au niveau des protéines

Comme pour l'étude des protéines réalisée pour la partie 'faisceau d'électrons pulsés', deux méthodes complémentaires ont été utilisées :

- L'analyse sur gel SDS-PAGE
- L'analyse par spectrométrie de masse.

Ces analyses ont été effectuées sur la forme végétative et la forme sporulée de *Bacillus pumilus*.

Bacillus pumilus sous forme végétative

Gel SDS-PAGE

Afin de déposer la même quantité de protéines dans chaque puits, un dosage des protéines est préalablement effectué à l'aide du kit DC Protein Assay II (Bio-Rad). Les valeurs de concentration des triplicats sont similaires. Le protocole employé est donc reproductible d'une expérience à l'autre. Les résultats du dosage sont présentés dans le Tableau 32.

Les essais ont été réalisés en triplicat à partir de trois cultures différentes.

Tableau 32 : Dosage des protéines contenues dans les échantillons à partir de différentes cultures de *Bacillus pumilus* végétative avant et après le traitement avec 500 impulsions et 10 Hz.

Végétatives	Concentration en protéines des échantillons (mg/mL)				
	1	2	3	Moyenne sans dilution	Ecart-type
Témoin culture 1, dilution 1/4	0,638	0,608	0,633	2,505	0,064
Essai culture 1, dilution 1/4	0,553	0,583	0,558	2,258	0,064
Témoin culture 2, dilution 1/4	0,688	0,743	0,743	2,899	0,127
Essai culture 2, dilution 1/4	0,718	0,693	0,773	2,913	0,164
Témoin culture 3, dilution 1/4	0,798	0,793	0,798	3,187	0,012
Essai culture 3, dilution 1/4	0,763	0,733	0,708	2,939	0,110

Le gel obtenu sur les trois cultures de *Bacillus pumilus* est présenté Figure 123. Les puits 1, 3 et 5 représentent les témoins. Les différentes bandes obtenues sont, respectivement, comparées avec celles des puits 2, 4 et 6 qui correspondent à des bactéries ayant reçues 500 impulsions à 10 Hz.

Il est intéressant de remarquer que d'une culture à l'autre les profils peuvent être différents (puits 1, 3 et 5).

La comparaison des profils, pour une même culture, entre les échantillons témoins et essais montre une différence. L'intensité des bandes est plus faible chez l'essai, laissant supposer une dégradation des protéines par le traitement. En revanche, d'autres bandes sont plus intenses suggérant une quantité de protéines, ayant ce poids moléculaire, plus importante (quelques exemples au niveau des flèches). L'analyse protéomique permettra de valider cette constatation.

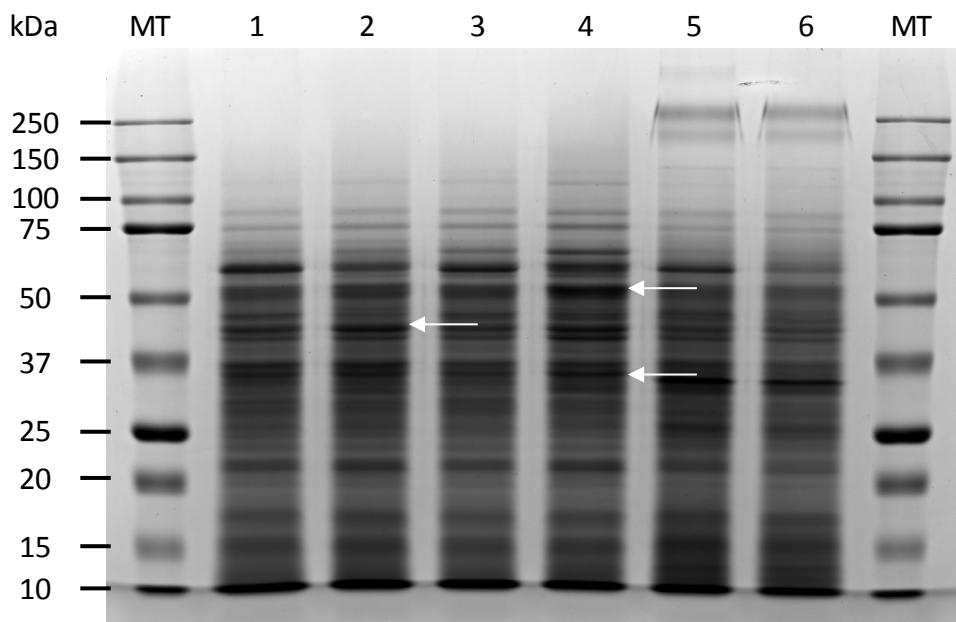


Figure 123 : Gel SDS-PAGE de la forme végétative de *Bacillus pumilus* avant (puits 1, 3 et 5) et après (puits 2, 4 et 6) traitement par les décharges électriques.
 MT est le marqueur de taille Precision Plus Protein Standards Kaleidoscope

Analyse par spectrométrie de masse

Analyse des protéines extraites

L'extraction des trois échantillons témoins a permis d'identifier en moyenne 1243 protéines et 1217 protéines pour les trois échantillons essais.

Après l'analyse des protéines pour déterminer celles qui sont surexprimées ou celles qui sont sous-exprimées, le logiciel Quick-GO est employé et permet de classer les protéines en fonction soit de leur localisation soit des processus biologiques dans lesquels elles sont impliquées. La définition des termes GO pour la localisation est donnée en Annexe 13 : Définition des termes GO pour la localisation des protéines et pour les processus biologiques en Annexe 14 : Définition des termes GO pour les processus biologiques des protéines. Les protéines sont, pour certaines, impliquées dans la synthèse des acides aminés, l'Annexe 15 : Classification des acides aminés, d'après [171] rappelle donc la liste des acides aminés.

Analyse quantitative à partir des protéines

Cette stratégie a permis de quantifier la surexpression d'une protéine et la sous-expression de 28 protéines chez l'essai (Figure 124).

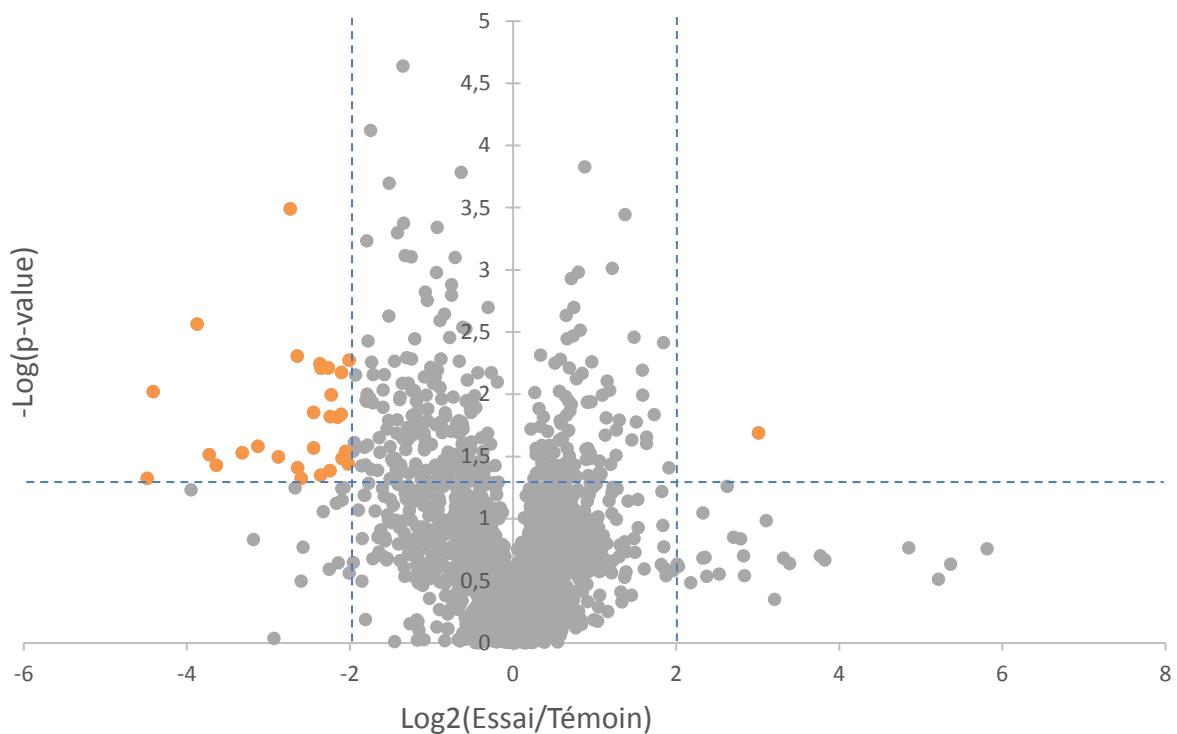


Figure 124 : Volcanoplot représentant le ratio entre les protéines révélées sur les échantillons essais et témoin (500 impulsions à 10 Hz) pour *Bacillus pumilus*.

La protéine surexprimée chez l'essai correspond à une protéine dont la localisation est inconnue, nommée B4107_1853, mais classée dans deux catégories de procédés biologiques : l'assimilation des nitrates et les processus d'oxydoréduction. La première catégorie englobe les procédés d'assimilation des nitrates présents dans l'environnement, leur réduction en ammoniaque, puis, l'incorporation des dérivés azotés issus des nitrates, dans la cellule. La seconde fait appel aux procédés métaboliques qui conduisent au retrait ou à l'ajout d'électron(s) d'une substance avec ou sans retrait ou ajout de proton(s) [155].

Pour les 28 protéines (Annexe 7 : Liste des protéines sous-exprimées chez *Bacillus pumilus*, d'après l'analyse quantitative à partir des protéines, après le traitement par décharges électriques) qui sont sous-exprimées chez l'essai une analyse de leur terme GO de localisation est faite. Il convient de rappeler que dans la classification GO, une protéine peut être associée à plusieurs termes GO, ou ne pas avoir de termes GO correspondants. Pour les 28 protéines sous-exprimées, seulement 8 ont une localisation connue. Dans la liste des protéines répertoriées, les protéines membranaires sont largement affectées par le traitement (Figure 125). Une modification de la membrane peut conduire à une moins bonne extraction des

protéines avec, par exemple, la création de phénomène de réticulation au niveau des composés membranaires (phospholipides, peptidoglycane, ...). Une autre hypothèse est que les protéines sont dégradées par le traitement. Dans tous les cas, une modification de la membrane peut conduire à l'inactivation de la bactérie avec potentiellement une fuite entre le contenu du cytoplasme et le milieu environnant.

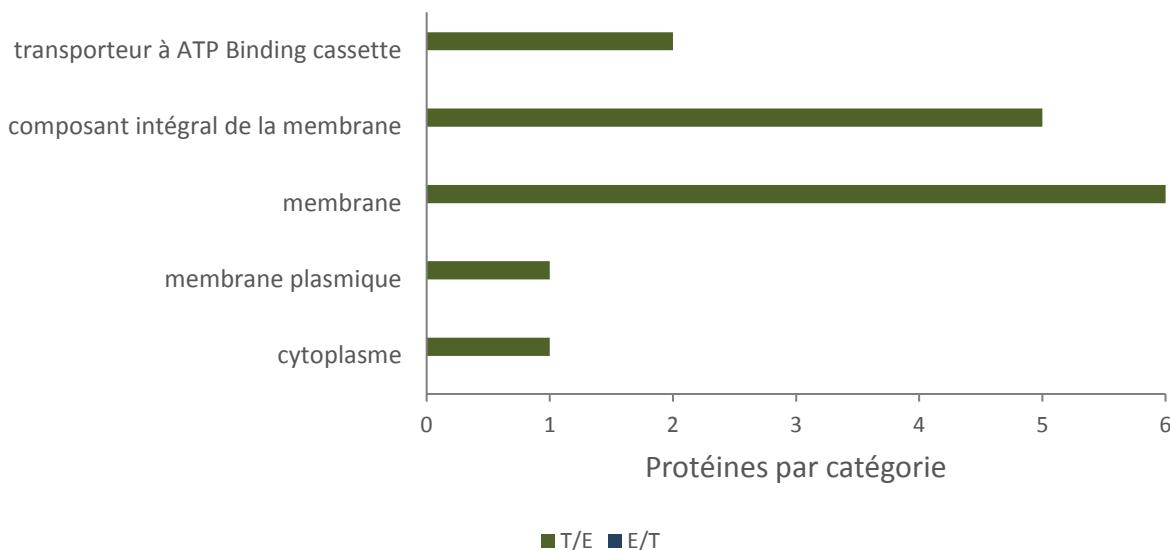


Figure 125 : Répartition de la localisation des protéines d'intérêt par la stratégie de quantification à partir des protéines sur *Bacillus pumilus*.

Les protéines sont ensuite analysées en fonction de leurs processus biologiques. Dans ce cas, 24 protéines sur les 28 sont classifiées. La répartition présentée en Figure 126 est donc relativement représentative des processus qui seront affectés par le traitement du fait de la dégradation, ou de la moins bonne extraction, d'au moins une de leur protéine. Les deux voies majoritaires sont la protéolyse et le transport transmembranaire. La protéolyse correspond à l'hydrolyse des protéines en plusieurs peptides ou acides aminés permettant notamment de renouveler les protéines du microorganisme [155]. La régulation de la protéolyse est très versatile et impliquée dans différents processus comme la réponse à des stress, la division cellulaire, la sécrétion de protéine ou la croissance [168]. La dégradation d'une enzyme responsable de la protéolyse peut donc avoir des conséquences sur le développement du microorganisme. D'autre part, la dégradation des protéines de transport transmembranaire est également un élément important qui peut expliquer l'inactivation bactérienne suite au traitement. Ces observations peuvent appuyer l'étude menée sur l'ADN quant à l'effet bactéricide des décharges électriques sur *Bacillus pumilus*.

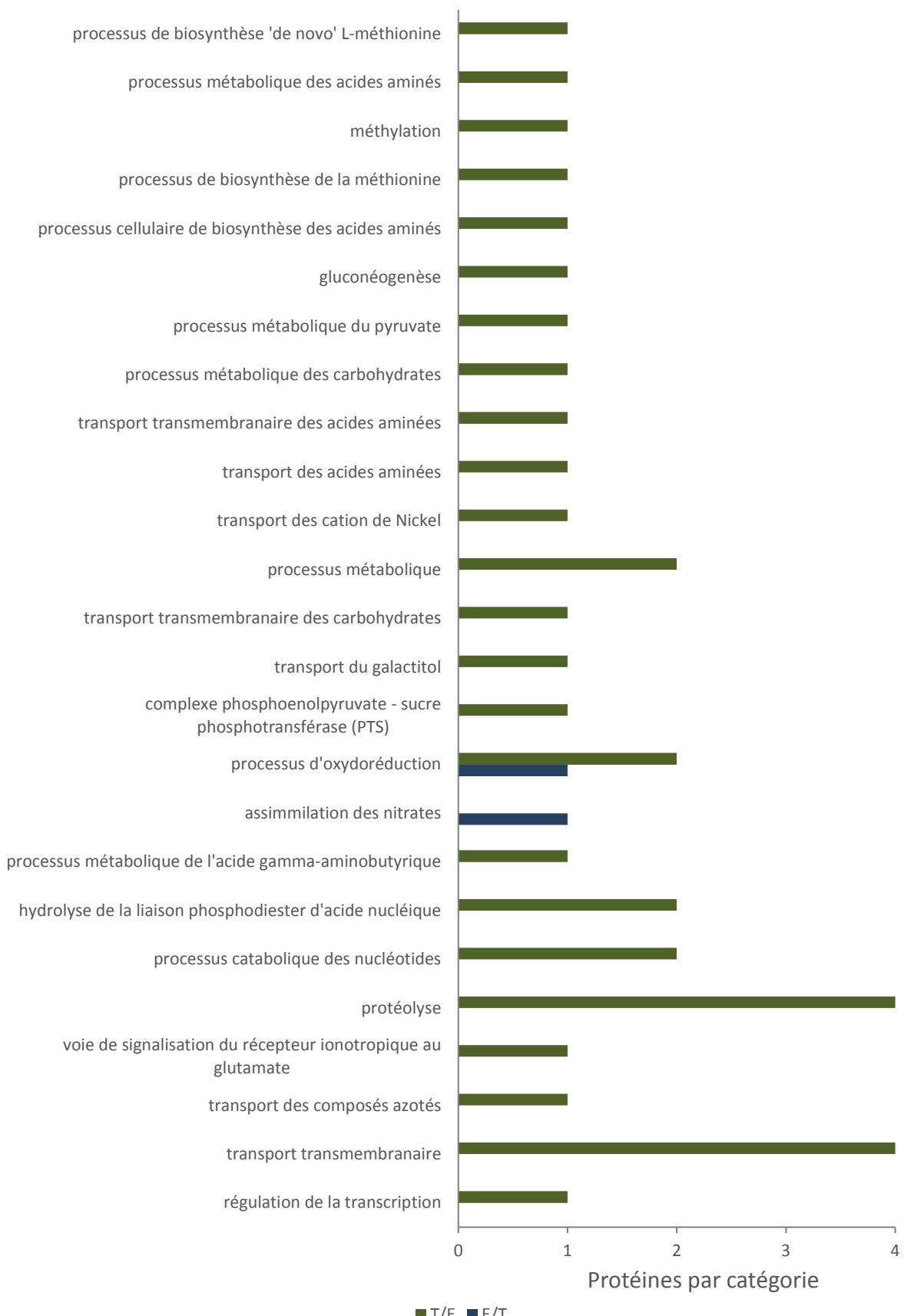


Figure 126 : Processus biologiques des protéines d'intérêt avec T, le témoin, et E, l'essai (500 impulsions à 10 Hz), sur *Bacillus pumilus*.

Analyse quantitative à partir des peptides spécifiques

Les critères nommés 'T/E', 'E absent', 'E/T' et 'T absent' se basent sur les mêmes hypothèses que celles décrites dans le paragraphe 3.6.3 « Etude des effets au niveau des protéines/*Bacillus pumilus* sous forme végétative/Analyse quantitative à partir des peptides spécifiques ». Il en est de même pour les différentes étapes de l'analyse (Figure 84, page 140).

Cette stratégie a permis de révéler de nouvelles protéines par rapport à l'analyse à partir des protéines. Cinquante et une protéines (33 pour le critère 'T/E' et 18 pour le critère 'E absent') sont sous-exprimées après le traitement et 10 protéines (6 pour le critère 'E/T' et 4 pour le critère 'T absent') sont surexprimées. Le Tableau 33 résume les résultats obtenus avec cette approche. La liste des protéines concernées se trouve en Annexe 8 : Liste des protéines sous-exprimées chez *Bacillus pumilus*, d'après l'analyse quantitative à partir des peptides, après le traitement par décharges électriques et Annexe 9 : Liste des protéines surexprimées chez *Bacillus pumilus*, d'après l'analyse quantitative à partir des peptides, après le traitement par décharges électriques.

Tableau 33 : Nombre de protéines quantifiées après l'application de 500 impulsions et 10 Hz pour *Bacillus pumilus*

Critère	Nombre de protéines quantifiées
T/E	33
E absent	18
E/T	6
T absent	4

A partir de la liste de protéines obtenues, les numéros d'accessions sont rentrés dans le logiciel QuickGO pour obtenir les termes GO correspondants.

Dans un premier temps, les données de localisation des protéines sont recherchées. Pour le critère 'T/E', seulement 10 protéines sur les 33 sont répertoriées dans la base de données et 3 parmi les 18 révélées pour le critère 'E absent'. Pour le critère 'T/E', l'analyse détecte 5 protéines qui ont au moins deux données de localisation. La Figure 127 montre la répartition de l'ensemble des termes GO de localisation obtenu en fonction du critère. La majorité des protéines révélées n'ont pas de localisation connue. Il n'est donc pas possible de conclure que le traitement affecte majoritairement les protéines membranaires, comme le suggère la Figure 127. Cependant, il est possible de dire que le traitement induit une sous-expression de protéines membranaires et cytoplasmiques.

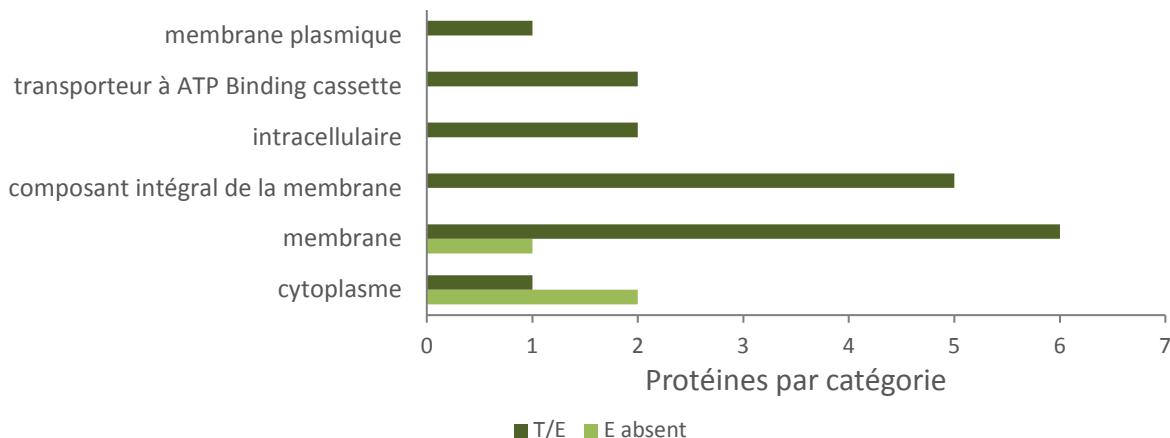


Figure 127 : Localisation des protéines sous-exprimées par le traitement après 500 impulsions à 10 Hz sur *Bacillus pumilus*.

Ensuite, une analyse des processus biologiques dans lesquels les protéines sont impliquées est effectuée. Pour le critère 'T/E', 25 protéines sont répertoriées dans la base de données sur les 33 révélées et 12 protéines sur les 18 pour le critère 'E absent'. Comme pour les données de localisation, 11 protéines répondant au critère 'T/E' ont plusieurs processus biologiques associés dans la base de données du logiciel QuickGO. Pour les protéines du critère 'E absent', 5 protéines ont plusieurs termes GO associés.

Les processus les plus représentés sont, pour le critère 'T/E', le transport transmembranaire, les processus métaboliques, la protéolyse et la phosphorylation. La phosphorylation regroupe les processus permettant l'introduction d'un groupement phosphate dans une molécule, avec classiquement la formation d'un ester phosphorique, un amide phosphorique ou un pentoxyde de phosphore [155]. La phosphorylation la plus étudiée est celle des protéines. Elle peut conduire, par exemple, à une régulation de l'activité enzymatique. La phosphorylation est réversible ce qui permet un contrôle rapide et économique, énergétiquement parlant, de la fonction des protéines [169]. La protéolyse a été décrite dans la partie ci-dessus traitant de l'analyse quantitative à partir des protéines.

Pour le critère 'E absent', plusieurs processus biologiques sont affectés par le traitement, comme la protéolyse, le processus de biosynthèse des acides aminés et le métabolisme impliquant les carbohydrates. Le processus de biosynthèse des acides aminés correspond aux réactions chimiques et voies conduisant à la formation d'acides aminés ou d'acides organiques contenant un ou plusieurs substituant aminés (type diaminopimelate qui permet la biosynthèse de la lysine). Le métabolisme impliquant les carbohydrates correspond aux réactions chimiques et aux voies impliquant un carbohydrate. Les carbohydrates sont une famille de molécules dont la formule brute est $C_x(H_2O)_y$. Chez les bactéries, le métabolisme des carbohydrates est extrêmement varié. D'une manière générale, ces composés chimiques sont une source majeure d'énergie et sont impliqués dans différents processus, comme la biosynthèse de la paroi cellulaire [170]. La dégradation de ce type de protéines peut donc expliquer l'effet bactéricide des décharges électriques sur cette souche.

La Figure 128 résume les résultats de l'analyse des processus biologiques affectés par le traitement.

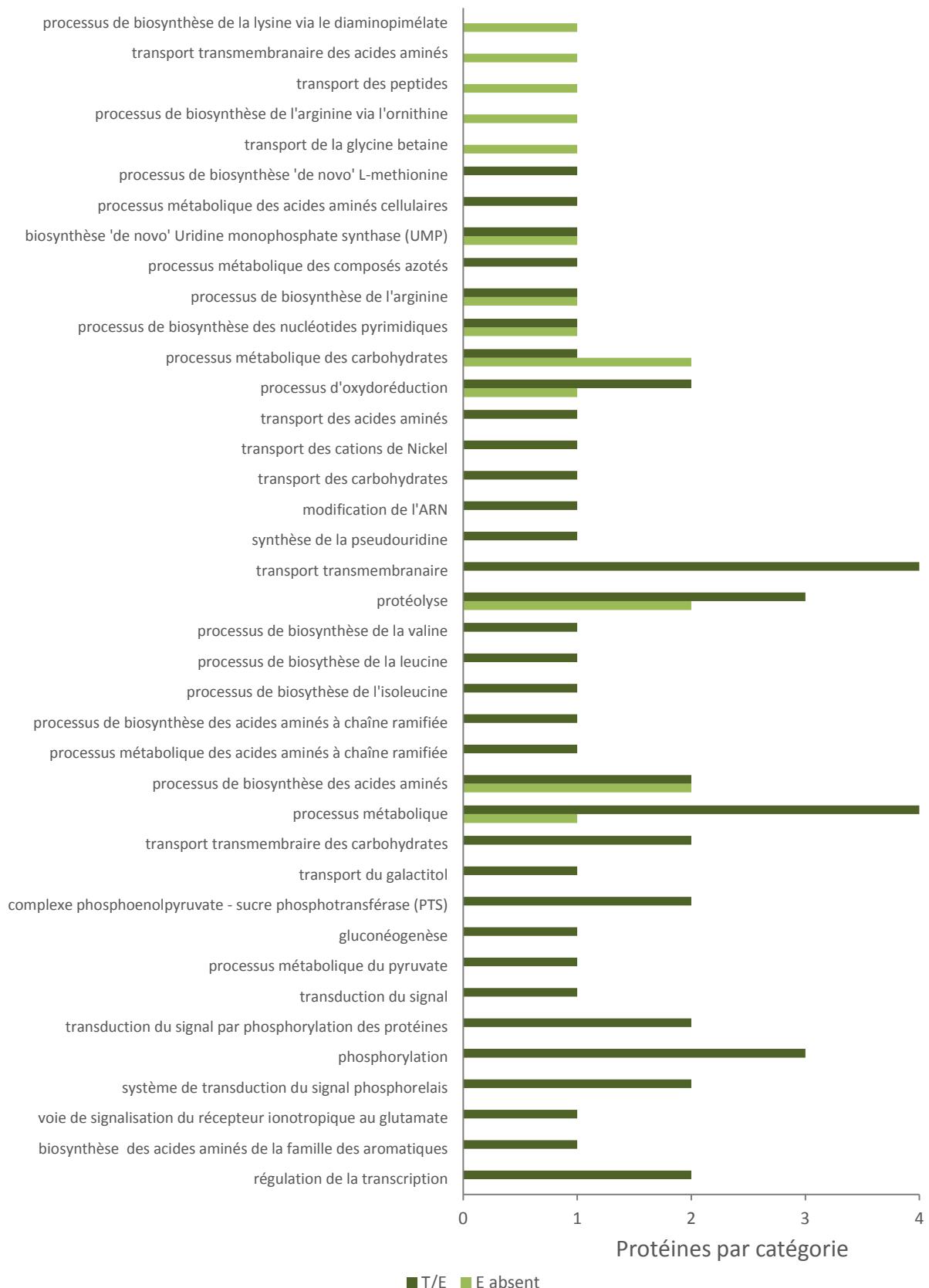


Figure 128 : Processus biologiques des protéines sous-exprimées par le traitement après 500 impulsions à 10 Hz sur *Bacillus pumilus*.

Une analyse des protéines révélées comme étant surexprimées est également faite.

Pour le critère 'E/T', seulement une protéine sur les 6 est répertoriée dans la base de données de localisation des protéines et une également pour le critère 'T absent' sur les 4 identifiées. La protéine quantifiée pour le critère 'E/T' est une protéine du cytoplasme et celle pour la catégorie 'E absent' est une protéine membranaire qui est répertoriée à la fois dans la catégorie 'membrane' et 'composant intégrale de la membrane' (Figure 129).

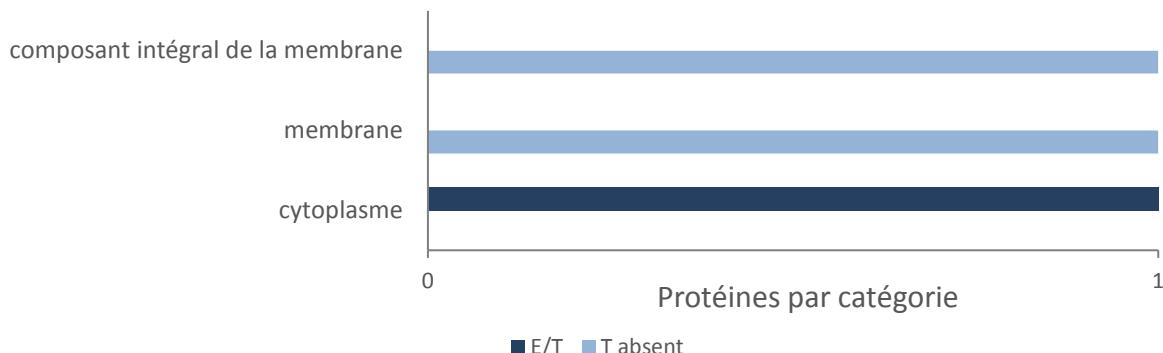


Figure 129 : Localisation des protéines surexprimées par le traitement après 500 impulsions à 10 Hz sur *Bacillus pumilus*.

Les processus biologiques dans lesquels les protéines sont impliquées sont analysés avec le logiciel QuickGO.

Pour le critère 'E/T', 4 protéines sur les 6 sont répertoriées dans la base de données des processus biologiques et 2 protéines sur les 4 révélées pour le critère 'T absent'. Dans ce cas, les 4 protéines du critère 'E/T' ainsi que les 2 protéines absentes dans le témoin ('T absent') ont plusieurs processus biologiques associés.

La Figure 130 résume les processus biologiques identifiés pour les protéines surexprimées après le traitement qui ont lieu soit dans le cytoplasme soit au niveau de la membrane.

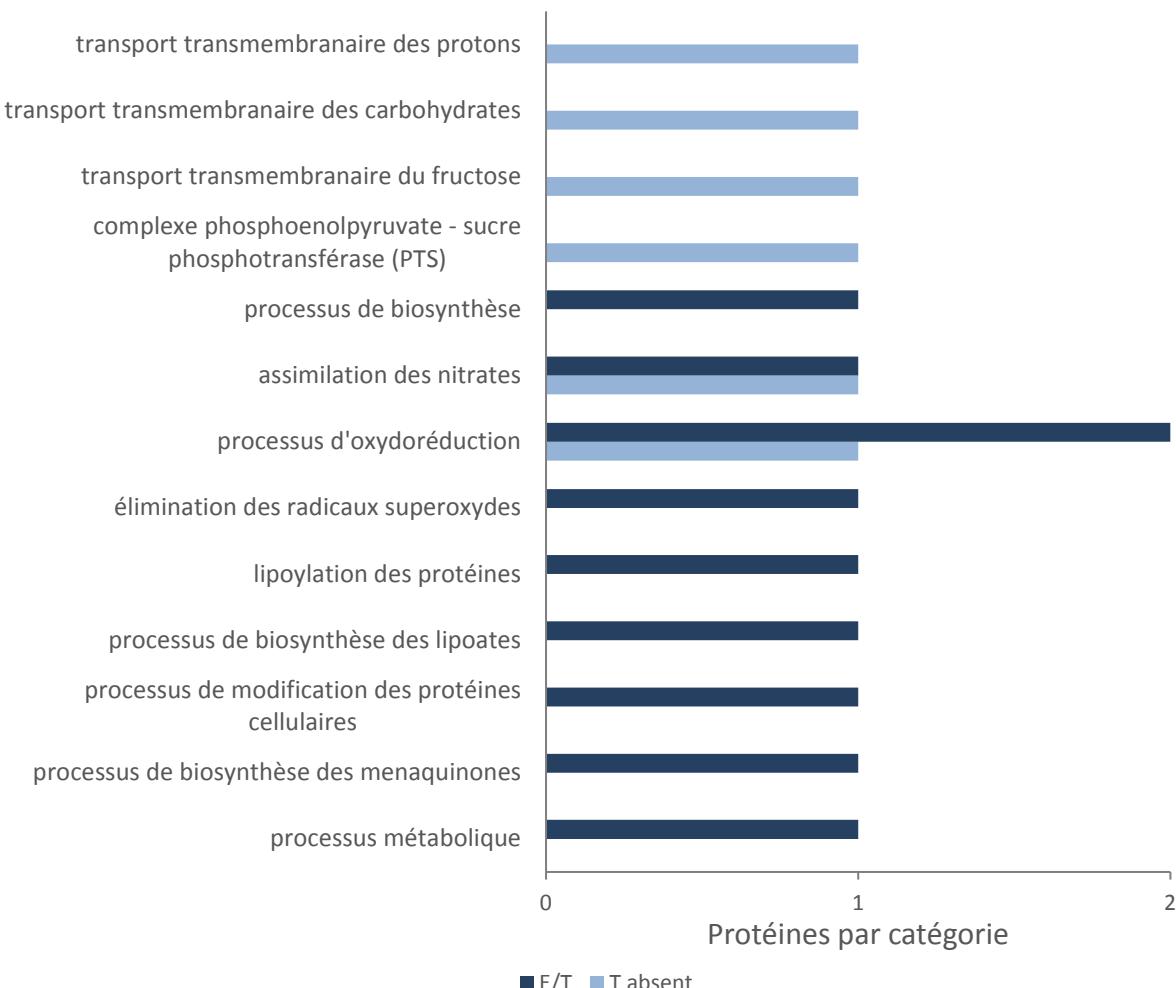


Figure 130 : Processus biologiques des protéines surexprimées par le traitement après 500 impulsions à 10 Hz sur *Bacillus pumilus*.

Pour résumer, l'analyse avec le gel SDS-PAGE suggère qu'une dégradation des protéines est apparue après le traitement. L'analyse protéomique a permis de révéler les protéines affectées par le traitement par l'utilisation de deux techniques d'analyse : une analyse à partir de la liste de protéines obtenue et une à partir de la liste de peptides spécifiques obtenue.

Certaines protéines ont été révélées à la fois avec la stratégie de quantification à partir des protéines et avec la stratégie de quantification à partir des peptides. Cependant, il est intéressant de remarquer qu'en plus de ces protéines communes, 9 protéines sont quantifiées uniquement par la première stratégie et 37 pour la seconde. Le caractère complémentaire des deux approches est donc confirmé.

Les deux types d'analyse ont permis de montrer que les protéines sous- et surexprimées sont à la fois des protéines cytoplasmiques et membranaires impliquées dans des processus biologiques très différents. La sous-expression de protéines dans des processus biologiques peut apporter une explication à l'effet bactéricide de la technologie. Par exemple, la protéolyse, qui est l'un des processus identifiés, permet de dégrader les protéines en fragments plus petits : polypeptides ou acides aminés. Elle peut avoir pour rôle de rendre active une

enzyme en coupant un petit nombre de peptides ce qui va changer la conformation tridimensionnelle et rendre accessible la région du site actif de l'enzyme [171].

Bacillus pumilus sous forme sporulée

Gel SDS-PAGE

Comme précédemment, un dosage des protéines est effectué. Les résultats du dosage sont présentés dans le Tableau 34.

Les essais ont été réalisés en triplicat à partir de trois cultures différentes.

Tableau 34 : Dosage des protéines contenues dans les échantillons à partir d'une solution de spores de *Bacillus pumilus* après le traitement par décharges électriques avec 500 impulsions et 10 Hz.

Spores	Concentration en protéines des échantillons (mg/mL)				
	1	2	3	Moyenne sans dilution	Ecart-type
Témoin culture 1, dilution 1/2	0,422	0,457	0,437	0,878	0,035
Essai culture 1, dilution 1/2	0,392	0,397	0,407	0,798	0,015
Témoin culture 2, dilution 1/2	0,442	0,442	0,437	0,882	0,006
Essai culture 2, dilution 1/2	0,432	0,427	0,432	0,861	0,006
Témoin culture 3, dilution 1/2	0,503	0,468	0,447	0,945	0,056
Essai culture 3, dilution 1/2	0,397	0,417	0,397	0,808	0,023

Le gel obtenu sur les trois cultures de *Bacillus pumilus* est présenté en Figure 131. Dans les puits numérotés 1, 3 et 5, il s'agit des témoins. Les différentes bandes obtenues sont comparées, respectivement, avec celles des puits 2, 4 et 6 qui correspondent à des bactéries traitées par 500 impulsions à 10 Hz.

Aucune différence clairement visible n'apparaît entre les échantillons témoins et essais. L'analyse protéomique qui identifiera et quantifiera individuellement les protéines permettra de révéler si des modifications apparaissent post-traitement.

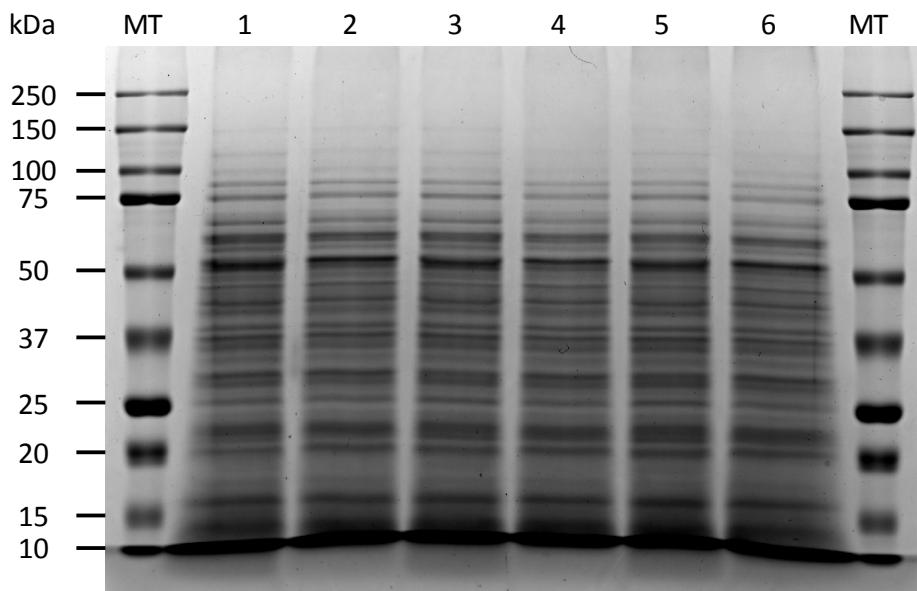


Figure 131 : Gel SDS-PAGE des spores de *Bacillus pumilus* avant (puits 1, 3 et 5) et après (puits 2, 4 et 6) traitement par les décharges électriques.

MT est le marqueur de taille Precision Plus Protein Standards Kaleidoscope

Analyse par spectrométrie de masse

Analyse des protéines extraites

L'extraction des trois échantillons biologiques a permis d'identifier en moyenne 1293 protéines pour le témoin et 1172 protéines pour l'essai.

Analyse quantitative à partir des protéines

L'analyse quantitative à partir des protéines révèle une protéine sous-exprimée et 18 protéines surexprimées chez l'essai (Figure 132).

La protéine sous-exprimée dans les échantillons essais correspond à une protéine membranaire, nommée XJ18_00850, et impliquée dans le processus de chaîne de transport d'électrons. Cette catégorie englobe les processus au sein desquels une série de transporteurs d'électrons opère ensemble pour transférer des électrons depuis des donneurs vers des accepteurs d'électrons. Le but est de générer un gradient électrochimique transmembranaire et ainsi d'assurer le pompage des cations et des anions à travers la membrane biologique (Figure 133 et Figure 134) [155].

Pour les protéines qui sont surexprimées chez l'essai (Annexe 10 : Liste des protéines surexprimées chez les spores de *Bacillus pumilus*, d'après l'analyse quantitative à partir des protéines, après le traitement par décharges électriques), seulement 6 ont une localisation connue (Figure 133). Une même protéine peut avoir plusieurs localisations. Le cytoplasme et

la membrane sont affectés par le traitement. Les protéines sont ensuite analysées en fonction de leurs processus biologiques. Dans ce cas, 12 protéines sont classifiées pour cette catégorie. La répartition présentée en Figure 134 montre des processus majoritairement affectés par le traitement : la phosphorylation, les processus métaboliques et les processus d'oxydoréduction. Ces observations apportent un complément à l'étude menée sur l'ADN quant à l'effet bactéricide des décharges électriques sur les spores de *Bacillus pumilus*.

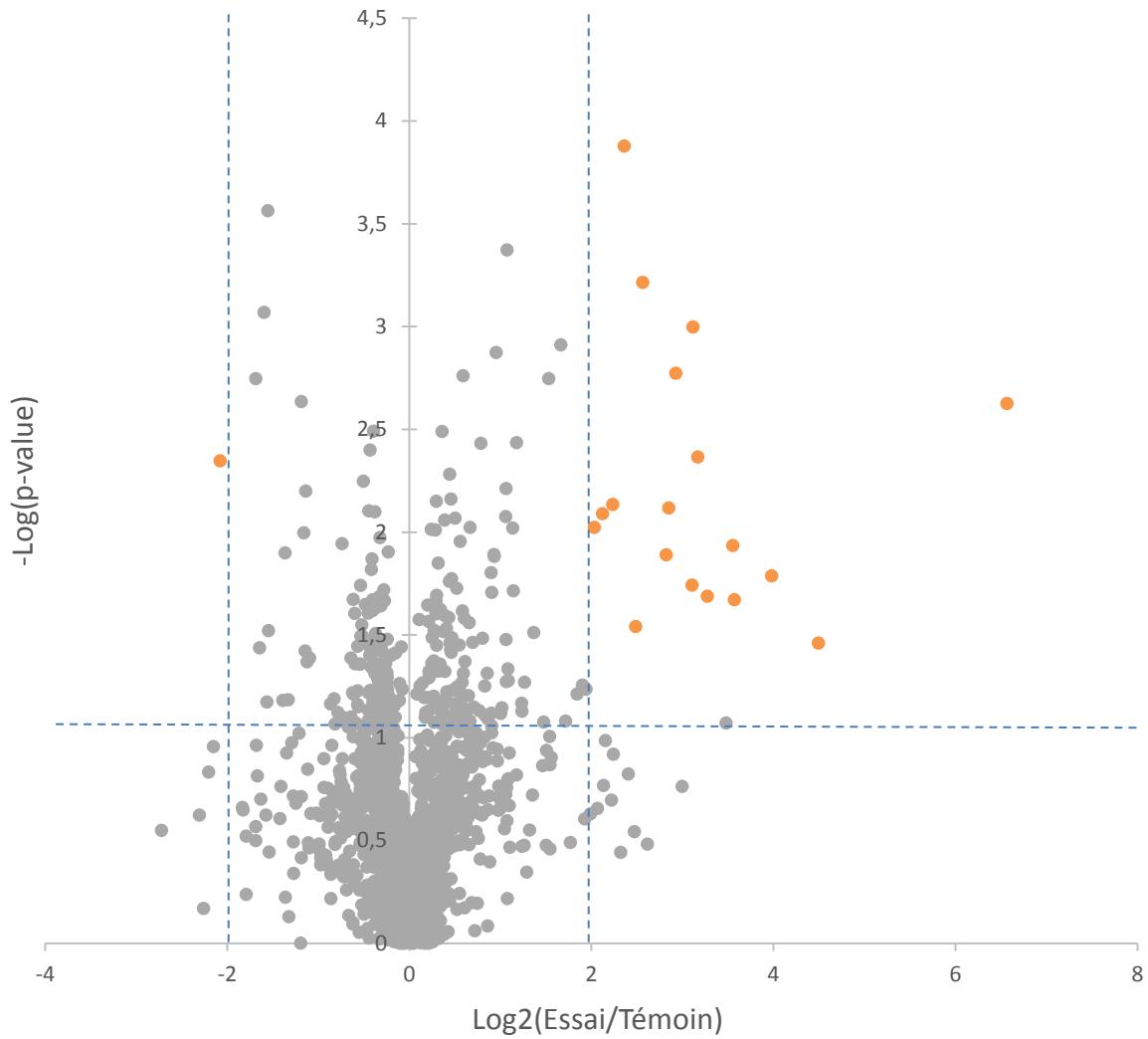


Figure 132 : Volcanoplot représentant le ratio entre les protéines quantifiées sur les échantillons essais et témoin (ayant subi 500 impulsions à 10 Hz) pour les spores de *Bacillus pumilus*.

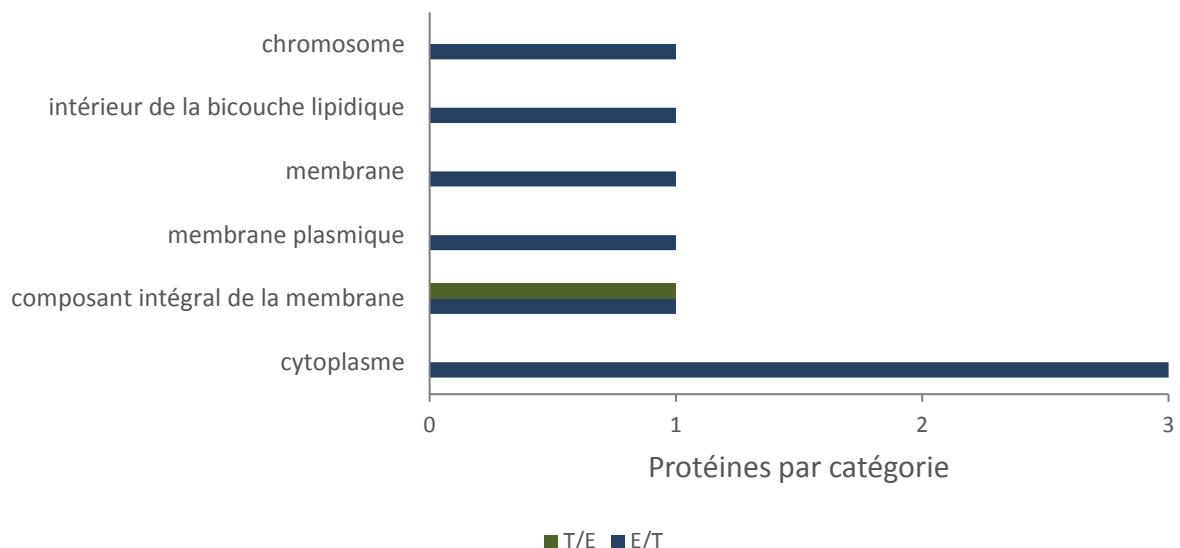


Figure 133 : Répartition de la localisation des protéines révélées par la stratégie de quantification à partir des protéines sur les spores de *Bacillus pumilus*.

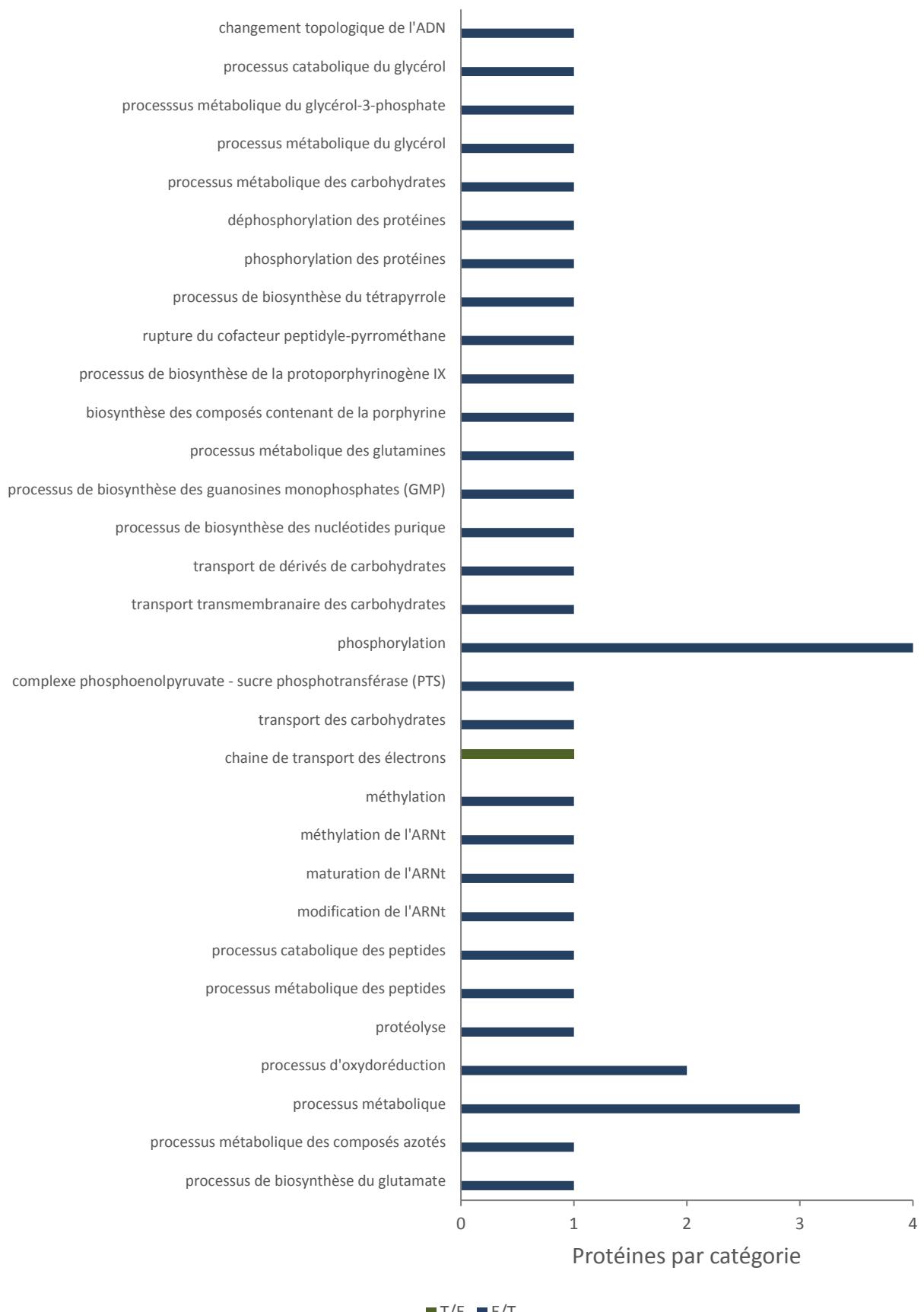


Figure 134 : Processus biologiques des protéines révélées sur les spores de *Bacillus pumilus*.

Analyse quantitative à partir des peptides spécifiques

Cette stratégie a permis de révéler de nouvelles protéines affectées par le traitement (Tableau 35). Le nom des gènes correspondant est présenté en Annexe 11 : Liste des protéines sous-exprimées chez les spores de *Bacillus pumilus*, d'après l'analyse quantitative à partir des peptides, après le traitement par décharges électriques et en Annexe 12 : Liste des protéines surexprimées chez les spores *Bacillus pumilus*, d'après l'analyse quantitative à partir des peptides, après le traitement par décharges électriques.

Tableau 35 : Nombre de protéines quantifiées après l'application de 500 impulsions et 100 Hz pour *Bacillus pumilus* sporulé

Critère	Nombre de protéines quantifiées
T/E	17
E absent	5
E/T	90
T absent	57

La localisation des protéines sous-exprimées chez l'essai a été étudiée.

Pour le critère 'T/E', 3 protéines sont répertoriées dans la base de données sur les 17 révélées par l'étude et deux protéines sur les 5 pour le critère 'E absent'. Parmi les protéines répertoriées dans la base de données et répondant au critère 'T/E', l'une d'elles a deux termes GO associés : 'membrane' et 'composant intégral de la membrane'. Les autres n'ont qu'un terme GO. Les résultats de l'analyse, résumés en Figure 135, montrent que les protéines sous-exprimées et référencées ne sont que des protéines membranaires. Cependant, toutes les protéines n'étant pas référencées il n'est pas possible de conclure à l'absence de dommages au niveau des protéines cytoplasmiques.

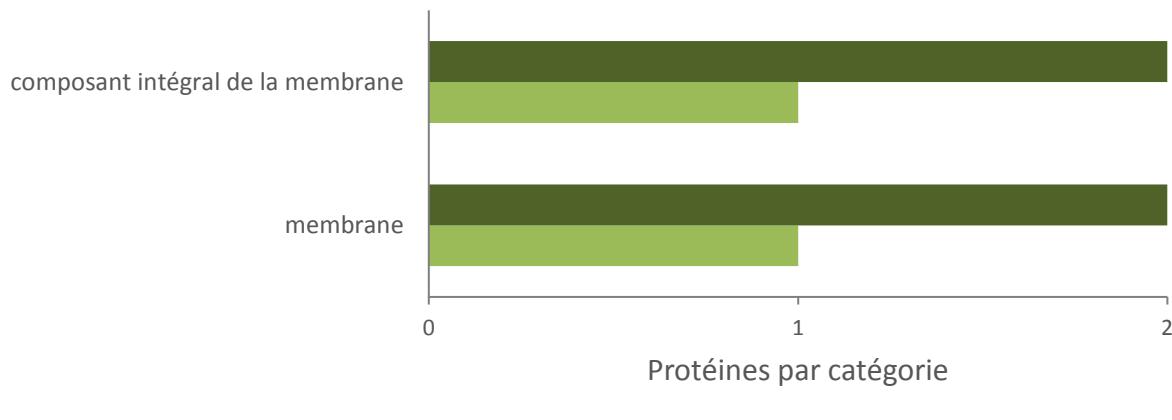


Figure 135 : Localisation des protéines sous-exprimées par le traitement après 500 impulsions à 10 Hz sur *Bacillus pumilus* sporulé.

L'analyse des processus biologiques associés aux protéines révélées a ensuite été faite. Pour le critère 'T/E', 9 protéines sont répertoriées dans la base de données sur les 17 et 4 protéines sur les 5 pour le critère 'E absent'. Dans le cas du critère 'T/E', 3 protéines ont plusieurs processus biologiques associés. Pour 'E absent', 2 protéines ont plusieurs termes GO associés : 4 termes pour l'une et 5 termes pour l'autre.

Un processus biologique semble être plus affecté que les autres dans le cas 'T/E'. Il s'agit de la chaîne de transport des électrons. La description de ce processus se trouve en Annexe 14 : Définition des termes GO pour les processus biologiques des protéines.

La Figure 136 présente les processus biologiques des protéines d'intérêt.

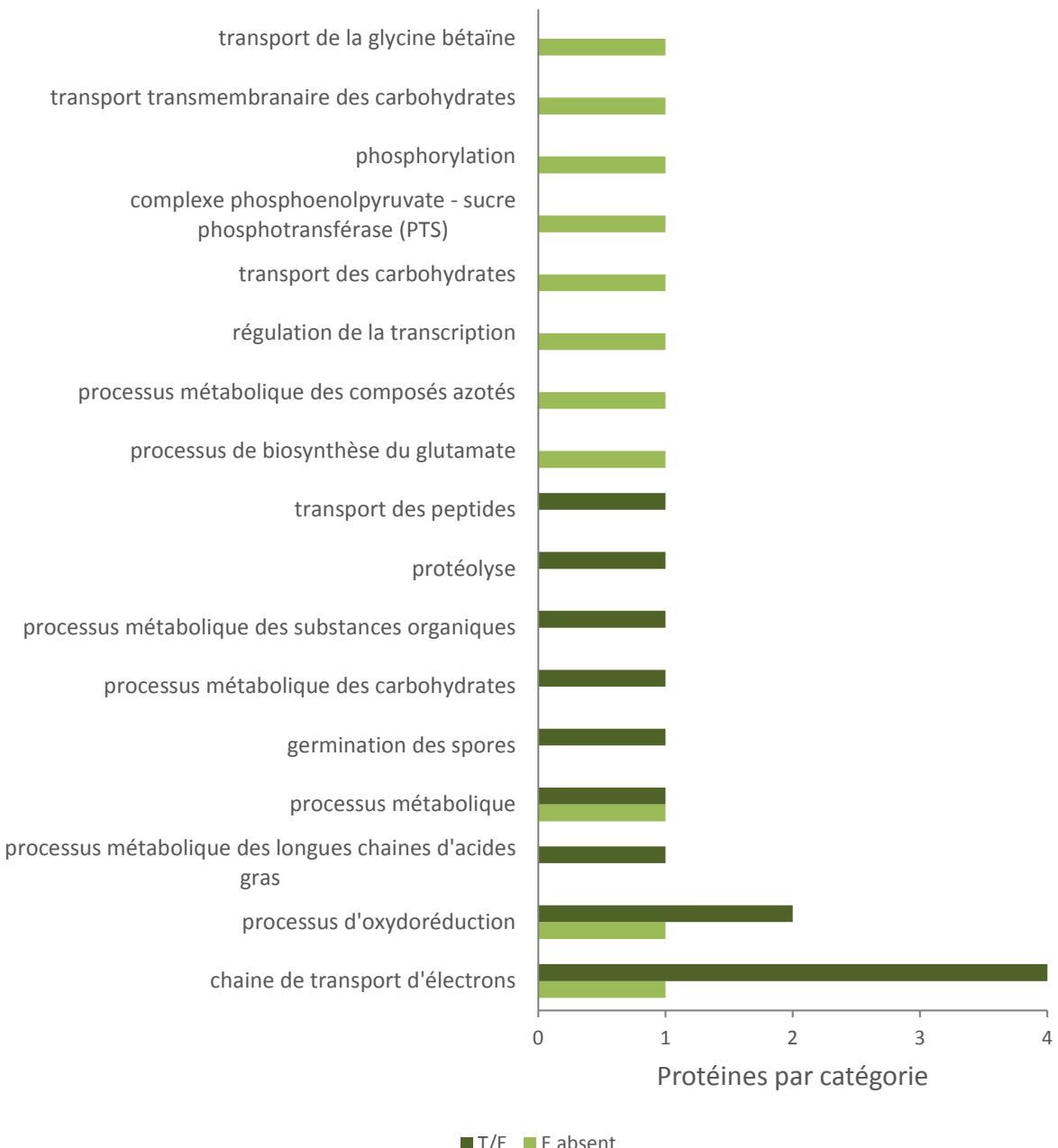


Figure 136 : Processus biologiques des protéines sous-exprimées par le traitement après 500 impulsions à 10 Hz sur *Bacillus pumilus sporulé*.

Des protéines surexprimées ont également été révélées par l'analyse quantitative à partir des peptides.

Pour le critère 'E/T', 17 protéines ont une donnée de localisation connue sur les 90. Parmi ces 17 protéines, 3 sont présentes dans au moins deux catégories de localisation. Pour le critère 'T absent', 13 protéines ont un terme GO associés à une localisation sur les 57 avec 3 protéines qui ont plusieurs données de localisation.

La Figure 137 présente les résultats de localisation obtenus. Il apparaît que les protéines cytoplasmiques sont majoritairement affectées par le traitement. Cependant, l'ensemble des protéines révélées ne sont pas répertoriées ce qui ne permet pas de conclure quant à une localisation préférentiellement affectée par le traitement.

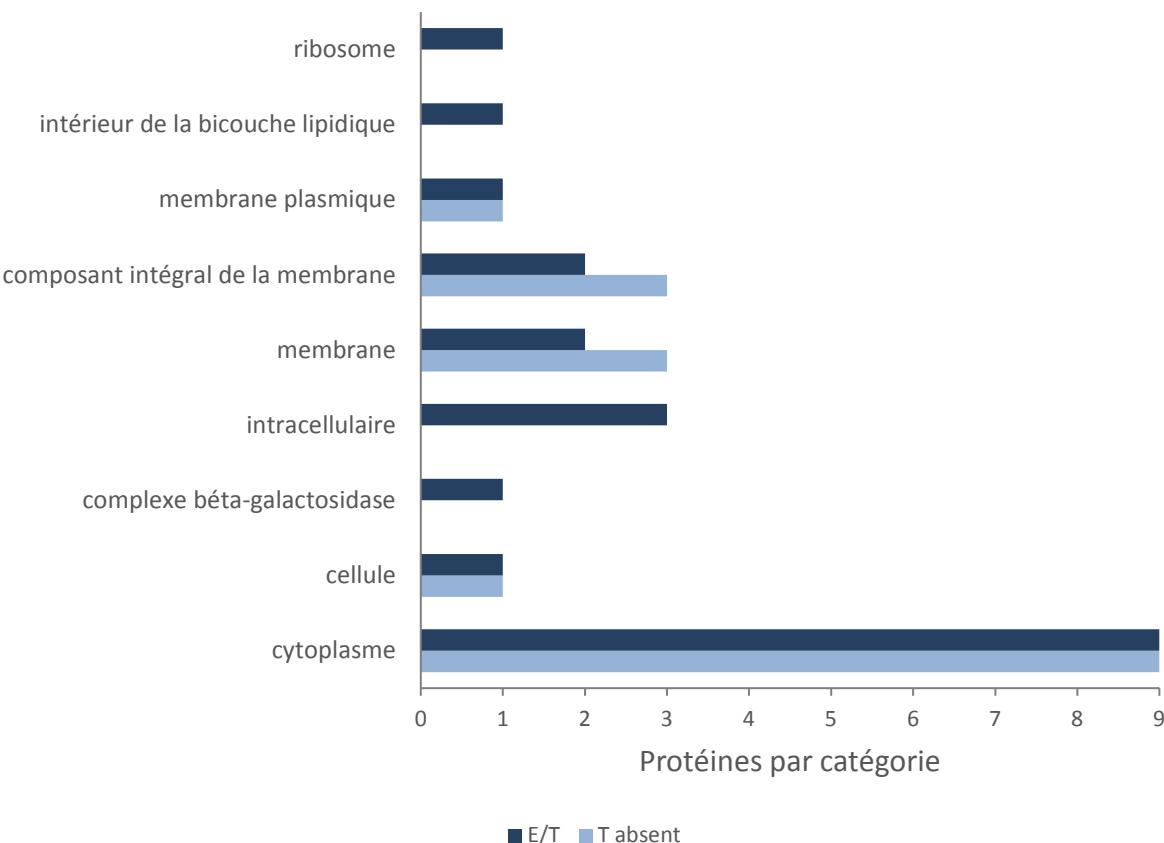


Figure 137 : Localisation des protéines mieux extraites suite au traitement après 500 impulsions à 10 Hz sur *Bacillus pumilus* sporulé.

Pour les critères 'E/T' et 'T absent', 42 protéines et 35 protéines ont un (ou plusieurs) processus biologique(s) associé(s), respectivement. Sur les 42 protéines du critère 'E/T', 30 ont au moins deux termes GO associés. Pour le cas 'T absent', 25 protéines ont plusieurs données de localisation. Par conséquent, sur l'ensemble des processus biologiques (83 pour le critère 'E/T' et 58 pour le critère 'T absent'), il est décidé de ne montrer que les processus contenant au moins 3 protéines afin de donner de la lisibilité au graphique. La répartition étant différente pour le critère 'E/T' et 'T absent', deux graphiques sont donc présentés (Figure 138 et Figure 139).

Pour le critère 'E/T', les principaux processus biologiques parmi les protéines révélées sont l'oxydoréduction, les processus métaboliques, la phosphorylation, le métabolisme impliquant les carbohydrates et la biosynthèse des acides aminés. La définition de ces termes est donnée en Annexe 14 : Définition des termes GO pour les processus biologiques des protéines.

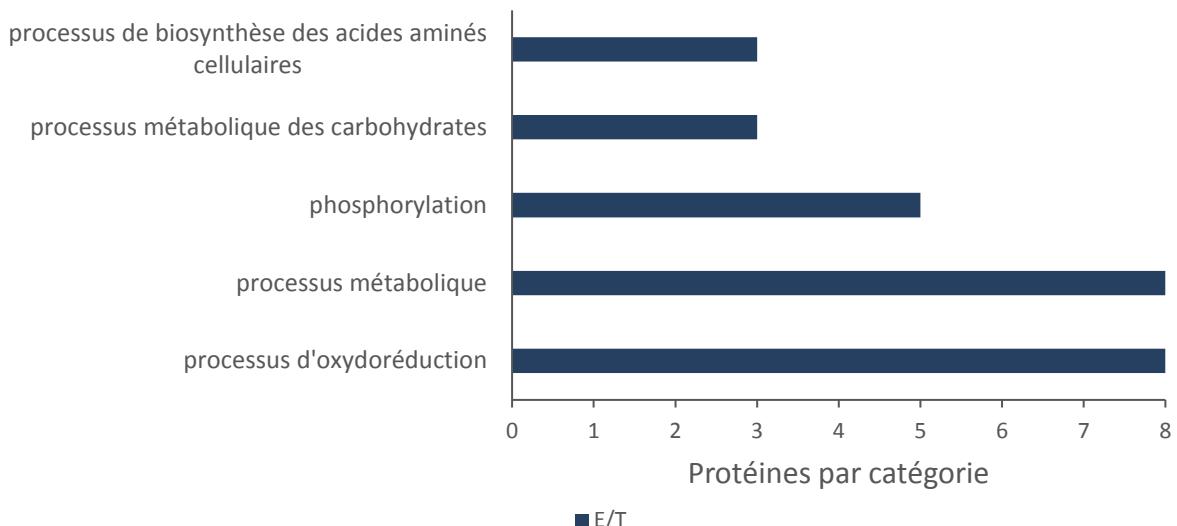


Figure 138 : Processus biologiques des protéines surexprimée chez l'essai après 500 impulsions à 10 Hz pour le critère 'E/T' sur *Bacillus pumilus* sporulé.

Pour le critère 'T absent', les principaux processus biologiques révélées par l'analyse sont l'oxydoréduction, les processus métaboliques, la transcription de l'ADN en ARN, la traduction de l'ARN en protéines, la régulation de la transcription de l'ADN et l'aminoacylation des ARNt pour la synthèse des protéines.

Les deux premiers processus ont déjà été définis précédemment.

Ensuite, la transcription de l'ADN en ARN permet, à l'aide de protéines, de synthétiser de l'ARN à partir de l'ADN.

Pour ce qui est de la traduction de l'ARN en protéines, elle permet, à partir d'ARN messager ou de l'ARN circulaire, de traduire les acides nucléiques en acides aminés afin de créer les protéines. Cette action est guidée par les ribosomes.

La régulation de la transcription de l'ADN en ARN désigne n'importe quel processus qui module la fréquence, le taux ou l'ampleur de la transcription de l'ADN.

Enfin, l'aminoacylation des ARNt pour la synthèse des protéines est une étape qui permet de fixer l'acide aminé sur son ARNt correspondant avant l'incorporation du complexe dans la grande sous-unité du ribosome pour la synthèse des protéines à partir de l'ARN messager.

L'ensemble de ces processus conduisant à la synthèse de protéines est résumé en Figure 140 et montre bien l'importance de ces voies pour la survie de la bactérie en permettant la synthèse de nouvelles protéines.

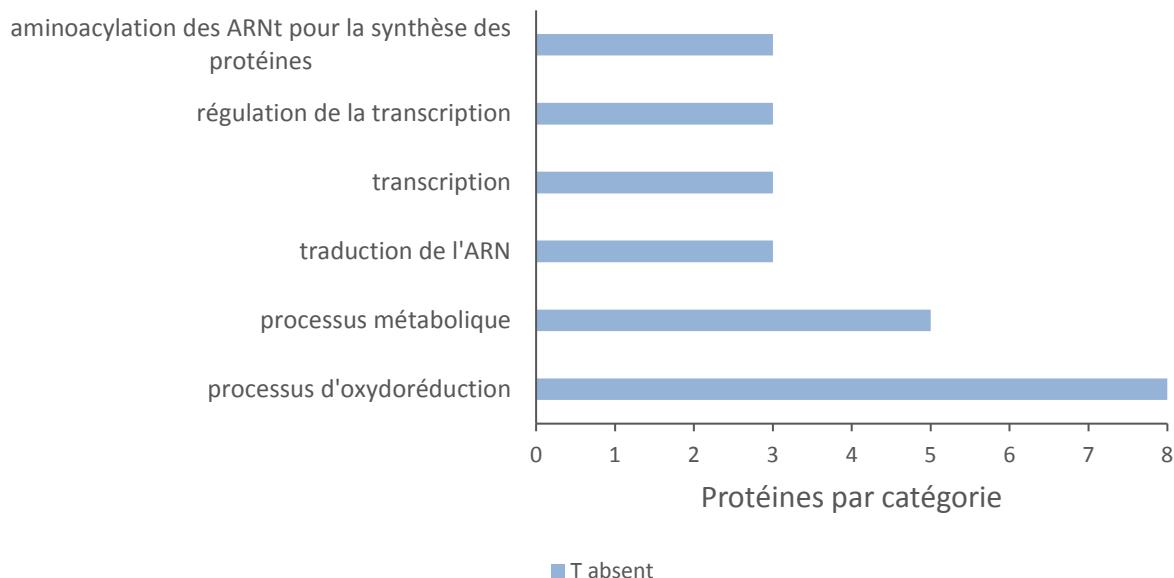


Figure 139 : Processus biologiques des protéines surexprimée chez l'essai après 500 impulsions à 10 Hz pour le critère 'T absent' sur *Bacillus pumilus* sporulé.

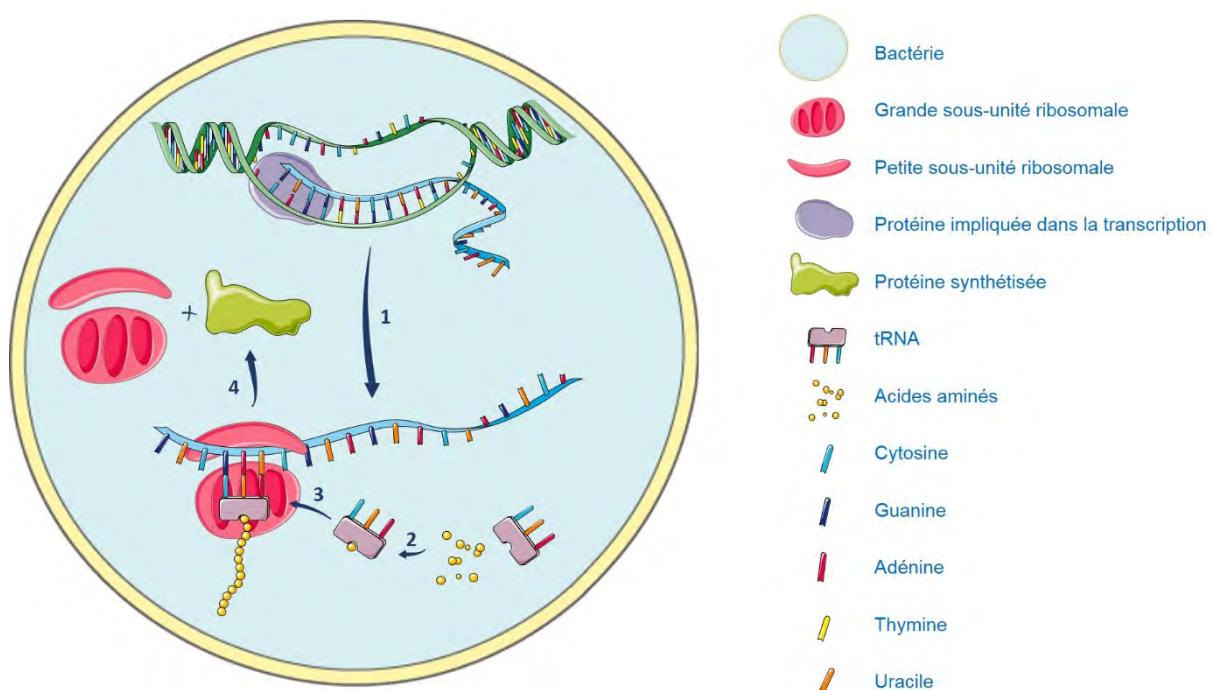


Figure 140 : Schéma de la synthèse d'une protéine à partir de l'ADN.
Sur le schéma, **1** correspond à la transcription de l'ADN en ARN, **2** à l'aminoacylation, **3** à la traduction et **4** à la libération des sous-unités ribosomales et de la protéine synthétisée (schéma réalisé à partir des images du site <https://smart.servier.com>).

Le traitement permet une meilleure extraction des protéines. Cette meilleure extraction peut s'expliquer par l'effet des ROS sur les membranes biologiques. En effet, l'un des effets de ces espèces est la peroxydation des lipides qui va conduire à la fluidisation de la membrane. Les

protéines présentes au sein de la membrane peuvent voir leurs liaisons avec les lipides rompues ce qui peut expliquer leur meilleure extraction [129]. La fluidisation de la membrane peut également faciliter l'extraction des protéines et ainsi, lors de l'analyse quantitative, conduire à une plus grande quantité de protéines extraites.

Les ROS vont également interagir avec les protéines membranaires ou cytoplasmiques et conduire à des mécanismes de type réticulation [128,130] ce qui, au contraire, peut conduire à une moins bonne extraction des protéines.

L'analyse avec le gel SDS-PAGE n'a pas permis de révéler une dégradation des protéines après le traitement. Une analyse protéomique a donc été menée avec deux approches : une analyse quantitative obtenue à partir des résultats de quantification des protéines et une à partir des résultats de quantification obtenus à partir des peptides spécifiques.

Certaines protéines ont été révélées à la fois avec la stratégie de quantification à partir des protéines et avec la stratégie de quantification à partir des peptides. Cependant, il est intéressant de remarquer qu'en plus de ces protéines communes, 4 protéines sont révélées uniquement avec la première stratégie et 140 pour la seconde ce qui conforte l'intérêt d'utiliser les deux techniques d'analyse.

Enfin, la comparaison des protéines sur- et sous-exprimées par le traitement, entre la forme végétative et la forme sporulée, révèle seulement trois protéines communes sur l'ensemble des protéines révélées. L'organisation des bactéries étant différente, les décharges électriques interagissent différemment avec les différentes couches et biomolécules composant la bactéries.

En conclusion de ce chapitre, les essais faits sur Bacillus pumilus ont permis de confirmer que les UV et les ROS sont des espèces produites lors de la décharge qui jouent un rôle important dans l'effet bactéricide de la technologie. Pour les bactéries sous forme végétative, l'observation par les outils de microscopie électronique (MEB et MET) met en évidence un phénomène d'affaissement de la paroi bactérienne après le traitement conduisant à une augmentation de la taille de la bactéries (longueur et largeur). Cette observation peut expliquer l'efficacité du système. Pour les spores de Bacillus pumilus, aucun changement morphologique ou d'architecture intracellulaire de la bactéries n'est observé à l'échelle nanométrique. L'analyse de l'ADN des spores a révélé la présence de cassures simple et double brin ainsi que la création de dimères de pyrimidine suite au traitement. Enfin, pour l'analyse des protéines, le gel SDS-PAGE a permis de mettre en évidence une différence entre les protéines extraites dans les échantillons témoins par rapport aux protéines des essais, dans le cas des bactéries végétatives. En revanche, pour les spores, les profils de répartition des protéines sont identiques entre les témoins et les essais. L'analyse protéomique a permis d'isoler et donc d'identifier les protéines affectées par le traitement. Pour les bactéries végétatives ou les spores, des protéines du cytoplasme et de la membrane sont affectées par le traitement. Pour ce qui est des processus biologiques dans lesquelles les protéines sont impliquées ils sont très différents et il n'est pas possible d'isoler une voie plus affectée que les autres. D'une part, parce que toutes les protéines n'ont pas leurs processus répertoriés dans la base QuickGO et, d'autre part, parce qu'une grande diversité de processus est identifiée (voies de la respiration, de la

création des protéines, de la création d'énergie, de transport transmembranaire, ...). Cependant, des voies indispensables à la survie des bactéries sont touchées et on peut donc supposer que l'effet bactéricide du traitement peut être expliqué par une dégradation des protéines ou de leur environnement typiquement pour les protéines membranaires (phospholipides, peptidoglycane, ...).

Conclusions et perspectives

Le monde de l'industrie est à la recherche d'innovations afin de devancer la concurrence mais également afin d'anticiper l'entrée en vigueur de nouvelles normes d'utilisation de produits chimiques. La société ITHPP a donc décidé de développer deux nouvelles technologies, une pour la décontamination d'emballages grâce à l'utilisation d'un faisceau d'électrons pulsés, et l'autre pour la décontamination de l'eau en appliquant des décharges électriques.

Avant toute chose, il a fallu démontrer l'efficacité de ces technologies sur des souches de références, en l'occurrence *Bacillus pumilus* sous forme sporulée. Afin de choisir les conditions optimales de traitement, l'influence des paramètres machine ou environnementaux a été évaluée. Enfin, la détermination des mécanismes responsables de l'inactivation bactérienne a été investiguée en utilisant des outils de microscopie de pointe (AFM, MEB et MET) ainsi qu'en analysant l'intégrité de l'ADN avec la PFGE et des protéines avec une analyse protéomique.

Le faisceau d'électrons pulsés

Les essais préliminaires, réalisés dans le but de choisir la bactérie de référence, ont montré que les bactéries en phase exponentielle de croissance sont plus résistantes au traitement qu'en phase stationnaire : $4 \log_{10}$ contre $4,7 \log_{10}$. Il a également été observé que la forme sporulée de *Bacillus pumilus* est plus résistante au faisceau d'électrons pulsés que la forme végétative. En effet, après l'application de 1 impulsion à 2 cm de la fenêtre d'irradiation, la diminution logarithmique obtenue pour la forme végétative est de $4,7 \log_{10}$ contre $0,7 \log_{10}$ pour la forme sporulée. L'organisation différente entre la spore et la forme végétative peut expliquer ce phénomène, notamment, par la plus faible quantité d'eau présente dans le cœur contenant l'ADN. Cette caractéristique protège ce dernier des ROS (espèces réactives de l'oxygène) issus de la radiolyse de l'eau créés lors du traitement. L'ADN est également protégé par la présence des SASPs (petites protéines acido-solubles), de la membrane interne et du manteau qui limite l'accès des espèces chimiques au génome. L'objectif fixé pour cette technologie est l'obtention d'une diminution logarithmique de $6 \log_{10}$ pour répondre aux demandes les plus courantes des industries de l'agroalimentaire, de la pharmaceutique ou de la cosmétique. Il est atteint après l'application de 8 impulsions à 2 cm de la fenêtre d'extraction avec $6,5 \log_{10}$ sur la forme sporulée de *Bacillus pumilus*.

La recherche de l'explication de l'effet bactéricide du faisceau d'électrons s'est déroulée en plusieurs étapes. Tout d'abord, pour les bactéries sous forme végétative ou les spores, l'observation de la paroi de la bactérie montre que le traitement ne conduit pas à une modification de leur morphologie ni ne révèle la présence de pores suite au traitement. L'apparition de pores a été mise en évidence par Pillet *et al.* suite à l'application de champs électriques pulsés [40]. Dans le cas des bactéries végétatives, l'utilisation d'une pointe fonctionnalisée avec du 1-dodécylmercaptane, pour l'observation en AFM, a révélé une perte d'hydrophobilité de la paroi. La modification de ce caractère peut s'expliquer par la dégradation des acides lipoteichoïques et techoïques présents à la surface des bactéries Gram positives. Il a été montré que les acides teichoïques jouent un rôle essentiel dans la survie de *Bacillus subtilis*. En effet, d'après Brown *et al.* (2013), la délétion d'un gène (*tardD*),

responsable de la synthèse d'un acide teichoïque prédominant chez cette bactérie, entraîne un changement de morphologie de la bactérie et un épaississement de la paroi [172]. Dans notre cas, aucune observation de ce type n'a été faite avec les outils de microscopie employés (AFM, MEB et MET). La dégradation n'est peut-être pas suffisante mais une dégradation de ces acides peut expliquer la perte d'hydrophobité [40]. Il serait donc intéressant d'extraire ces acides pour voir s'ils sont affectés par le traitement. De plus, la mesure de la quantité d'ADN ou de protéines présents suite au traitement dans le milieu n'a pas permis de révéler une perméabilisation de la paroi. Cependant, au vu de la taille des macromolécules étudiées, il est possible qu'elles n'aient pas pu passer la paroi. Une analyse d'autres molécules plus petites (ions, ATP, ...) pourrait être envisagée.

Ensuite, l'étude s'est portée sur l'intégrité de la molécule d'ADN. Pour la forme végétative de *Bacillus pumilus*, il apparaît clairement que l'augmentation du nombre d'impulsions, et donc de la dose déposée, contribue à une plus forte dégradation de l'ADN génomique. De plus, l'utilisation de différentes enzymes a permis de révéler, en plus des cassures double brin, la présence de cassures simple brin (avec la Nucléase S1) et de dimères de pyrimidine (avec l'Endonucléase V). Pour la forme sporulée, le traitement conduit à la production de cassures simple et double brin. Pour la création de dimères de pyrimidine, le gel ne permet pas de mettre clairement en évidence ce phénomène. En effet, les fragments du témoin semblent dégradés après l'ajout de l'Endonucléase V. L'expérience devrait être refaite à partir de spores étalés sur boîte de Pétri afin de ne pas passer par l'étape de séchage qui peut, peut-être, engendrer ce type de dommages. Il pourrait également être intéressant d'évaluer l'influence de la dose déposée au niveau des spores sur le taux de dégradation de l'ADN.

En dernier lieu, une analyse quantitative des protéines après l'application des impulsions est faite afin de révéler leur sur ou leur sous-expression. Pour la forme végétative, 9 protéines sont révélées comme sous-exprimées après le traitement. La localisation de ces protéines est à la fois cytoplasmique et membranaire. Le traitement induit donc des modifications au niveau des protéines quel que soit leur emplacement. Plusieurs processus biologiques sont affectés par l'application des impulsions dont les voies de production des acides aminés, constituants principaux des protéines. Cinq protéines sont révélées comme surexprimées. L'explication peut venir du fait que le traitement a conduit à des modifications, par exemple au niveau de la fluidité de la membrane, permettant une meilleure extraction des protéines. La localisation des protéines d'intérêt n'est pas répertoriée dans la banque de données, à l'exception d'une protéine du cytoplasme. Pour les spores de *Bacillus pumilus*, la même expérience est effectuée et permet de révéler la sous-expression de 6 protéines membranaires et cytoplasmiques impliquées dans différents processus clés pour la survie de la bactérie (cycle de Krebs, par exemple). La surexpression de 8 protéines est également mise en lumière par l'analyse. Ce sont des protéines du cytoplasme et de la membrane qui ont pu être mieux extraites suite au traitement. Par conséquent, une modification de l'organisation de certaines molécules a dû survenir suite au traitement permettant une meilleure extraction des protéines. Une analyse de l'intégrité des phospholipides, par exemple, pourrait être faite afin de révéler d'autres dommages induits par l'application de faisceau d'électrons pulsés sur les spores ou la forme végétative de *Bacillus pumilus*.

Une autre perspective peut être la recherche de l'explication de la plus grande résistance des bactéries en phase exponentielle. L'hypothèse de la protection du facteur de transcription σ^B (contrôleur de l'expression des protéines de stress) par son facteur anti- σ^B , RsbW, peut être

regardé. Il faudrait pour cela créer une mutation de la bactérie afin de ne plus avoir le facteur RsbW exprimé (Δ RsbW) ce qui empêcherait la formation du complexe σ^B -RsbW (complexe n'existant qu'en phase exponentielle). Un dénombrement serait alors fait afin de voir si la différence d'efficacité du traitement se retrouve toujours entre la phase stationnaire et la phase exponentielle.

Les décharges électriques

Pour la technologie des décharges électriques dans l'eau, l'objectif final est d'éliminer les bactéries contenues dans les TAR. Pour cela, il est nécessaire d'obtenir une diminution de $2 \log_{10}$. Les premiers essais ont permis de valider la plus grande résistance au traitement de la forme sporulée de *Bacillus pumilus* avec une diminution de $2,4 \log_{10}$ après 500 impulsions. Il a également été montré que la présence dans le milieu de pyruvate 1 mM permet de piéger 70% de l' H_2O_2 produit lors de l'application des décharges électriques dans le milieu. L'efficacité bactéricide de la technologie est donc diminuée avec une efficacité de $1,8 \log_{10}$ après 500 impulsions. Différentes concentrations en pyruvate pourraient être testées pour quantifier l'influence de la concentration en H_2O_2 sur la diminution logarithmique obtenue. Il a également été prouvé que les UV créés lors de l'application de la décharge contribuent largement à l'élimination des bactéries en conduisant à une diminution de $0,7 \log_{10}$ après 500 impulsions. Ces constatations confirment bien que les ROS et les UV sont des phénomènes prédominants dans l'élimination des bactéries par ce type de technologie. Il pourrait être intéressant, pour compléter l'étude, de travailler sur des biofilms. Les biofilms sont très résistants aux stress environnementaux. En effet, les bactéries sont confinées à l'intérieur d'une matrice extracellulaire qui les protège. Ces biofilms peuvent se former à l'intérieur des canalisations des TAR et être libérée dans la canalisation ce qui entraîne une forte concentration en bactéries temporairement dans l'eau. Par conséquent, il est nécessaire d'augmenter la concentration d'un facteur 100 voire 1000 pour tuer les bactéries [173].

La compréhension de l'effet, ou des effets, sur les bactéries s'est d'abord centrée sur l'observation de la morphologie et de l'organisation des différentes couches constituant *Bacillus pumilus*. Pour la forme végétative, un affaissement de l'enveloppe bactérienne ainsi qu'une augmentation de la longueur et la largeur de la bactérie sont observés en utilisant la MEB. L'affaissement révélé par MEB est confirmé en comparant les images obtenues en MET sur les échantillons témoins et essais. Ce type d'observation a déjà été mis en évidence après l'exposition de bactéries *Vibrio* sp. à des ondes de choc [167]. La déformation constatée après l'application des décharges électriques peut être due aux ondes de choc créées lors de l'apparition de l'arc dans l'eau. Pour valider cette hypothèse, il faudrait placer une solution de *Bacillus pumilus* dans un contenant ayant les mêmes propriétés d'absorption de l'onde que celles de l'eau. Cette expérience permettrait d'isoler le phénomène d'onde de choc des autres afin de voir son effet sur la morphologie des bactéries. Les résultats sur les spores sont différents. Aucune différence que ce soit de morphologie ou d'organisation n'est observée avec les outils de microscopie employés (AFM, MEB et MET). D'autre part, la mesure de la quantité d'ADN ou de protéines présents dans le surnageant suite au traitement n'a pas permis de révéler une perméabilisation de la paroi. Cependant, il est possible que de plus petites molécules soient relarguées (ions, ATP, ...) par la bactérie si un phénomène de

perméabilisation est apparu. Une analyse de ces molécules pourrait apporter des informations sur l'intégrité de la paroi de *Bacillus pumilus*.

L'observation de l'ADN de *Bacillus pumilus* n'a pas permis de tirer de conclusion quant à son intégrité ou à sa dégradation après l'application des décharges électriques. La sensibilité de la forme végétative au conditionnement a conduit à la création de cassures simple et double brin au niveau du témoin. Les échantillons essais présentent, cependant, des dommages plus importants révélant des cassures simple brin. Sur les spores de *Bacillus pumilus*, des dommages type cassures simple et double brin et de dimères de pyrimidine sont révélés. Pour voir l'influence du nombre d'impulsions sur la dégradation de l'ADN, il serait intéressant de faire des essais avec 100, 250 et 400 impulsions. La diminution logarithmique serait alors corrélée avec l'intensité des bandes obtenues sur les gels.

Le dernier axe de cette étude est l'analyse quantitative des protéines. Deux catégories de protéines se distinguent : les protéines sous-exprimées et les protéines surexprimées suite au traitement. Chez les bactéries végétatives, 57 protéines sont identifiées comme sous-exprimées avec une localisation à la fois au niveau de la membrane et du cytoplasme. Les mécanismes, dans lesquelles ces protéines sont impliquées, sont divers mais correspondent à des voies indispensables à la survie des bactéries (transport transmembranaire ou protéolyse, notamment). Les 9 protéines surexprimées sont soit des protéines membranaires soit des protéines cytoplasmiques. Dans le cas des spores, 20 protéines sont sous-exprimées. Il s'agit de protéines cytoplasmique et membranaire impliquées dans différents processus biologiques. Une grande majorité des protéines révélées par l'analyse sont des protéines surexprimées suite au traitement. En effet, 140 protéines rentrent dans cette catégorie et sont présentes soit au niveau du cytoplasme soit au niveau de la membrane. Il n'est pas possible d'identifier tous les processus biologiques correspondant à ces protéines car la base de données n'est pas complète. Cependant, il est révélé que les processus majoritairement impliqués dans la liste connue sont les mécanismes d'oxydo-réduction, les processus métaboliques ou des mécanismes indispensables à la production de protéines. Une modification au niveau de la bactérie est donc survenue suite au traitement permettant une meilleure extraction de certaines protéines. La création de ROS peut conduire à une fluidisation de la membrane par peroxydation des lipides (oxydation des lipides insaturés) [174] ce qui pourrait donner une explication à la surexpression de certaines protéines. Afin de valider cette hypothèse une mesure de fluidisation de la membrane entre un échantillon témoin et un essai pourrait être réalisée et une analyse cinétique pour évaluer les effets à court et long terme. L'utilisation du pyrène comme marqueur de fluidité est courante. Cette molécule va s'intercaler dans la membrane lipidique et former un excimère (molécule constituée de deux monomères identiques pouvant se trouver dans un état excité). La mesure de l'excitation de cet excimère en comparaison du monomère permet de remonter à la fluidité de la membrane. Plus la fluidité est importante, plus la quantité d'excimère, et donc de fluorescence mesurée, est importante [175].

Enfin, il serait intéressant d'évaluer l'influence de l'exposition aux UV ou aux ROS sur l'intégrité des protéines. Pour ce faire, il faudrait réaliser des essais avec la cuvette en Quartz, pour isoler l'effet des UV, ou ceux avec l'ajout de pyruvate 1 mM, pour inhiber l'action des ROS. A la suite de ces essais, une analyse protéomique permettrait de comparer les résultats avec ceux déjà obtenus.

En conclusion, cette étude aura permis de révéler des modifications induites par le faisceau d'électrons pulsés ou par les décharges électriques sur Bacillus pumilus sous forme végétative ou sporulée. Une perte d'hydrophobicité de l'enveloppe de Bacillus pumilus traité par les faisceaux d'électrons est révélée grâce à l'AFM. Une fuite du matériel cytoplasmique suite au traitement de Bacillus pumilus par les décharges électriques est observée à l'aide de deux outils de microscopie (MEB et MET). Enfin, que ce soit pour la forme végétative ou la forme sporulée, une dégradation de l'ADN et des protéines suite aux traitements est mise en évidence. Ces résultats peuvent apporter une explication au caractère bactéricide de ces deux technologies.

Références bibliographiques

1. Chalise PR, Hotta E, Matak KE, Jaczynski J. Inactivation Kinetics of *Escherichia coli* by Pulsed Electron Beam. *J Food Sci.* sept 2007;72(7):M280-5.
2. Silindir M, Ozer AY. Sterilization methods and the comparison of e-beam sterilization with gamma radiation sterilization. *FABAD J Pharm Sci.* 2009;34(34):43–53.
3. Levy C, Bornard I, Carlin F. Deposition of *Bacillus subtilis* spores using an airbrush-spray or spots to study surface decontamination by pulsed light. *J Microbiol Methods.* févr 2011;84(2):223-7.
4. Fiester SE, Helfinstine SL, Redfearn JC, Uribe RM, Woolverton CJ. Electron Beam Irradiation Dose Dependently Damages the *Bacillus* Spore Coat and Spore Membrane. *Int J Microbiol.* 2012;2012:1-9.
5. Miller A, Helt-Hansen J. Validation and routine process control for low-energy electron accelerators. *RadTech Eur 2011* [Internet]. 2011 [cité 29 févr 2016]; Disponible sur: http://orbit.dtu.dk/fedora/objects/orbit:107448/datastreams/file_6637572/content
6. Ghomi H, Shahedur Rahman M, Chalise PR, Hayashi Y, Watanabe M, Okino A, Ano T, Shoda M, Hotta E. Experimental Investigation of Effect of Low-Energy Pulsed Atmospheric Electron Beam on Bacterial Cells. *Jpn J Appl Phys.* 2005;44(12):Part 1.
7. Welle F, Mauer A, Franz R. Migration and sensory changes of packaging materials caused by ionising radiation. *Radiat Phys Chem.* 2002;63(3):841–844.
8. Règlement (UE) N° 10/2011 de la commission concernant les matériaux et objets en matière plastique destinés à entrer en contact avec des denrées alimentaires. 2011.
9. Règlement (CE) N° 1935/2004 du parlement européen et du conseil concernant les matériaux et objets destinés à entrer en contact avec des denrées alimentaires et abrogeant les directives 80/590/CEE et 89/109/CEE. 2004.
10. International Particle Accelerator Conference, Dai Z. Proceedings of 4th International Particle Accelerator Conference, IPAC 2013, May 13-17, 2013, Shanghai, China [Internet]. S. l.: JACoW; 2013 [cité 20 mars 2017]. Disponible sur: <http://accelconf.web.cern.ch/AccelConf/IPAC2013/index.htm>
11. Tallentire A, Miller A, Helt-Hansen J. A comparison of the microbicidal effectiveness of gamma rays and high and low energy electron radiations. *Radiat Phys Chem.* juin 2010;79(6):701-4.
12. Association for the Advancement of Medical Instrumentation. Sterilization of health care products: radiation. Arlington, Va.: Association for the Advancement of Medical Instrumentation; 2006.

13. Urgiles E, Wilcox J, Montes O, Osman S, Venkateswaran K, Cepeda M, Maxim J, Braby L, Pillai SD. Electron beam irradiation for microbial reduction on spacecraft components. In: Aerospace Conference, 2007 IEEE [Internet]. IEEE; 2007 [cité 14 déc 2015]. p. 1–15. Disponible sur: http://ieeexplore.ieee.org/xpls/abs_all.jsp?arnumber=4161293
14. Cleland MR. Industrial applications of electron accelerators. 2006 [cité 14 déc 2015]; Disponible sur: <http://cds.cern.ch/record/1005393>
15. Naddeo V. Water and wastewater disinfection by ultrasound irradiation - a critical review. *Glob NEST J.* 2014;16(3):561–77.
16. Juery C. Définition des caractéristiques techniques de fonctionnement et domaine d'emploi des appareils de désinfection. (2):30.
17. Ching W-K, Colussi AJ, Sun HJ, Nealson KH, Hoffmann MR. *Escherichia coli* disinfection by electrohydraulic discharges. *Environ Sci Technol.* 2001;35(20):4139–4144.
18. Vazhov VF, Muratov VM, Levchenko BS, Pel'tsman SS, Zhgun DV, Adam AM. Rock breakage by pulsed electric discharges. *J Min Sci.* 2012;48(2):308–13.
19. Lukes P, Zeman J, Horak V, Hoffer P, Pouckova P, Holubova M, Hosseini SHR, Akiyama H, Sunka P, Benes J. *In vivo* effects of focused shock waves on tumor tissue visualized by fluorescence staining techniques. *Bioelectrochemistry.* juin 2015;103:103–10.
20. INERIS. Les techniques de production de l'hydrogène et les risques associés. 2008 juin. Report No.: DRA-08-95313-07833B.
21. Seal S, Bera D, Kuiry SC, Meyyappan M, McCutchen ML. *In-situ* synthesis of carbon nanotubes filled with metallic nanoparticles using arc discharge in solution [Internet]. Google Patents; 2011 [cité 31 juill 2017]. Disponible sur: <http://www.google.com/patents/US7968072>
22. Kozáková Z. Electric discharges in water solutions. Brno University of Technology Faculty of Chemistry; 2011.
23. Son EE, Suvorov IF, Kakurov SV, Gaisin AF, Samitova GT, Solov'eva TL, Yudin AS, Rakhletsova TV. Electrical discharges with liquid electrodes used in water decontamination. *High Temp.* juill 2014;52(4):490–6.
24. Structure du peptidoglycane [Internet]. [cité 12 juin 2018]. Disponible sur: <http://www.biologiemarine.com/micro/paroi.htm>
25. Silhavy TJ, Kahne D, Walker S. The Bacterial Cell Envelope. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 1 mai 2010;2(5):a000414-a000414.
26. Percy MG, Gründling A. Lipoteichoic Acid Synthesis and Function in Gram-Positive Bacteria. *Annu Rev Microbiol.* 8 sept 2014;68(1):81–100.

27. Brown S, Santa Maria JP, Walker S. Wall Teichoic Acids of Gram-Positive Bacteria. *Annu Rev Microbiol.* 8 sept 2013;67(1):313-36.
28. Richter SG, Elli D, Kim HK, Hendrickx APA, Sorg JA, Schneewind O, Missiakas D. Small molecule inhibitor of lipoteichoic acid synthesis is an antibiotic for Gram-positive bacteria. *Proc Natl Acad Sci.* 26 févr 2013;110(9):3531-6.
29. Prescott LM, Willey JM, Sherwood LM, Woolverton CJ, Coyette J, Mergeay M, Prescott LM. *Microbiologie.* 2013.
30. Callen J-C. *Biologie cellulaire : des molécules aux organismes.* 2ème. Dunod; 2005.
31. Kennedy MJ, Reader SL, Swierczynski LM. Preservation records of micro-organisms: evidence of the tenacity of life. *Microbiology.* 1994;140(10):2513–2529.
32. Leggett MJ, McDonnell G, Denyer SP, Setlow P, Maillard J-Y. Bacterial spore structures and their protective role in biocide resistance: Spore structure and biocide resistance. *J Appl Microbiol.* sept 2012;113(3):485-98.
33. Errington J. Regulation of endospore formation in *Bacillus subtilis*. *Nat Rev Microbiol.* nov 2003;1(2):117-26.
34. McKenney PT, Driks A, Eichenberger P. The *Bacillus subtilis* endospore: assembly and functions of the multilayered coat. *Nat Rev Microbiol.* 3 déc 2012;11(1):33-44.
35. Henriques AO, Moran, Jr. CP. Structure, Assembly, and Function of the Spore Surface Layers. *Annu Rev Microbiol.* oct 2007;61(1):555-88.
36. Piggot PJ, Hilbert DW. Sporulation of *Bacillus subtilis*. *Curr Opin Microbiol.* déc 2004;7(6):579-86.
37. Setlow P. I will survive: DNA protection in bacterial spores. *Trends Microbiol.* avr 2007;15(4):172-80.
38. Eichenberger P, Fujita M, Jensen ST, Conlon EM, Rudner DZ, Wang ST, Ferguson C, Haga K, Sato T, Liu JS, Losick R. The Program of Gene Transcription for a Single Differentiating Cell Type during Sporulation in *Bacillus subtilis*. *PLoS Biol.* 2004;2(10):e328.
39. Setlow P. Spore germination. *Curr Opin Microbiol.* déc 2003;6(6):550-6.
40. Pillet F, Formosa-Dague C, Baaziz H, Dague E, Rols M-P. Cell wall as a target for bacteria inactivation by pulsed electric fields. *Sci Rep.* 1 févr 2016;6:19778.
41. Setlow P. Spores of *Bacillus subtilis*: their resistance to and killing by radiation, heat and chemicals. *J Appl Microbiol.* sept 2006;101(3):514-25.
42. Gerhardt P, Marquis RE. Spore thermoresistance mechanisms. *Regul Prokaryotic Dev.* 1989;43-63.

43. Ablett S, Darke AH, Lillford PJ, Martin DR. Glass formation and dormancy in bacterial spores. *Int J Food Sci Technol.* 1 févr 1999;34(1):59-69.
44. Setlow P. Small, acid-soluble spore proteins of *Bacillus* species: structure, synthesis, genetics, function, and degradation. *Annu Rev Microbiol.* 1988;42(1):319-338.
45. Setlow P. Resistance of bacterial spores. *Bact Stress Responses.* 2000;217-30.
46. Setlow P. Mechanisms for the prevention of damage to DNA in spores of *Bacillus* species. *Annu Rev Microbiol.* 1995;49(1):29-54.
47. Sanchez-Salas J-L, Santiago-Lara ML, Setlow B, Sussman MD, Setlow P. Properties of *Bacillus megaterium* and *Bacillus subtilis* mutants which lack the protease that degrades small, acid-soluble proteins during spore germination. *J Bacteriol.* 1992;174(3):807-814.
48. Paredes-Sabja D, Setlow P, Sarker MR. Germination of spores of *Bacillales* and *Clostridiales* species: mechanisms and proteins involved. *Trends Microbiol.* févr 2011;19(2):85-94.
49. Henriques AO, Moran CP. Structure and assembly of the bacterial endospore coat. *Methods San Diego Calif.* janv 2000;20(1):95-110.
50. Bailey-Smith K, Todd SJ, Southworth TW, Proctor J, Moir A. The ExsA Protein of *Bacillus cereus* Is Required for Assembly of Coat and Exosporium onto the Spore Surface. *J Bacteriol.* 1 juin 2005;187(11):3800-6.
51. Aronson AI, Fitz-James P. Structure and morphogenesis of the bacterial spore coat. *Bacteriol Rev.* juin 1976;40(2):360-402.
52. Jenkinson HF, Sawyer WD, Mandelstam J. Synthesis and Order of Assembly of Spore Coat Proteins in *Bacillus subtilis*. *J Gen Microbiol.* 3 janv 1981;123(1):1-16.
53. Lai E-M, Phadke ND, Kachman MT, Giorno R, Vazquez S, Vazquez JA, Maddock JR, Driks A. Proteomic Analysis of the Spore Coats of *Bacillus subtilis* and *Bacillus anthracis*. *J Bacteriol.* 15 févr 2003;185(4):1443-54.
54. Gerhardt P, Ribi E. Ultrastructure of the exosporium enveloping spores of *Bacillus cereus*. *J Bacteriol.* 1964;88(6):1774.
55. Matz LL, Beaman TC, Gerhardt P. Chemical composition of exosporium from spores of *Bacillus cereus*. *J Bacteriol.* 1970;101(1):196-201.
56. Barbosa TM, Serra C, Henriques AO. Gut sporeformers. *Bact Spores Probiotics Emerg Appl* Ricca E Henriques AO Cut SM Eds. 2004;78-101.
57. Setlow P. I will survive: protecting and repairing spore DNA. *J Bacteriol.* 1992;174(9):2737.

58. Nicholson WL, Munakata N, Horneck G, Melosh HJ, Setlow P. Resistance of *Bacillus* endospores to extreme terrestrial and extraterrestrial environments. *Microbiol Mol Biol Rev.* 2000;64(3):548–572.
59. Young SB, Setlow P. Mechanisms of *Bacillus subtilis* spore resistance to and killing by aqueous ozone. *J Appl Microbiol.* mai 2004;96(5):1133-42.
60. Melly E, Cowan AE, Setlow P. Studies on the mechanism of killing of *Bacillus subtilis* spores by hydrogen peroxide. *J Appl Microbiol.* 2002;93(2):316–325.
61. Cowan AE, Olivastro EM, Koppel DE, Loshon CA, Setlow B, Setlow P. Lipids in the inner membrane of dormant spores of *Bacillus* species are largely immobile. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2004;101(20):7733–7738.
62. Driks A. The dynamic spore. *Proc Natl Acad Sci.* 2003;100(6):3007–3009.
63. Driks A. *Bacillus subtilis* spore coat. *Microbiol Mol Biol Rev.* 1999;63(1):1–20.
64. Henriques AO, Costa T, Martins L, Zilh~ao R. Functional architecture and assembly of the spore coat. Vol. Bacterial Spore formers : probiotics and emerging applications. Ezio Ricca, Adriano O. Henriques and Simon M. Cutting; 2004.
65. Nicholson W. Ubiquity, longevity, and ecological roles of *Bacillus* spores. 2004;2-15.
66. Wold F. *In vivo* chemical modification of proteins (post-translational modification). *Annu Rev Biochem.* 1981;50:783-814.
67. Kozuka S, Tochikubo K. Properties and origin of filamentous appendages on spores of *Bacillus cereus*. *Microbiol Immunol.* 1985;29:21–37.
68. Takumi K, Kinouchi T, Kawata T. Isolation and partial characterization of exosporium from spores of a highly sporogenic mutant of *Clostridium botulinum* type A. *Microbiol Immunol.* 1979;23:443-54.
69. Keynan A, Evenchik Z. Activation. In The Bacterial Spore eds. Gould, G.W. and Hurst, A. Acad Press. 1969;359-96.
70. Gould GW. Germination. *Bact Spore.* 1969;397-444.
71. Stewart BT, Halvorson HO. STUDIES ON THE SPORES OF AEROBIC BACTERIA I.: The Occurrence of Alanine Racemase1. *J Bacteriol.* 1953;65(2):160.
72. Donnenberg M. *Escherichia coli* Virulence mechanisms of a versatile pathogen. 2002.
73. Levanduski L, Jaczynski J. Increased resistance of *Escherichia coli* O157:H7 to electron beam following repetitive irradiation at sub-lethal doses. *Int J Food Microbiol.* 10 févr 2008;121(3):328-34.
74. Parisi A, Antoine AD. Increased radiation resistance of vegetative *Bacillus pumilus*. *Appl Microbiol.* 1974;28(1):41–46.

75. Cleghorn DA, Dunn J, Nablo SV. Sterilization of plastic containers using electron beam irradiation directed through the opening. *J Appl Microbiol.* 2002;93(6):937–943.
76. OCIII M. 5.1 Low Voltage electron beam Accelerators. *Appl ELECTRON Accel* JANUARY 28-Febr 20029 JAERI TAKASAKI Jpn. :61.
77. Flakus FN. La détection et la mesure des rayonnements ionisants - Bref historique. Volume 23, n°4. 1981;31-6.
78. Jimonet C, Métivier H. Principes de radioprotection, réglementation. Les Ulis: EDP sciences; 2007.
79. Métivier H, Institut National des Sciences et Techniques Nucléaires. Radioprotection et ingénierie nucléaire. Les Ulis, France: EDP Sciences; 2006.
80. IRSN [Internet]. [cité 16 janv 2017]. Disponible sur: http://www.irsn.fr/FR/connaissances/Mediatheque/pages/Detail_Mediatheque.aspx?GuidWeb=a8593a58-4f24-4ffe-859f-89528a4e1579&GuidList=0a96196c-2427-4669-a383-254046e877c7&GuidItem=27&Cible=1&imgId=a51fc9c0-163f-4ea8-a841-c7f6088a014e|36
81. Aguirre JS, Rodríguez MR, García de Fernando GD. Effects of electron beam irradiation on the variability in survivor number and duration of lag phase of four food-borne organisms. *Int J Food Microbiol.* oct 2011;149(3):236-46.
82. Rahman MS, Ghomi H, Chalise PR, Hayashi Y, Watanabe M, Okino A, Ano T, Shoda M, Hotta E. Inactivation of cells and spores of *Bacillus subtilis* using low energy pulsed electron beam. *Jpn J Appl Phys.* 2006;45(9L):L881.
83. IAEA. Industrial radiation processing with electron beams and X-rays. 2011.
84. Chalise PR, Rahman MS, Ghomi H, Hayashi Y, Watanabe M, Okino A, Ano T, Shoda M, Hotta E. Bacterial Inactivation Using Low-Energy Pulsed-Electron Beam. *IEEE Trans Plasma Sci.* août 2004;32(4):1532-9.
85. Helfinstine SL, Vargas-Aburto C, Uribe RM, Woolverton CJ. Inactivation of *Bacillus* Endospores in Envelopes by Electron Beam Irradiation. *Appl Environ Microbiol.* 1 nov 2005;71(11):7029-32.
86. DeVeaux LC. Effect of electron beam dose rate on microbial survival. 2007 [cité 14 déc 2015]; Disponible sur: <http://mathematicsandcomputation.cowhosting.net/ACCAPP-2007/data/papers/178363.pdf>
87. Martin D, Craciun G, Manaila E, Ighigeanu D, Togoe I, Oproiu C, Margaritescu I, Iacob N. Waste treatment by microwave and electron beam irradiation. In: Proceedings of the 2 nd Environmental Physics Conference, Alexandria, Egypt February18-22 [Internet]. 2006 [cité 29 févr 2016]. Disponible sur: <http://www.physicsegyp.org/epc06/epc613.pdf>

88. Zhu H, Xu J, Li S, Sun X, Yao S, Wang S. Effects of high-energy-pulse-electron beam radiation on biomacromolecules. *Sci China Ser B Chem.* janv 2008;51(1):86-91.
89. Harris DR, Pollock SV, Wood EA, Goiffon RJ, Klingele AJ, Cabot EL, Schackwitz W, Martin J, Eggington J, Durfee TJ, Middle CM, Norton JE, Popelars MC, Li H, Klugman SA, Hamilton LL, Bane LB, Pennacchio LA, Albert TJ, Perna NT, Cox MM, Battista JR. Directed Evolution of Ionizing Radiation Resistance in *Escherichia coli*. *J Bacteriol.* 15 août 2009;191(16):5240-52.
90. Culotta VC, Daly MJ. Manganese Complexes: Diverse Metabolic Routes to Oxidative Stress Resistance in Prokaryotes and Yeast. *Antioxid Redox Signal.* 20 sept 2013;19(9):933-44.
91. Witkin EM. Inherited differences in sensitivity to radiation in *Escherichia coli*. *Proc Natl Acad Sci.* 1946;(32):59-68.
92. Nablo S. Process for bulk sterilization, minimizing chemical and physical damage [Internet]. Google Patents; 1973 [cité 29 févr 2016]. Disponible sur: <http://www.google.com/patents/US3779706>
93. Ziae F, Anvari F, Ghaffari M, Borhani M. Dose rate effect on LDPE cross-linking induced by electron beam irradiation. *Nukleonika.* 2005;50(3):125-127.
94. Acharya S. Effect of pulsed electron beam on cell killing. *Proc DAE-BRNS Indian Part Accel Conf.* 2009;46(11).
95. Li HOL, Kang J, Urashima K, Saito N. Comparison between the mechanism of liquid plasma discharge process in water and organic solution. *J Inst Electrostat Jpn.* 2013;37:22-27.
96. Madron MS, McClure SR, Griffith RW, Wang C. Absence of bactericidal effect of focused shock waves on an in-vitro biofilm model of an implant. *Can J Vet Res.* 2012;76(2):129.
97. Loske AM, Alvarez UM, Cabello M, Herrera C, Barajas A, Prieto FE. Bactericidal effect of underwater shock waves [Internet]. 2002 [cité 16 juin 2015]. Disponible sur: http://www.researchgate.net/profile/Achim_Loske/publication/242141635_BACTERIC_IDAL_EFFECT_OF_UNDERWATER_SHOCK_WAVES/links/00b49529f6532842ea000000.pdf
98. Prieto-Calvo M, Prieto M, López M, Alvarez-Ordóñez A. Effects of High Hydrostatic Pressure on *Escherichia coli* Ultrastructure, Membrane Integrity and Molecular Composition as Assessed by FTIR Spectroscopy and Microscopic Imaging Techniques. *Molecules.* 18 déc 2014;19(12):21310-23.
99. Escartín Fernández Eduardo. Microbiología e inocuidad de los alimentos. Querétaro, México: Universidad Autónoma de Querétaro; 2000.
100. Edebo L. Production of photons in the bactericidal effect of transient electric arcs in aqueous systems. *Appl Microbiol.* 1969;17(1):48-53.

101. Dors M, Metel E, Mizeraczyk J, Marotta *E. Coli* bacteria inactivation by pulsed corona discharge in water. *Int J Plasma Env Sci Technol.* 2008;2(1):34–37.
102. Anpilov AM, Barkhudarov EM, Christofi N, Kop'ev VA, Kossyi IA, Taktakishvili MI, Zadiraka Y. Pulsed high voltage electric discharge disinfection of microbially contaminated liquids. *Lett Appl Microbiol.* 2002;35(1):90–94.
103. Chang JS, Looy PC, Urashima K, Bryden AD. Pulsed Arc Discharge in Water: Mechanism of Current Conduction and pressure wave formation. *IEEE.* 2000;105–8.
104. Álvarez I, Pagan R, Raso J, Codo S, Sala FJ. Microbial Inactivation by Ultrasound. *Food Technol Univ Zaragoza Miguel Servet.* 2000;177:50013.
105. Novak KF, Govindaswami M, Ebersole JL, Schaden W, House N, Novak MJ. Effects of low-energy shock waves on oral bacteria. *J Dent Res.* 2008;87(10):928–931.
106. Loraine G, Chahine G, Hsiao C-T, Choi J-K, Aley P. Disinfection of gram-negative and gram-positive bacteria using DynaJets® hydrodynamic cavitating jets. *Ultrason Sonochem.* 2012;19(3):710–717.
107. Allen M, Soike K. Sterilization by electrohydraulic treatment. *Science.* 1966;154(3745):155–157.
108. Abedi-Moghaddam N, Bulic A, Herderson L, Lam E. Survival of *Escherichia coli* to UV irradiation during exponential and stationary phases of growth. *J Exp Microbiol Immunol.* 2004;5:44–49.
109. Klotz B, Mañas P, Mackey BM. The relationship between membrane damage, release of protein and loss of viability in *Escherichia coli* exposed to high hydrostatic pressure. *Int J Food Microbiol.* févr 2010;137(2-3):214–20.
110. Gerdesmeyer L, von Eiff C, Horn C, Henne M, Roessner M, Diehl P, Gollwitzer H. Antibacterial effects of extracorporeal shock waves. *Ultrasound Med Biol.* janv 2005;31(1):115–9.
111. Edebo L. The effect of the photon radiation in the microbicidal effect of transient electric arcs in aqueous systems. *Microbiology.* 1968;50(2):261–270.
112. Arrojo S, Benito Y, Martínez Tarifa A. A parametrical study of disinfection with hydrodynamic cavitation. *Ultrason Sonochem.* juill 2008;15(5):903–8.
113. Hazell PJ, Groves K, Stennett C, Beveridge C. Shock compression and recovery of microorganism-loaded broths and an emulsion. 2009 [cité 16 juin 2015]; Disponible sur: <https://dspace.lib.cranfield.ac.uk/handle/1826/5318>
114. Edebo L, Holme T, Selin I. Microbicidal action of compounds generated by transient electric arcs in aqueous systems. *J Gen Microbiol.* 1968;53(1):1–7.

115. Edebo L, Selin I. The effect of the pressure shock wave and some electrical quantities in the microbicidal effect of transient electric arcs in aqueous systems. *Microbiology*. 1968;50(2):253–259.
116. Pagán R, Mackey B. Relationship between membrane damage and cell death in pressure-treated *Escherichia coli* cells: differences between exponential-and stationary-phase cells and variation among strains. *Appl Environ Microbiol*. 2000;66(7):2829–2834.
117. Clouston JG, Wills PA. Initiation of germination and inactivation of *Bacillus pumilus* spores by hydrostatic pressure. *J Bacteriol*. 1969;97(2):684–690.
118. Mason TJ, Peters D. Practical Sonochemistry: Power Ultrasound Uses and Applications. 2nd edition. Horwood Publishing Series in Chemical Science; 2002.
119. de Regt A. Bacterial Biofilms: Evaluating Destruction. [cité 6 févr 2017]; Disponible sur: http://www.sccs.swarthmore.edu/users/12/aburka1/e90_0809/Anna%20de%20Regt.pdf
120. Tabatabaie F, Mortazavi A. Studying the effects of ultrasound shock on cell wall permeability and survival of some LAB in milk. *World Appl Sci J*. 2008;3(1):119–121.
121. Scherba G, Weigel RM, O'Brien WD. Quantitative assessment of the germicidal efficacy of ultrasonic energy. *Appl Environ Microbiol*. 1991;57(7):2079–2084.
122. Kresge KG. The impact of UV radiation on bacterial growth in lakes of the Pocono Plateau. 1996 [cité 6 févr 2017]; Disponible sur: <http://preserve.lehigh.edu/cgi/viewcontent.cgi?article=1440&context=etd>
123. Achim M, Loske UM, Hernandez-Galicia C, Castaño-Tostado E, Prieto FE. Bactericidal effect of underwater shock waves on *Escherichia coli* ATCC 10536 suspensions. Vol. 3. Elsevier; 2002. 321.327.
124. Kodoth V, Jones M. The Effects of Ultraviolet Light on *Escherichia coli*. *J Emerg Investig* Sept. 2015;1–4.
125. Kashmiri ZN, Mankar SA. Free radicals and oxidative stress in bacteria. *Int J Curr Microbiol App Sci*. 2014;3:34–40.
126. Krumova K, Cosa G. Singlet oxygen : Applications in biosciences and nanosciences, Chapitre 1 : Overview of reactive oxygen species. Vol. 1. 2016.
127. Vatansever F, de Melo WCMA, Avci P, Vecchio D, Sadashivam M, Gupta A, Chandran R, Karimi M, Parizotto NA, Yin R, Tegos GP, Hamblin MR. Antimicrobial strategies centered around reactive oxygen species – bactericidal antibiotics, photodynamic therapy, and beyond. *FEMS Microbiol Rev*. nov 2013;37(6):955–89.
128. Cabiscool E, Tamarit J, Ros J. Oxidative stress in bacteria and protein damage by reactive oxygen species. *Int Microbiol*. 2000;3(1):3–8.

129. Weidinger A, Kozlov A. Biological Activities of Reactive Oxygen and Nitrogen Species: Oxidative Stress versus Signal Transduction. *Biomolecules*. 15 avr 2015;5(2):472-84.
130. Guzun-Cojocaru T. Peroxydation des lipides émulsionnés et transfert d'ions fer à l'interface huile/eau stabilisée par des protéines de lait: influence des résidus phosphates et de la stabilité du chélate de fer [Internet]. Dijon; 2010 [cité 31 mars 2017]. Disponible sur: <http://www.theses.fr/2010DIJOS012>
131. Dezest M, Bulteau A-L, Quinton D, Chavatte L, Le Bechec M, Cambus JP, Arbault S, Nègre-Salvayre A, Clément F, Cousty S. Oxidative modification and electrochemical inactivation of *Escherichia coli* upon cold atmospheric pressure plasma exposure. Arora R, éditeur. PLOS ONE. 30 mars 2017;12(3):e0173618.
132. Joubert V, Cheype C, Bonnet J, Packan D, Garnier J-P, Teissié J, Blanckaert V. Inactivation of *Bacillus subtilis* var. *niger* of both spore and vegetative forms by means of corona discharges applied in water. *Water Res*. mars 2013;47(3):1381-9.
133. Loison P. Etude de la spore de *Bacillus subtilis*: caractérisation des structures impliquées dans sa résistance [Internet]. Université de Bourgogne; 2013 [cité 1 août 2016]. Disponible sur: <https://tel.archives-ouvertes.fr/tel-01124213/>
134. Luu H, Akoachere M, Patra M, Abel-Santos E. Cooperativity and Interference of Germination Pathways in *Bacillus anthracis* Spores. *J Bacteriol*. 15 août 2011;193(16):4192-8.
135. Zhang P, Setlow P, Li Y. Characterization of single heat-activated *Bacillus* spores using laser tweezers Raman spectroscopy. *Opt Express*. 2009;17(19):16480-16491.
136. Troxell B, Zhang J-J, Bourret TJ, Zeng MY, Blum J, Gherardini F, Hassan HM, Yang XF. Pyruvate Protects Pathogenic Spirochetes from H₂O₂ Killing. Wooten RM, éditeur. PLoS ONE. 2 janv 2014;9(1):e84625.
137. Metallic Coatings [Internet]. [cité 12 sept 2018]. Disponible sur: <https://www.layertec.de/en/capabilities/coatings/metallic>
138. Randive R. Using UV Reflective Materials to Maximize Disinfection. 2016.
139. Thankam Finosh G, Jayabalan M. Reactive oxygen species—Control and management using amphiphilic biosynthetic hydrogels for cardiac applications. *Adv Biosci Biotechnol*. 2013;04(12):1134-46.
140. Olof Björn L. Photobiology : The science of life and light. 3ème édition. Lars Olof Björn; 2008. 41-42 p.
141. Keijser BJF, Ter Beek A, Rauwerda H, Schuren F, Montijn R, van der Spek H, Brul S. Analysis of Temporal Gene Expression during *Bacillus subtilis* Spore Germination and Outgrowth. *J Bacteriol*. 1 mai 2007;189(9):3624-34.

142. Fazzini MM, Schuch R, Fischetti VA. A Novel Spore Protein, ExsM, Regulates Formation of the Exosporium in *Bacillus cereus* and *Bacillus anthracis* and Affects Spore Size and Shape. *J Bacteriol.* 1 août 2010;192(15):4012-21.
143. Vithayaveroj V. Atomic force microscopy for sorption studies. 2004 [cité 27 oct 2015]; Disponible sur: <https://smartech.gatech.edu/handle/1853/4818>
144. Müller DJ, Dufrêne YF. Atomic force microscopy as a multifunctional molecular toolbox in nanobiotechnology. *Nat Nanotechnol.* mai 2008;3(5):261-9.
145. Microscopie à force atomique [Internet]. Disponible sur: http://iramis.cea.fr/Phocea/file.php?class=cours&file=/ludovic.douillard/Microscopie_a_force_atomique.pdf
146. Dufrêne YF, Martínez-Martín D, Medalsy I, Alsteens D, Müller DJ. Multiparametric imaging of biological systems by force-distance curve-based AFM. *Nat Methods.* sept 2013;10(9):847-54.
147. Grillon F, Ruste J. Petite histoire de la microscopie électronique à balayage. 2010 déc.
148. Stiefel P, Schmidt-Emrich S, Maniura-Weber K, Ren Q. Critical aspects of using bacterial cell viability assays with the fluorophores SYTO9 and propidium iodide. *BMC Microbiol.* 2015;15(1):36.
149. Schwartz DC, Cantor CR. Separation of yeast chromosome-sized DNAs by pulsed field gradient gel electrophoresis. *Cell.* mai 1984;37(1):67-75.
150. Hoke F. Pulsed-Field Electrophoresis enhances genome effert. *The Scientist.* 14 sept 1992;(September 1992 Issue).
151. Voet D, Voet JG. Biochimie. 2ème édition. p. 157: De Boeck; 2004.
152. Douki T, Setlow B, Setlow P. Effects of the Binding of alpha/béta-type Small, Acid-soluble Spore Proteins on the Photochemistry of DNA in Spores of *Bacillus subtilis* and *In Vitro*. *Photochem Photobiol.* 2005;81:163-9.
153. Otlewska A, Oltuszak-Walczak E, Walczak P. Differentiation of strains from the *Bacillus cereus* group by RFLP-PFGE genomic fingerprinting: Nucleic acids. *ELECTROPHORESIS.* sept 2013;n/a-n/a.
154. Maron P-A, Lejon D, Bizet K, Carvalho E. Méthode d'extraction d'acides nucléiques. EP 1 673 455 B1, 2008. p. 27.
155. Site de référencement des définitions de gène ontologie (QuickGO) [Internet]. [cité 12 juin 2018]. Disponible sur: <https://www.ebi.ac.uk/QuickGO/GTerm>
156. DeVeaux LC, Müller JA, Smith J, Petrisko J, Wells DP, DasSarma S. Extremely radiation-resistant mutants of a halophilic archaeon with increased single-stranded DNA-binding protein (RPA) gene expression. *Radiat Res.* 2007;168(4):507-514.

157. Kottemann M, Kish A, Iloanusi C, Bjork S, DiRuggiero J. Physiological responses of the halophilic archaeon *Halobacterium* sp. strain NRC1 to desiccation and gamma irradiation. *Extremophiles*. 2005;(9):219-27.
158. Petersohn A, Brigulla M, Haas S, Hoheisel JD, Volker U, Hecker M. Global Analysis of the General Stress Response of *Bacillus subtilis*. *J Bacteriol*. 1 oct 2001;183(19):5617-31.
159. Boylan SA, Redfield AR, Price CW. Transcription factor sigma B of *Bacillus subtilis* controls a large stationary-phase regulon. *J Bacteriol*. 1993;175(13):3957-3963.
160. Reichmann NT, Cassona CP, Grundling A. Revised mechanism of D-alanine incorporation into cell wall polymers in Gram-positive bacteria. *Microbiology*. 1 sept 2013;159(Pt_9):1868-77.
161. Wouters PC, Bos AP, Ueckert J. Membrane Permeabilization in Relation to Inactivation Kinetics of *Lactobacillus* Species due to Pulsed Electric Fields. *Appl Environ Microbiol*. 1 juill 2001;67(7):3092-101.
162. Lv Y, Wang J, Gao H, Wang Z, Dong N, Ma Q, Shan A. Antimicrobial Properties and Membrane-Active Mechanism of a Potential α -Helical Antimicrobial Derived from Cathelicidin PMAP-36. Khan RH, éditeur. *PLoS ONE*. 21 janv 2014;9(1):e86364.
163. Moeller R, Stackebrandt E, Reitz G, Berger T, Rettberg P, Doherty AJ, Horneck G, Nicholson WL. Role of DNA Repair by Nonhomologous-End Joining in *Bacillus subtilis* Spore Resistance to Extreme Dryness, Mono- and Polychromatic UV, and Ionizing Radiation. *J Bacteriol*. 15 avr 2007;189(8):3306-11.
164. Moeller R, Setlow P, Pedraza-Reyes M, Okayasu R, Reitz G, Nicholson WL. Role of the Nfo and ExoA Apurinic/Apyrimidinic Endonucleases in Radiation Resistance and Radiation-Induced Mutagenesis of *Bacillus subtilis* Spores. *J Bacteriol*. 1 juin 2011;193(11):2875-9.
165. Alonso JC, Cardenas PP, Sanchez H, Hejna J, Suzuki Y, Takeyasu K. Early steps of double-strand break repair in *Bacillus subtilis*. *DNA Repair*. 1 mars 2013;12(3):162-76.
166. Bolhuis A, Broekhuizen CP, Sorokin A, van Roosmalen ML, Venema G, Bron S, Quax WJ, van Dijken JM. SecDF of *Bacillus subtilis*, a molecular Siamese twin required for the efficient secretion of proteins. *J Biol Chem*. 1998;273(33):21217-21224.
167. Abe A, Miyachi Y, Mimura H. Study of mechanical and chemical effects induced by shock waves on the inactivation of a marine bacterium. In: *Shock Waves*. Springer; 2009. p. 875-880.
168. Konovalova A, Søgaard-Andersen L, Kroos L. Regulated proteolysis in bacterial development. *FEMS Microbiol Rev*. mai 2014;38(3):493-522.
169. Bürkle A. Posttranslational Modification. Academic press; 2001. 1533 p.

170. Kaznadzey A, Shelyakin P, Gelfand MS. Sugar Lego: gene composition of bacterial carbohydrate metabolism genomic loci. Biol Direct [Internet]. déc 2017 [cité 26 juin 2018];12(1). Disponible sur: <https://biologydirect.biomedcentral.com/articles/10.1186/s13062-017-0200-7>
171. Weil J-H. Biochimie générale. 10 ème édition. Dunod;
172. Bhavsar AP, Erdman LK, Schertzer JW, Brown ED. Teichoic Acid Is an Essential Polymer in *Bacillus subtilis* That Is Functionally Distinct from Teichuronic Acid. J Bacteriol. 1 déc 2004;186(23):7865-73.
173. Pillet F. Electroporation of Biofilms. In: Miklavčič D, éditeur. Handbook of Electroporation [Internet]. Cham: Springer International Publishing; 2017 [cité 29 janv 2019]. p. 403-16. Disponible sur: http://link.springer.com/10.1007/978-3-319-32886-7_27
174. Eze MO. Membrane fluidity, reactive oxygen species, and cell-mediated immunity: Implications in nutrition and disease. avr 1992;37(4):220-4.
175. Wilson-Ashworth HA, Bahm Q, Erickson J, Shinkle A, Vu MP, Woodbury D, Bell JD. Differential Detection of Phospholipid Fluidity, Order, and Spacing by Fluorescence Spectroscopy of Bis-pyrene, Prodan, Nystatin, and Merocyanine 540. Biophys J. déc 2006;91(11):4091-101.

Annexes

Annexe 1 : Proceeding de l'EAPPC 2016 'Bacteria inactivation by pulsed electron beam'

Bacteria inactivation by pulsed electron beam

Camille Lamarche, Gauthier Demol

ITHPP

Thégra, France

clamarche@ithpp-alcen.fr

Flavien Pillet, Houda Baaziz, Marie-Pierre Rols

Cellular Biophysics

IPBS/CNRS

Toulouse, France

Pulsed electron beam is a promising physical technology which enables to sterilize products or packaging. However, the mechanisms involved in bacteria inactivation are still not fully known. In this work, we have investigated by using electron microscopy the effects of pulsed electron beam on the bacterial envelope. The results reveal a high efficiency of bacteria inactivation but curiously, without any structural modification in the cell-envelope. The explanation of the killing effect remains pending.

Keywords—pulsed electron beam, *Bacillus pumilus*, inactivation, SEM, TEM

I. INTRODUCTION

Food and pharmaceutical industries use different types of sterilization methods: chemical (hydrogen peroxide...), thermal or physical (gamma ray, X-ray or electron beam) technologies. However, these solutions are time consuming, cost effective and sometimes harmful to health (e.g. hydrogen peroxide). Within context, the low energy pulsed electron beam is promising and allows sterilization without using chemical compounds and can be an IN-LINE process. The equipment presented delivers more than 1 kGy in a 10 ns pulse width at a repetition rate of 100 Hz that leads to very high dose rate and makes sterilization possible at less than 25 kGy in the millisecond range. Electron beam was extracted from a cathode and went through an anode, consisted of metallic foil and called the extraction window.

Here, we first present the efficiency of pulsed electron beam on bacteria (vegetative form and spore) to select the best model for the study. Then, we investigated if an adaptive mechanism of spores to electron beam is present. Finally, we tried to explain the mechanisms involved in the killing effect.

II. MATERIALS AND METHODS

A. Strain selection and growth conditions

The first strain selected is *Bacillus atrophaeus* ATCC 9372 which is the reference for food industries. The second one is *Bacillus pumilus* ATCC 27142. This strain is the reference for ionization treatment [1][2].

These strains can be found under vegetative (growth phase) and spore (dormant) forms. The last form is resistant to environmental stresses.

Vegetative cells were cultivated in Luria broth (LB) medium overnight at 37°C. Cells were centrifuged during 5 minutes at 6 000g and the pellet was resuspended in sterile deionized water. The final concentration of bacteria was 10 times more important than the initial solution.

Spore cells had grown after stationary phase, during 5 days at 37°C. The medium was the following: 8g/L of Difco Nutrient Broth (Difco), 100 mM of MgSO₄, 10% of KCl, 1M of NaOH, 1M of Ca(NO₃)₂, 10 mM of MnCl₂ and 1mM of FeSO₄. To eliminate vegetative forms, the solution was heat-shocked at 80°C during 20 minutes. Spores were recovered by centrifugation (5 minutes at 10 000g). Spores were collected on sterile deionized water in order to have 10 times more bacteria than the cultivated solution.

B. Treatment

The voltage and current of the generator used for this experiment were 250 kV and 5 kA, respectively. The pulse duration was 10 ns. For the experiment, two parameters were studied: the pulsed repetition frequency (from 5 to 100 Hz) and the distance from the extraction window (from 2 cm to 9 cm).

C. Determination of inactivation rate

- For treatment on agar, different concentrations of bacteria were spread on Petri dishes. The dishes were treated with the pulsed electron beam and incubated overnight at 37°C. The colonies were counted and the inactivation rate was calculated thanks to the equation (1).
- For dry treatment, 10 µL of solution were put on empty Petri dishes and dried under laminar flow. Following the treatment, spots were resuspended in sterile distilled water and different dilutions were applied and spread on Plate Count Agar (PCA) medium overnight at 37°C. The equation (1) was used to determine the inactivation rate.

$$IR = \log_{10}(N_0/N) \quad (1)$$

IR = inactivation rate

N₀ = initial microbial concentration

N = number of survivors after the treatment

D. Resistance evaluation

After an exposition to electron beam at sub-lethal dose, bacteria can acquire a better resistance to the treatment for the same dose [1] [3] [4].

To determine if there is a modification of resistance with our technology, two solutions of *Bacillus pumilus* spores with 10^{10} spores/mL were prepared and a spot of $10\mu\text{L}$ was deposited on Petri dishes. The first solution called Wild Type (WT) was the stock solution. It was the reference for the efficiency. The other one was cultivated from bacteria which was treated under lethal dose \times time(s). After the irradiation, spots were recovered as described on *H. C.* part for 'dry treatment' and survival strain were counted. The decontamination rates were compared. The two Petri dishes were placed at the same time under the electron beam.

The treatment applied for each sample was 10 pulses \pm 7 centimeters from the extraction window, with a pulsed repetition frequency of 100 Hz.

E. Scanning Electron microscopy and Transmission Electron Microscopy observation

P.R. Chalise and S.E. Fiester shown pores formation due to electron beam treatment. A high density of current could induce the formation of irreversible pores around the bacteria [5] [6]. Electron microscopy was used to observe if this phenomenon appears with pulsed electron beam. Bacteria were fixed with 2% glutaraldehyde in 0.1M Sorensen phosphate buffer pH 7.2 just after the recovered. The samples were prepared by the CMEAB platform, Toulouse (France).

For Scanning Electron microscopy (SEM), images were acquired with an electron microscope QuantaTM 250 FEG (FEI, USA) at an accelerating voltage of 10 kV.

For Transmission Electron Microscopy (TEM), sections had a thickness of 70 nm and were placed on a grid. Images were visualized with HT 7700 at 80 kV (Hitachi, USA).

III. RESULTS

A. Selection of reference strain

We made treatment on agar placed at 7 centimeters and with a pulsed repetition frequency of 100 Hz to select the most resistant strain. Vegetative form of *Bacillus atrophaeus* was irradiated with 2 pulses. In this condition, the logarithmic reduction is more than 5.7. For the spore form of this bacteria, we need 10 pulses to obtain $4.47 \log_{10}$ reductions. Consequently, as described in the literature, spore form of bacteria is more resistant than vegetative form. Indeed, the different layers which composed the spore, the presence of a core with condensed DNA, the low concentration of water and other parameters explain the faculty of this form to survive in extreme conditions [7] [8] [9].

The experiment was made on *Bacillus pumilus* spores, which are the reference for irradiation technologies. This strain is effectively more resistant than *Bacillus atrophaeus*

spores because after a treatment with 10 pulses, the logarithmic reduction obtained was $4.1 \log_{10}$.

This is the strain selected for the rest of the study.

B. Parameters influence

- The first parameter studied was the pulsed repetition frequency (Hz). For these experiments, *Bacillus pumilus* spores were spotted on empty Petri dishes and placed under the extraction window at 7 centimeters. Inactivation was calculated by colony counting and with the equation (1). The results revealed that for 50Hz and 100Hz, the decontamination rate was the same. However, for 5Hz, the efficiency was better (Fig. 1). These phenomena can be explained because the switch of the generator is self-triggered, consequently, for low frequency, the parameters are different than parameters for high repetition frequency. Consequently, we cannot conclude that the frequency has an influence on the mortality rate of this strain. Because this equipment can be used for industrial applications, the maximum repetition frequency was chosen for the next experiments.
- The second parameter was the distance from the extraction window. For these experiments, *Bacillus pumilus* spores were spotted on empty Petri dishes and placed under the extraction window at 2, 4, 7 and 9 centimeters. The repetition frequency was 100Hz. Inactivation was calculated by colony counting and with the equation (1). On Fig. 2, the graph revealed a better efficiency when bacteria were placed close to the extraction window. These phenomena can be explained because of electron beam interaction with molecules present in the air and their path was modified. The interaction with molecules decreased also energy of electrons. These two phenomena induced a decreased of the dose with the distance.

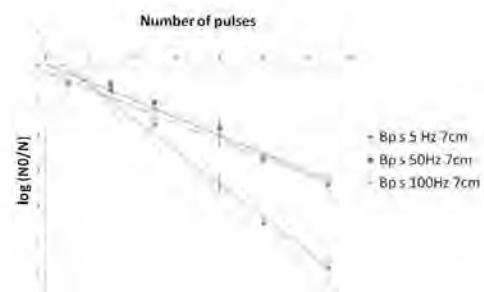


Fig. 1. Influence of the pulsed repetition frequency on the treatment efficiency on *Bacillus pumilus* spores. Effect of different number of pulses when samples were placed at 7 centimeters from the extraction window and for different frequency (Hz): 5Hz (diamond), 50Hz (square) and 100Hz (triangle) on the inactivation rate.

D. Cell wall observation by electronic microscopy

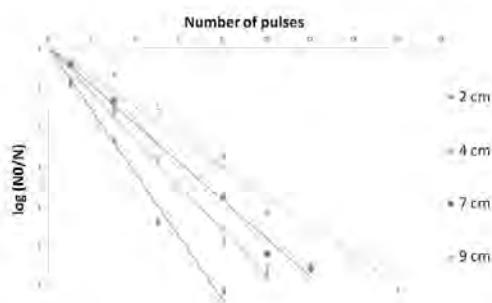


Fig. 2. Influence of the distance from the extraction window on the treatment efficiency on *Bacillus pumilus* spores. Effect of different number of pulses when samples were placed at different distances from the extraction window: 2 centimeters (diamond), 4 centimeters (round), 7 centimeters (square) and 9 centimeters (triangle) on the inactivation rate.

C. Evolution of the resistance after several treatments at sub-lethal dose

The efficiency of the technology was validated. However, it is important to know if any resistance can appear in the case of multi-exposure at sub-lethal dose. Fig.3 presents the logarithmic reduction obtained for the Wild type (WT) in comparison with the reduction of bacteria which had been irradiated at sub-lethal dose before ($n+x$). The letter x means the number of time that the solution had been exposed at sub-lethal dose before the treatment apply. The WT and the $n+x$ had been placed under the electron beam at the same moment to ensure the same energy deposition between the reference and the assay. The results showed no difference of efficiency after 10 times of treatment. Pulsed electron beams do not induce resistance on *Bacillus pumilus* spores.

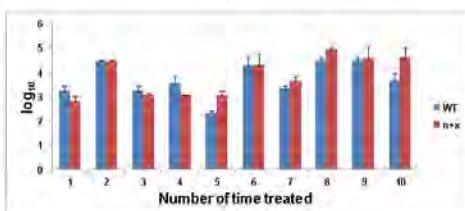


Fig. 3. Treatment at sub-lethal dose not induced resistance. Comparison of the inactivation rate after 10 pulses at 7 centimeters and a repetition frequency of 100Hz between bacteria which never see any irradiation treatment (WT) and bacteria which was treated x time(s) at sublethal dose ($n+x$).

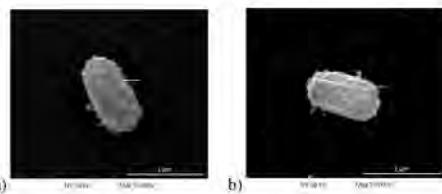


Fig. 4. Observation of *Bacillus pumilus* spores wall by SEM. The comparison of the non-treated spore (a) with the spore irradiated (b) did not reveal difference. Ridges (indicated with white arrows) were present for the two conditions.

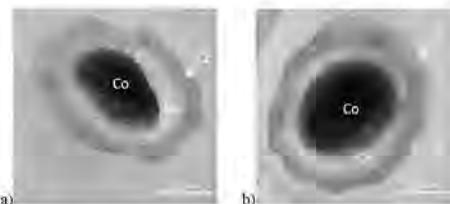


Fig. 5. Observation of *Bacillus pumilus* spores wall by TEM. The comparison of the non-treated spore (a) with the spore irradiated (b) did not reveal difference. The coat (Ct), the cortex (Cx) and the core (Co) are observable. The different layer of the coat are present in all case.

Spores were observed by SEM (Fig. 4) and TEM (Fig. 5). Ridges can be observed at the surface of non-treated and treated bacteria and none difference was observed. To validate these observations, we performed TEM experiments. Indeed, the structure of the coat (Ct), the cortex (Cx) or the core (Co) can be observed and perfectly distinguished. The protein multilayers of the coat, the cortex and the core were present and do not seem altered after irradiation.

IV. DISCUSSION

Pulsed electron beam, is an efficient irradiation technology to kill bacteria even under spore form. *Bacillus pumilus* appears to be the most resistant bacteria, as previously described by U.S. Pharmacopeia. Moreover, experiments do not reveal an evolution of the resistance after 10 treatments under lethal dose. However, SEM and TEM, do not reveal any changes in the cell wall and organization after irradiation. These results are in contradiction with S.E. Fieste which shown damage on the spore coat by MEB [6]. The hypothesis is that, our technology uses high dose rate and could interact with molecules and cell wall differently. Consequently, to complete the cell wall analysis, Atomic Force Microscopy (AFM) on liquid medium will be used to measure, in living

condition and at the nanoscale, the structural organization and the mechanical properties of the cell wall after irradiation [11].

In other way, some scientists supposed that electron beam induced double strand break on DNA [5] [12] [13]. To validate this hypothesis on our technology, Pulsed Field Gel Electrophoresis (PFGE) will be used.

Acknowledgment

I thank all my colleagues from the ITHPP Company for their help to understand the technology and the members of M-P. Rols team for their scientific help, explanation and for their availabilities.

To finish, I thank CMEAB platform for their technical support and explanation for electron microscopy experiments.

References

- [1] A. Parisi, and A. D. Antoine, "Increased Radiation Resistance of Vegetative *Bacillus Pumilus*," *Applied Microbiology* 28, no. 1 (1974): 41-46.
- [2] D. A. Cleghorn, J. Dunn, and S. V. Nablo, "Sterilization of Plastic Containers Using Electron Beam Irradiation Directed through the Opening," *Journal of Applied Microbiology* 93, no. 6 (2002): 937-43.
- [3] L. Lewanduski, and J. Jaczynski, "Increased Resistance of *Escherichia Coli* O157:H7 to Electron Beam Following Repetitive Irradiation at Sub-Lethal Doses," *International Journal of Food Microbiology* 121, no. 3 (February 10, 2008): 328-34.
- [4] A. T. Tesfai, S. K. Beamer, K. E. Mataik, and J. Jaczynski, "Radioresistance development of DNA repair deficient *Escherichia coli* DH5 α in ground beef subjected to electron beam at sub-lethal doses," *International Journal of Radiation Biology* 83, no. 6 (2011): 571-578.
- [5] P.R. Chalise, E. Hotta, K.E. Mataik, and J. Jaczynski, "Inactivation Kinetics of *Escherichia Coli* by Pulsed Electron Beam," *Journal of Food Science* 72, no. 7 (2007): M280-85.
- [6] S.E. Fiest, S. L. Helfinstine, J.C. Redfearn, R.M. Uribe, and C.J. Woolverton, "Electron Beam Irradiation Dose Dependently Damages the *Bacillus* Spore Coat and Spore Membrane," *International Journal of Microbiology* 2012, (2012): 1-9.
- [7] M.J. Leggett, "Bacterial spore structures and their protective role in biocide resistance," *Journal of Applied Microbiology*, (2012) 485-498
- [8] P. Setlow, "Spores of *Bacillus subtilis*: their resistance to and killing by radiation, heat and chemicals," *Journal of Applied Microbiology* 101, (2006) 514-525.
- [9] P. Setlow, "I will survive: protecting and repairing spore DNA," *J Bacteriol* 174, (1992) 2737-2741.
- [10] J. Errington, "Regulation of endospore formation in *Bacillus subtilis*," *Nature Reviews Microbiology* 1, (2003) 117-26
- [11] E. Dague, D. Alsteens, J-P. Largé, C. Verbeelen, D. Raze, A. R. Baulard, and Y. P. Duffrêne, "Chemical Force Microscopy of Single Live Cells," *Nano Letters* 7, no. 10, (2007): 3026-3030
- [12] H. Zhu, JZ Xu, SQ Li, XY Sun, SD Yao, and SL Wang, "Effects of High-Energy-Pulse-Electron Beam Radiation on Biomacromolecules," *Science in China Series B: Chemistry* 51, no. 1 (January 2008): 86-91.
- [13] E. Urgiles, J. Wilcox, O. Montes, S. Osman, K. Venkateswaran, M. Cepeda, J. Maxim, L. Braby, and S. D. Pillai, "Electron Beam Irradiation for Microbial Reduction on Spacecraft Components," *In Aerospace Conference*, 1-15. IEEE, 2007.

Annexe 2 : Liste des protéines sous-exprimées chez *Bacillus pumilus* après le traitement par le faisceau d'électrons

Critère	Nombre de protéines quantifiées	Numéro d'accession au gène	Nom du gène
T/E	7	A0A0C2PH04 A0A1A6I328 A0A1A6I162 A0A0C2TLC7 A0A0C2PU23 A0A063YYM6 A8FEF8	ilvC leuA prsA BAY68_09315 BAY68_09310 B4107_2822 BPUM_1955
E absent	2	B4AGA6 A0A0K0I3H3	BAT_0417 B4107_0407

Annexe 3 : Liste des protéines surexprimées chez *Bacillus pumilus* après le traitement par le faisceau d'électrons

Critère	Nombre de protéines quantifiées	Numéro d'accession au gène	Nom du gène
E/T	4	A0A1Q9BAB3 B4AIB5 A0A1A6I0X7 A0A0K6K7Y5	ldh_1 BAT_3529 BAY68_14355 pdxS
T absent	1	A0A0H1RWK1	XJ18_10475

* Pour un même nom de gène, il peut y avoir différents numéros d'accession si les souches dans lequel le gène est retrouvé sont différentes.

Annexe 4 : Liste des protéines sous-exprimées chez les spores de *Bacillus pumilus* après le traitement par le faisceau d'électrons

Critère	Nombre de protéines quantifiées	Numéro d'accession au gène	Nom du gène
T/E	2	A0A063Z0S0 A0A1A6I8N1	BAY68_17935 BAY68_17310
E absent	4	A0A0H1S8G9 A0A0K0I1A8 A0A063Z353 A8FHT1	XJ18_02050 B4107_2672 sucD BPUM_3144

Annexe 5 : Liste des protéines surexprimées chez les spores de *Bacillus pumilus* après le traitement par le faisceau d'électrons

Critère	Nombre de protéines quantifiées	Numéro d'accession au gène	Nom du gène
E/T	8	A0A0C2SW34 A0A0H1RSS9 B4AE78 A0A0K0I143 A0A0H1RTF8 RSGA A0A0H1RX31 A0A0K0I204	fumC XJ18_16340 ileS B4107_3489 ppnK rsgA secD B4107_0322
T absent	0		

Annexe 6 : Publication 'Electrical discharges in water induce spores' DNA damage'



RESEARCH ARTICLE

Electrical discharges in water induce spores' DNA damage

Camille Lamarche^{1,2*}, Charlotte Da Silva^{2*}, Gauthier Demol¹, Etienne Dague³, Marie-Pierre Rols^{2*}, Flavien Pillet²

1 ITHPP-Alcen, Hameau de Drèle, Thégra, France, **2** Institut de Pharmacologie et Biologie Structurale, IPBS, Université de Toulouse, CNRS, UPS, Toulouse, France, **3** LAAS-CNRS, Université de Toulouse, CNRS, Toulouse, France



OPEN ACCESS

Citation: Lamarche C, Da Silva C, Demol G, Dague E, Rols M-P, Pillet F (2018) Electrical discharges in water induce spores' DNA damage. PLoS ONE 13(8): e0201448. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0201448>

Editor: Peter Setlow, University of Connecticut, UNITED STATES

Received: September 28, 2017

Accepted: July 15, 2018

Published: August 13, 2018

Copyright: © 2018 Lamarche et al. This is an open access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

Data Availability Statement: All relevant data are within the paper and its Supporting Information files.

Funding: The authors received no specific funding for this work.

Competing interests: The authors have declared that no competing interests exist.

Abbreviations: 64PP, (6-4)-PhotoProduct; AFM, Atomic Force Microscopy; CPD, Cyclobutane Pyrimidine Dimer; DPA, DiPicolinic Acid; PCA, Plate Count Agar; PEF, Pulsed Electric Field; PFGE,

Abstract

Bacterial spores are one of the most resilient life forms on earth and are involved in many human diseases, such as infectious diarrhea, fatal paralytic illnesses and respiratory infections. Here, we investigated the mechanisms involved in the death of *Bacillus pumilus* spores after exposure to electric arcs in water. Cutting-edge microscopies at the nanoscale did not reveal any structural disorganization of spores exposed to electric arcs. This result suggested the absence of physical destruction by a propagating shock wave or an exposure to an electric field. However, Pulsed-Field Gel Electrophoresis (PFGE) revealed genomic DNA damage induced by UV radiation and Reactive Oxygen Species (ROS). UV induced single-strand DNA breaks and thymine dimers while ROS were mainly involved in base excision. Our findings revealed a correlation between DNA damage and the treatment of spores with electrical discharges.

Introduction

Since their discovery by Koch in 1884 [1], pathogenic spores have been identified as responsible for many diseases, such as lethal respiratory infections [2,3], fatal paralytic illnesses (botulism) [4,5] and infectious diarrhea. Within this context, spore inactivation raises a grave issue to human health. The major obstacle is the extraordinary resistance of spores to chemical, environmental and physical stresses. Dormant spores are able to survive in space [6] and during geological time spans [7]. Such resistance can be explained by the presence, inside the core, of α/β -type small, acid-soluble spore proteins (SASPs). These proteins saturate DNA which adopts an A-like conformation. The consequence is the creation of a thymidyl-thymidine adduct termed spore photoproduct (SP) under UV radiation (254 nm) instead of cyclobutane pyrimidine dimers (CPDs) and (6-4)-photoproducts (64PPs). Furthermore, the presence of a high level of Ca^{2+} -dipicolinic acid (DPA) is responsible for the lack of metabolism and the low amount of water in the spore's core. Consequently, a low amount of reactive oxygen species can be generated [8,9]. These two components thus play a major role in DNA protection against UV radiation and oxidizing radicals. The extreme resistance of spores is also supported

Pulsed-Field Gel Electrophoresis; ROS, Reactive Oxygen Species; SASPs, Small, Acid-Soluble spore Proteins; SEM, Scanning Electron Microscopy; SP, Spore Photoproduct; TEM, Transmission Electron Microscopy.

by the spores' outer layers. In effect, the latter consists of a highly impermeable inner membrane, a peptidoglycan cortex, an outer membrane and a protein coat [10].

Within this context, spore inactivation is a huge challenge and different strategies have been developed for spore inactivation. Decontamination of water commonly uses chemical compounds, such as calcium hypochlorite and chlorine dioxide [11]. However, these chemical compounds are unsafe and require special handling. Therefore, other strategies should be investigated.

Electric arc technology seems to be a promising alternative for spore killing. During the exposure to electric arcs, many phenomena may be involved in bacterial death: ultraviolet (UV) radiation [12], oxidative stress [13], shock waves [14] and electric field [15]. The main phenomena which inactivate bacteria are UV radiation and oxidizing radicals [16,17]. UV radiation are known to induce strand breaks and pyrimidine dimers in *Bacillus subtilis* spore DNA [18]. Hydrogen peroxide induces a lack of metabolism during spore germination [19,20]. While, shock waves and electric field disorganize the spore structure [21]. However, the relative importance of each phenomenon during spore inactivation by electric arcs remains undescribed.

For this, we focused on the DNA integrity and the spore structure after the exposure to electric arcs in water. Genomic DNA integrity was evaluated by Pulsed-Field Gel Electrophoresis (PFGE) and endonucleases digestions. Spore structure integrity was addressed at the nanoscale by cutting-edge electron microscopies and multiparametric Atomic Force Microscopy (AFM) in living conditions [22,23]. Our results revealed the absence of physical damage including morphology and roughness. By contrast, we observed the presence of DNA damage due to UV radiation and the production of Reactive Oxygen Species (ROS).

Material and methods

Growth conditions and sporulation

The *Bacillus pumilus* strain (ATCC 27142), a non-pathogenic model for radiation treatment [24,25], was used for this work.

For the vegetative experiment, two Petri dishes were spread with 100 μ L of *Bacillus pumilus* suspension and placed for 16 h at 37°C. To pick up bacteria, 1 mL of distilled water was put on Petri dishes. This action was repeated four times per dish.

To obtain spores, vegetative bacteria were cultivated overnight at 37°C in Luria broth (Sigma-Aldrich, France). Afterwards, to induce sporulation, the cultivated vegetative bacteria were diluted by a factor of 1:1000 times in Difco Sporulation Medium [26] and incubated at 37°C for 5 days under an agitation rate of 200 rpm. To kill the residual vegetative bacteria, the culture was incubated at 80°C for 20 min. Spore suspension was collected after multiple cycles of centrifugation (10,000 \times g, 5 min) and kept in deionized water at 4°C prior to the experiment. Spore preparations consisted of single spores (>97%), as observed by phase-contrast microscopy.

Electric arcs exposure

Vegetative bacteria were diluted at $0D_{600nm} = 0.02$ and spores at $0D_{600nm} = 0.05$ in the 8 liters of the solution exposed.

The electric arcs in water were obtained by high voltage discharges delivered by a Marx generator. The principle of electric arcs generation is described in S1 Fig. The parameters used in this experiment were a discharged voltage of 95 kV with a pulse repetition frequency of 10 Hz. Every 0.1 s, a damped signal with a period of 3.3 μ s and a total duration of 30 μ s was produced.

Evaluation of the inactivation rate

Following electric arcs exposure, spores were diluted, spread on Plate Count Agar (PCA) medium and incubated overnight at 37°C. The Eq (1) was used to determine the inactivation rate.

$$IR = \log 10 \left(\frac{N_0}{N} \right) \quad (1)$$

IR inactivation rate

N_0 initial microbial concentration

N number of survivors after the treatment

For each condition tested, 3 independent experiments were carried out with a total of 9 Petri dishes per analysis.

Evaluation of Reactive Oxygen Species (ROS) effect

To neutralize the effects of the ROS formation during electric arcs exposure, 1 mM of pyruvate (Sigma-Aldrich, France) was added in the solution. Pyruvate is known to induce a passive protection against ROS [27]. Three independent experiments were carried out.

Evaluation of UVs effect

To quantify the number of photons emitted from the electrical discharges, we used a chemical actinometer (potassium ferrioxalate), a photon-sensitive compound.

A spectrophotometer cuvette (38.5 mm x 1 mm x 1 mm) was placed above the electrode at 115.89 mm. The optical depth of this actinometer is approximately 2 cm. Consequently, as the photon going through the cuvette had a path of 1 cm, aluminum paper was placed on the other side to reflect UV rays. For each experiment, 40 µL of 6 mM potassium ferrioxalate was pipetted on the Quartz spectrophotometer cuvette and added to 40 µL of 0.1% (w/v) 1,10-phenanthroline, 20 µL of sodium acetate buffer (0.5 M acetate sodium with 0.0375% (w/v) 1,10-phenanthroline and 900 µL of distilled water. After 30 minutes at room temperature, the OD_{510nm} was measured. The blank was made with a sample not submitted to the electrical treatment. The number of pulses used was: 100, 250, 400 and 500 pulses at 10 Hz. The quantity of Fe²⁺ produced was calculated from the graph obtained with Fe(SO₄)₂(NH₄)₂. It was determined that 4.1×10^{-7} moles of ferrous iron in 3.6 mL test solution produced an absorbance of 1.0 at 510 nm in a 1 cm optical path. Because of the surface of Quartz cuvette crossed by the photon (385 mm²) and the distance from the electrical discharge (115.89 mm), the fraction of photons absorbed by the cuvette was 1:110 in comparison to the total amount of light produced. To calculate the photons from the Fe²⁺ production, a quantum yield of 1.26 was used [12,28]. The relation found to define the number of photons produced in function of the absorbance measured at 510 nm was the following for A = 1.0:

$$(4.1 \times 10^{-7}) N_A \frac{110}{1.26} = 2.1 \times 10^{19} \text{ photons} \quad (2)$$

N_A the Avogadro's number.

The number of photons created in function of the number of electric arcs was shown in (S2 Fig). In a second experiment, 3.6 mL of spore suspension with an OD_{600 nm} = 0.05 were placed in a Quartz vessel in order to fill the cuvette. After each set of pulses, the distilled water present in the vessel was changed in order to avoid the accumulation of metallic particles that come from electrodes erosion. Three independent experiments were carried out.

Electron microscopy experiments

In order to observe cell damage by electron microscopy, spores were fixed with 2% of glutaraldehyde in 0.1 M Sorensen phosphate buffer at pH 7.2. The samples were processed by the CMEAB platform (Toulouse, France). For Scanning Electron Microscopy (SEM), images were visualized with an electron microscope Quanta[®] 250 FEG (FEI, USA) at an accelerating voltage of 15 kV. For Transmission Electron Microscopy (TEM), images were collected with an HT[®] 7700 (Hitachi, USA) at 80 kV.

AFM experiments

Spores were immobilized for 1 h on a glass slide functionalized with polyethylenimine (Sigma-Aldrich, France) as described previously [29]. Spores were kept under 4.1 mM NaCl during the experiments. AFM measurements were performed in liquid using the Quantitative Imaging mode [22] with a Nanowizard III (JPK Instruments, Germany) and MLCT cantilevers (Bruker, Germany) with a measured spring constant at around 0.5 N/m and a force applied of 10 nN.

Statistical analysis

The Student's t-test was used to perform statistical analysis.

DNA analysis

Spore decoating. Spore coat removal was performed from 1 mL of irradiated or control suspensions at OD_{600nm} of ~ 10, as previously described in the literature [30,31]. Briefly, after centrifugation for 5 min at 12,000 × g, the pellets were resuspended twice in 500 μL of fresh decoating solution (50 mM Tris-HCl [pH 8]; 8 M urea; 50 mM dithiothreitol; 1% sodium dodecylsulfate; 10 mM EDTA) and incubated for 45 min at 37°C. The decoated spores were washed 5 times in 1 mL TES buffer (10 mM Tris-HCl [pH 8]; 10 mM EDTA; 150 mM NaCl).

DNA extraction. Chromosomal DNA was extracted with a modified protocol from Otlewska *et al.* [32]. The decoated spore suspensions were adjusted to OD_{600nm} of 3 in 1 mL of TES buffer, centrifuged and resuspended in 200 μL of lysis buffer (50 mM Tris-HCl [pH 8]; 50 mM EDTA [pH 8]; 0.5% Tween 20; 0.5% Triton X-100) containing 4 mg/mL lysozyme (Sigma-Aldrich, France) and 0.4 mg/mL RNase A (Euromedex, France). An equal volume of 2% CleanCut Agarose (Bio-Rad, France) was immediately added to the mixture and 90 μL were dispensed into a plug mold (Bio-Rad). After solidification, the plugs were incubated in 1 mL lysis buffer containing 2 mg/mL lysozyme and 0.2 mg/mL RNase A at 37°C for 2 h. The plugs were then rinsed with 1 mL TE buffer (10 mM Tris-HCl; 1 mM EDTA; pH 8) and incubated overnight at 50°C in 1 mL lysis buffer supplemented with 1 mg/mL proteinase K (Promega, France) and 350 μL deproteinization buffer (3 M guanidine HCl; 20% Tween 20). The plugs were washed once in TE buffer at room temperature, once in TE buffer containing 1 mM Pefabloc SC (Roche, France) at 37°C and twice in TE buffer at room temperature, for 1 h each.

Detection of base excisions and pyrimidine dimers. For each condition, a plug slice of 4 × 2 mm was equilibrated with 150 μL of the 1x endonuclease buffer, provided by the manufacturer, at 37°C for 30 min. To detect apurinic/apyrimidinic sites and pyrimidine dimers, DNA was digested respectively with 5 U of endonuclease IV or T4 endonuclease V (New England Biolabs, France), in 150 μL of fresh buffer for 1 h at 37°C.

PFGE analysis. The previous endonuclease-digested plugs were equilibrated with 150 μL of the 1x *NotI* buffer, provided by the manufacturer, for 30 min at 37°C. DNA was then digested with 15 U of *NotI* (Thermo Scientific, France) in 150 μL of fresh restriction buffer

overnight at 37°C. To detect single-strand breaks generated directly by electric arcs or following the endonuclease IV or T4 endonuclease V digestion, DNA was pre-incubated in 300 µL of the 1× S1 nuclease buffer for 30 min at 37°C and digested with 3 U of S1 nuclease (Thermo Scientific) in 300 µL of fresh buffer for 1 h at 37°C (S2 Fig). Plugs were washed 4 times in TE buffer for 30 min at room temperature. DNA fragments were separated on a 1% pulsed field certified agarose gel (Bio-Rad) in 0.5× TBE buffer (45 mM Tris base; 45 mM boric acid; 1 mM EDTA). Electrophoresis was carried out in a CHEF-DR III system (Bio-Rad) at 14°C for 18 h at 6V/cm with the pulse time increasing from 1 to 50 s and at an included angle of 120°. Lambda concatemers (48.5–1,000 kb; Bio Rad) were used as molecular weight standards. The gel was stained in 0.5 µg/mL ethidium bromide solution for 30 min, rinsed for 40 min in distilled water and revealed under UV illumination using the Gel Doc XR transilluminator (Bio-Rad).

Results

Electric arcs induce spore inactivation

Spores of *Bacillus pumilus*, at OD_{600nm} of 0.05 (10⁷ CFU/mL), were exposed to different number of pulses: 100, 250, 400 and 500 electric arc pulses at a repetition frequency of 10 Hz (Fig 1). The

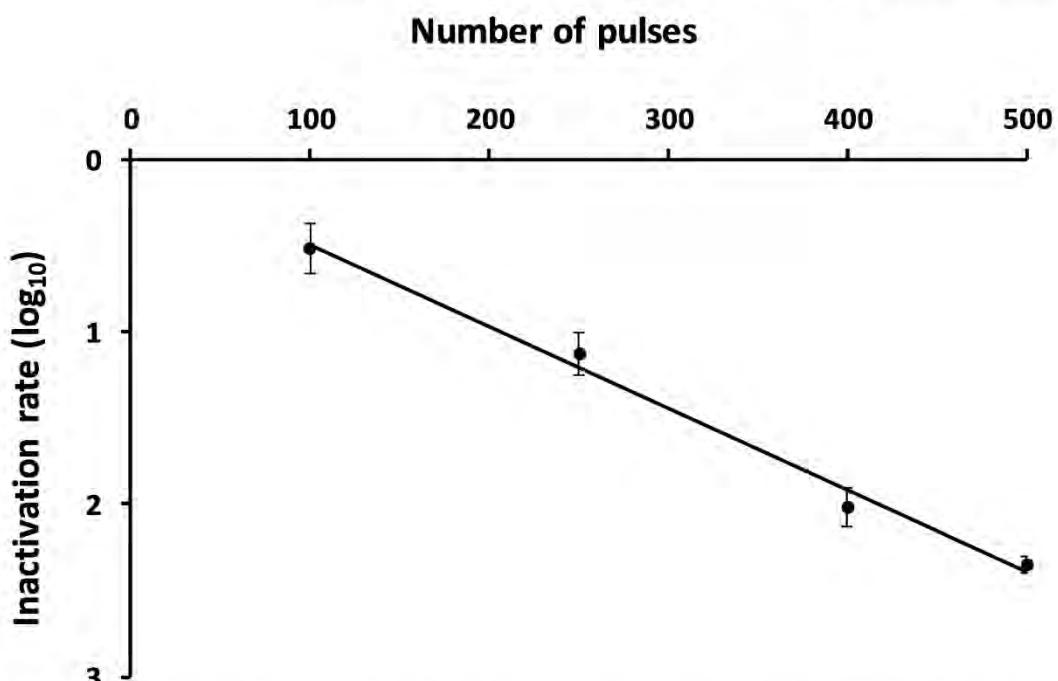


Fig 1. Influence of the number of electric arcs on spore inactivation. After 500 electric arc pulses, an inactivation rate of $2.2 \log_{10} \pm 0.2$ (99%) was found from 3 independent experiments.

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0201448.g001>

inactivation rate was determined from 3 independent experiments by colony counting calculated from untreated spores. In accordance with our objectives, an inactivation rate of $2.2 \log_{10} \pm 0.2$ (99%) was found in distilled water after 500 pulses. This result confirmed the efficiency of electric arcs to induce bacterial spore inactivation in water.

Spores of *Bacillus pumilus* were diluted in distilled water with 1 mM pyruvate at OD_{600nm} of 0.05 (10^7 CFU/mL) and exposed to 500 electric arcs at a repetition frequency of 10 Hz. It was shown that the efficiency of the treatment was decreased. In this condition, the inactivation rate was $1.78 \log_{10} \pm 0.2$ (98%) (S4 Fig). ROS play a role in spore inactivation.

Furthermore, spores of *Bacillus pumilus* were placed in a Quartz cuvette in order to isolate UV phenomena (without ROS, shock waves and electric field). After 500 electric arcs, an inactivation rate of $0.72 \log_{10} \pm 0.08$ (81%) was found (S4 Fig). UVs alone were also involved in spore inactivation.

Spore inactivation is not due to spore structure damage

The spore wall is crucial for the spore survival. Therefore, we decided to explore the integrity of the spore structure after exposure to electric arcs. We used different microscopy techniques such as Scanning Electron Microscopy (SEM), Transmission Electron Microscopy (TEM) and Atomic Force Microscopy (AFM) to get a global, local and biophysical picture of the bacterial interface. SEM gave information at the cell scale, while TEM made it possible to explore, in depth, the spore structure. Finally, AFM experiments, conducted in liquid, provided valuable data on the spores' outer layers (roughness, topography) and biophysical properties (rigidity, elasticity).

We first explored by SEM the global morphology of spores and the coat surface (Fig 2). Images showed homogenous populations in control condition (Fig 2a) and after exposure (Fig 2c). The calculated average volume was not statistically different with $0.20 \pm 0.03 \mu\text{m}^3$ for unexposed spores and $0.20 \pm 0.02 \mu\text{m}^3$ for treated spores (Fig 2e). The diagram in Fig 2f confirmed these observations, with a frequency distribution of spore volume similar in both conditions. Furthermore, high-resolution images in both conditions (Fig 2b and 2d) revealed the presence of nanostructures on the spore surfaces. These structures are classically described in the literature, as protein ridges present on the spore coat surface in *Bacillus* species [33]. All these results suggested a non-alteration of the spore morphology after eradication by electric arcs.

We then explored by TEM the entire spore structure (Fig 3). As expected for *Bacillus pumilus* spores [21], the coat, the cortex and the core were perfectly distinguished in untreated spores (Fig 3a). After electric arcs, the ultrastructure of spores was maintained (Fig 3b). These observations supported the hypothesis of a non-physical disruption of spore structure during inactivation by electric arcs. However, the structural organization of decoated spores were affected by electric arcs exposure (Data not shown). This result confirmed the importance of the coat in spore resistance. On the contrary, as TEM images revealed a cytoplasm content leakage, a loss of the cell wall integrity was suggested in vegetative bacteria after electric arcs treatment (S5 Fig).

AFM in liquid were performed to study the spore surface without chemical treatment or fixation, to preserve the integrity of the studied microorganism [23]. Examples of typical spores were imaged by AFM and shown in Fig 4. On the untreated spore (Fig 4a), the high resolution image revealed protein ridges, as previously described [21]. After electric arcs treatment (Fig 4b), the protein ridges were visible and confirmed the previous observations obtained by SEM. To quantify the surface roughness, 15 height AFM images of individual spores were analyzed for each condition. The roughness analyzed was $9 \pm 6 \text{ nm}$ for control

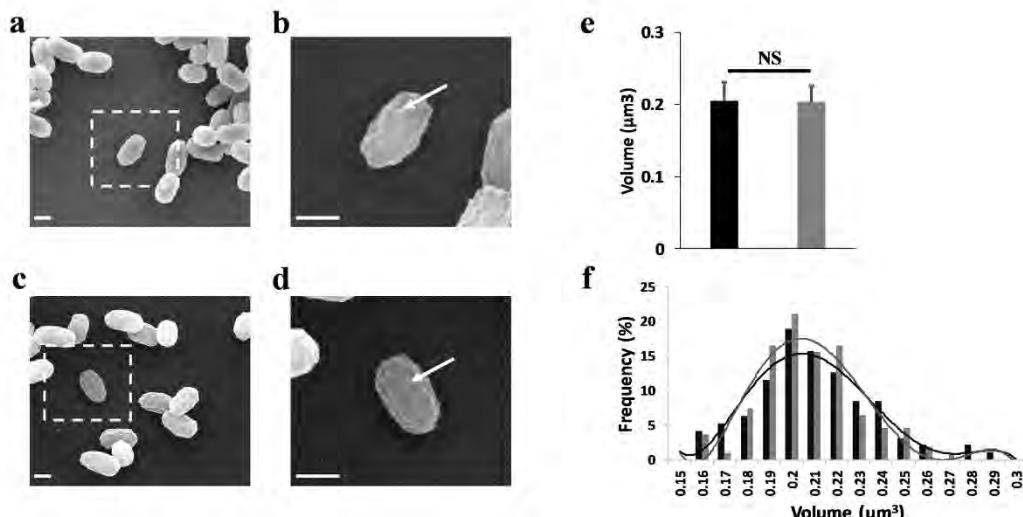


Fig 2. Electric arcs do not induce morphological damage on spores. (a) SEM image showing a population of untreated spores. Inset shows the location of a zoomed individual spore. (b) High resolution image of a control spore. The white arrow exhibited the protein ridges on spore coat surface. (c) Exposed spores visualized by SEM image after 500 electric arcs exposure. (d) High resolution image of an exposed spore. The electric arcs did not induce disruption of protein ridges (white arrow). Scale bars: 500 nm. (e) Statistical analysis of the spore volume. No variation was observed between untreated and exposed spores. (f) Frequency distribution of the volume of spores in control condition (black bars) and spores exposed (grey bars). Lines indicated the fitted gauss curves. The volumes were calculated from 100 spores in both conditions.

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0201448.g002>

spores and 7 ± 6 nm on treated spores. The statistical analysis revealed no significant differences. These results were correlated with electron microscopy and confirmed the non-disruption of the spores' outer layers during inactivation by electric arcs.

DNA damage were observed after electric arcs exposure

The integrity of chromosomal DNA was analyzed after electric arcs exposure by the use of PFGE (Fig 5). *NotI*-digested fragments (double-stranded) of chromosomal DNA were extracted from *B. pumilus* spores and analyzed after migration by PFGE. In order to identify DNA damage, various endonucleases were used. The endonuclease IV and T4 endonuclease V induce single-strand DNA break at the 5' apurinic/apyrimidinic sites and pyrimidine dimers, respectively. To quantify single-strand DNA breaks, the S1 endonuclease was used. This enzyme specifically cleaves single-stranded regions to form double-strand breaks which can be detected by PFGE [34–36].

We first evaluated the DNA damage induced by electric arcs exposure (Fig 5). In control condition, *NotI*-digested fragments were clearly distinguished (lane 1). Similar patterns were observed after incubation with the endonucleases S1, IV and V (lanes 2, 5, 6, 9 and 10). These results confirmed the absence of DNA damage for the unexposed spores. After electric arcs treatment, the migration of fragments was slowed down (lane 3). The S1 endonuclease induced the degradation of the *NotI*-digested fragments and the formation of a smear (lane 4) with a lower intensity of 75% (Fig 5b) for the higher fragment. These observations revealed the presence of single-strand DNA breaks. The incubations with the endonucleases IV and V without

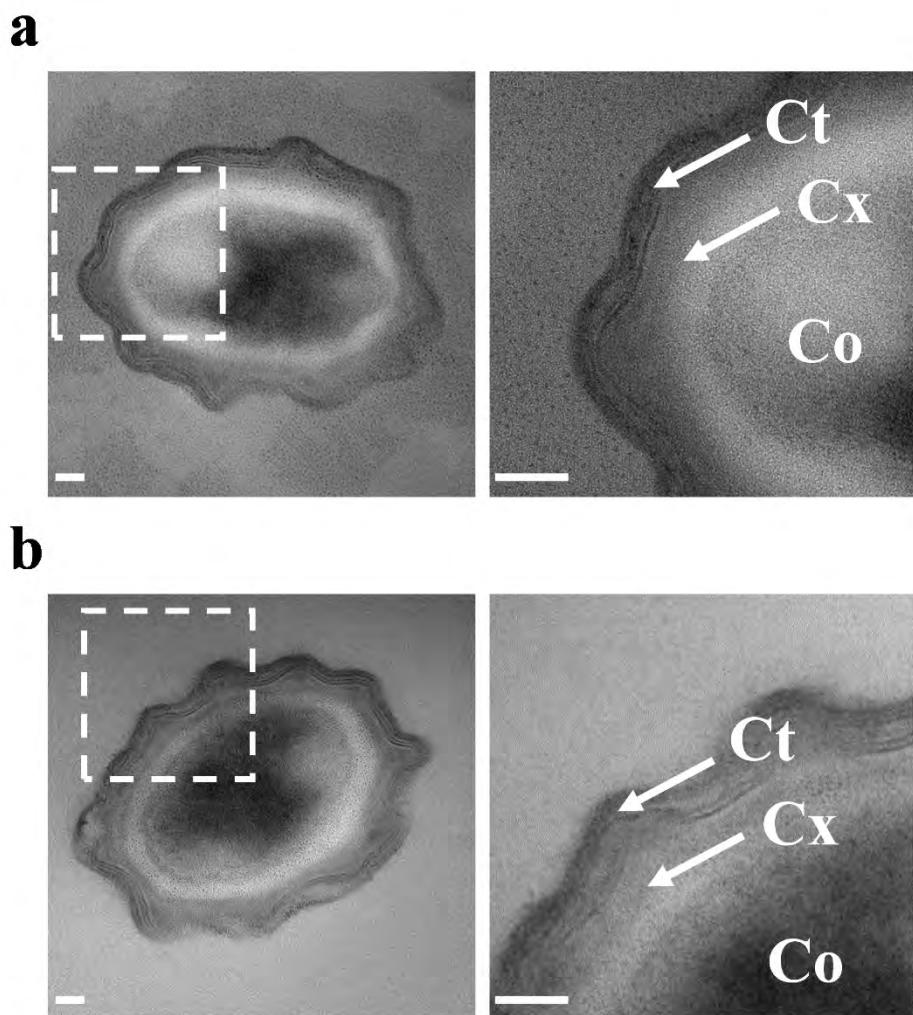


Fig 3. Electric arcs do not lead to the destruction of the spore structure. (a) Example of TEM image of an untreated spore. Inset revealed the structure of the spores at the nanoscale. The core (Co), the cortex (Cx) and the coat (Ct) are visualized. (b) TEM image of a typical spore exposed to electric arcs. The spore structure is similar to that of untreated spore. Scale bars: 50 nm. At least, 10 spores were imaged for each condition and one representative image was shown.

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0201448.g003>

S1 (lanes 7 and 11) were used as control and no significant degradation was observed. In presence of the S1 nuclease combined with the endonuclease IV, a large smear was observed (lane 8) with a loss of intensity of 85%. This result revealed the presence of bases excised during electric arcs exposure. After incubation with the S1 nuclease and the endonuclease V, the DNA

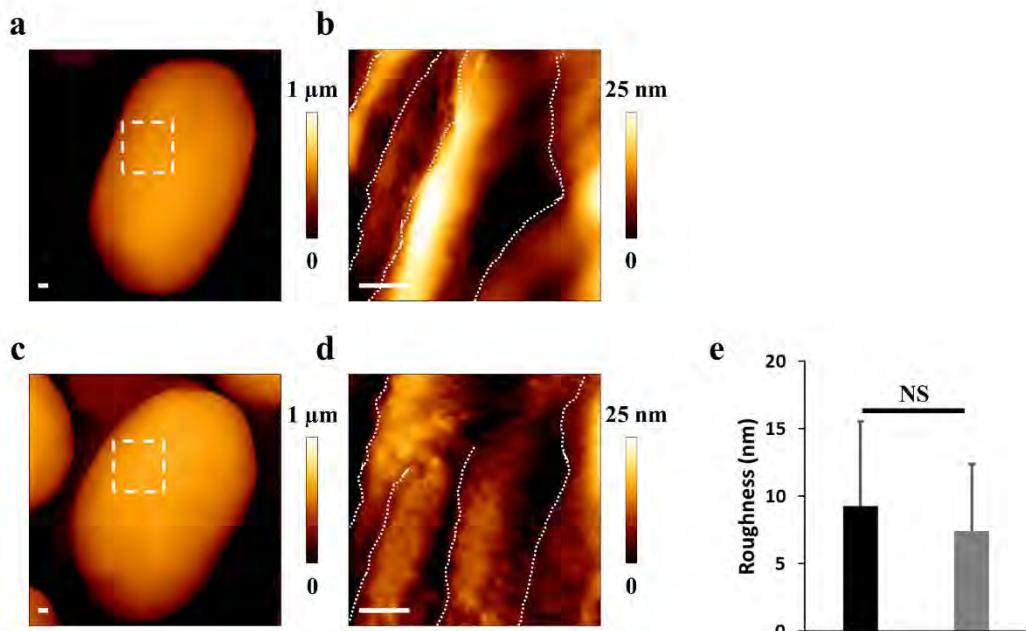


Fig 4. AFM in liquid does not reveal modification of volume and roughness. (a) Height AFM image of an untreated spore. Inset reveals the location of the zoomed section. (b) High resolution image exhibiting the protein ridges on the surface (white dotted lines). (c) Example of an exposed spore. (d) The spore surface was similar to the control spore. Scale bars: 100 nm. (e) Statistical analysis of the roughness performed from 15 spores in each condition. The roughness was comparable in both conditions.

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0201448.g004>

fragments were much more degraded (lane 12) with a loss of intensity of 93%. Thus, the presence of pyrimidine dimers was exhibited after electric arcs exposure.

Discussion

After electric arcs exposure, morphological imaging by SEM did not reveal any variation of spore size and the protein ridges remained intact on the coat surface. AFM in liquid validated these observations at the nanoscale and no variation of roughness was observed. TEM images confirmed the preservation of the spore structure and the visible integrity of the spores. These results demonstrated a non-physical destruction of spores at the nanometric scale by the electric arcs. In the literature, the shock waves are currently described as an efficient method to inactivate bacteria [37,38] by a mechanical disruption of the bacterial cell wall [14]. Furthermore, in a previous work we demonstrated that the disorganization of the spore structure is caused by Pulsed Electric Fields (PEF) [21]. Here, the absence of visible damage on the spore structure, suggested the non-implication of PEF during electric arcs exposure. In conclusion, the inactivation of spores during electric arcs treatment was not due to electric fields nor to shock waves. However, the possible presence of cell wall damage in vegetative bacteria suggested that more vulnerable microorganisms than spores could be impacted by electric fields and shock waves.

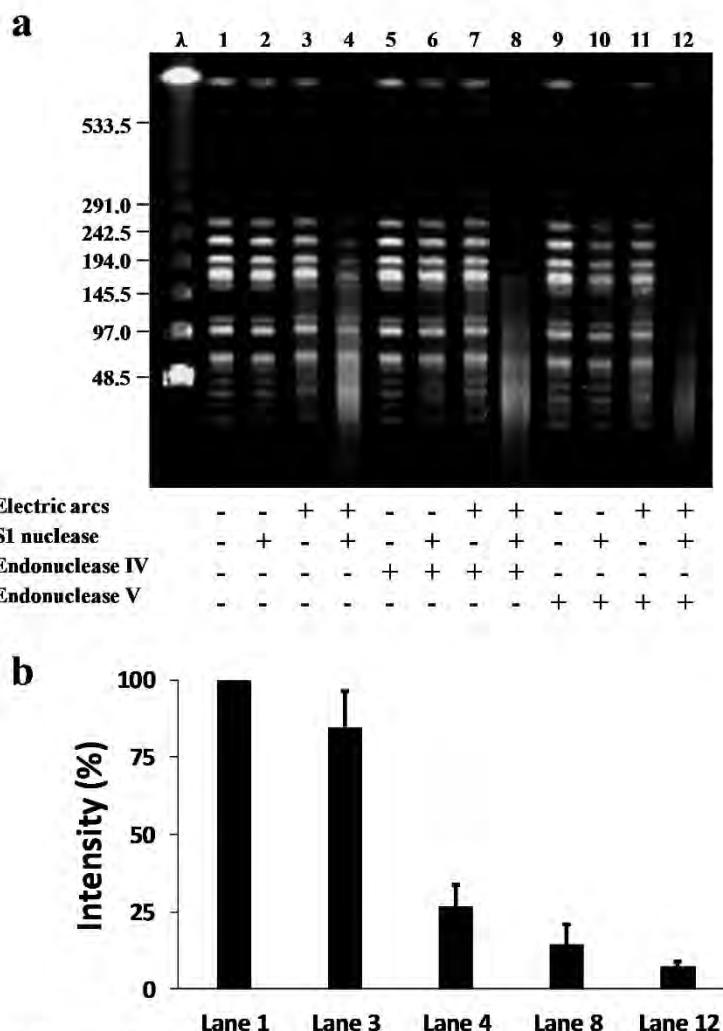


Fig 5. Electric arcs induce single-strand DNA breaks, base excisions and pyrimidines dimers. (a) Pulsed-Field Gel electrophoresis (PFGE) patterns of *NotI*-digested chromosomal DNA (double-strand) from *Bacillus pumilus* spores exposed (+) or not (-) to electric arcs. The DNA migration was observed with (+) and without (-) various endonuclease enzymes. The S1 nuclease cleaves the single-strand DNA; the endonuclease IV cleaves the apurinic/apyrimidinic sites; the endonuclease V cleaves the pyrimidine dimers. The size range of the standard Lambda Ladder is between 48.5 and 1000 kb. In absence of electric arcs (lanes 1, 2, 5, 6, 9, 11), DNA was intact. After electric arcs exposure; the migration of fragments was slowed down (lane 3); the S1 nuclease revealed single-strand DNA breaks (lane 4); the combination with the endonucleases S1 and IV exhibited base excisions (lane 8); the combination with the endonucleases S1 and V showed the presence of pyrimidine dimers (lane 12). (b) Example of quantification of the fluorescence intensity (in percentage compared to the control, lane 1) on the higher fragment (between 242.5 and 291 kb), calculated from 3 independent experiments. Lane 1: control; Lane 3: loss of intensity of 15% with electric arcs alone; Lane 4: loss of 75%.

with electric arcs and S1 nuclease; Lane 8: loss of 85% with electric arcs and S1 nuclease combined with endonuclease IV; Lane 12: loss of 93% with electric arcs and S1 nuclease combined with endonuclease V.

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0201448.g005>

In the absence of mechanical disruption of spores, the incidence of electric arcs on the chromosomal DNA was considered because we demonstrated an incidence of UVs and ROS in spore inactivation during electric arcs exposure. PFGE experiments revealed a high occurrence of single-strand DNA breaks, base excisions and pyrimidine dimers. Firstly, the abundance of the observed base excisions by PFGE suggested the production of ROS during electric arcs exposure. The ROS are classically considered as very efficient to kill microorganisms [13,39] by the production of DNA damage, including base modifications and DNA strand breaks [20,40]. The presence of base excisions after electric arcs exposure confirmed the role of ROS in base excisions. Secondly, UVs are known to induce mutagenic lesions in DNA, particularly DNA strand breaks and pyrimidine dimers [18]. The abundance of pyrimidine dimers after electric arcs exposure confirmed the implication of UV radiation in bacterial inactivation. In addition, the slow migration of DNA fragments may be explained by DNA bend induced by pyrimidine dimers [41].

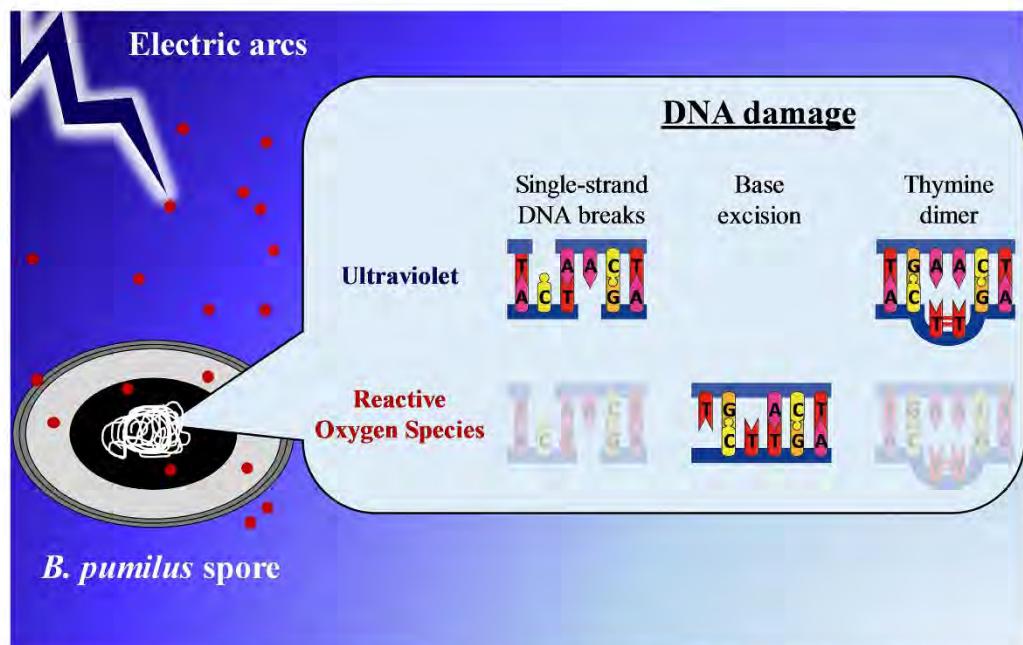


Fig 6. Schematic illustration of the phenomenon involved in spore inactivation during electric arcs exposure. The core contained DNA supercoiled, SASPs, water, dipicolinic acids and Ca^{2+} . The morphology and the spore structure were not affected during electric arcs exposure. Many DNA damage were observed after spore inactivation. UV radiation induced single-strand DNA breaks and pyrimidine dimers formation (thymine or cytosine dimers). Reactive Oxygen Species (ROS) were mainly implicated in base excision and moderately involved in single-strand DNA breaks and thymine dimer. Red dots represent ROS.

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0201448.g006>

Conclusion

To our knowledge, we are the first to explore the mechanisms of spore inactivation upon electric arcs exposure in water. This new and innovative technology to kill bacteria in suspension could be promising for the sterilization of cooling towers and canalizations. We used a multi-disciplinary approach to reveal the cause(s) of spore inactivation from the single-cell to the molecular level. We explored the spore structure by cutting-edge microscopies, as well as the integrity of the genomic DNA. We found that the inactivation is not due to physical damage caused by shock waves or electric field exposure but the consequence of molecular alterations. We demonstrated here chromosomal damage induced by electric arcs with a significant implication of UV and ROS phenomena (Fig 6). This work allowed to get access for the first time to the consequences of electric arcs exposure on spore structure and chromosomal DNA. For a complete understanding of the overall mechanisms involved, it would be interesting to explore the incidence of electric arcs on other biomolecules such as proteins.

Supporting information

S1 Fig. Principle of electric arcs generation. An increasing current is applied in water with an inter-electrode distance of 2 mm. The formation of electric arcs is initiated in three steps. (a) Thermal increase. At low current, the electric field induces a joule heating between the electrodes. (b) Bubble formation. When the voltage increases, a part of water is evaporated and some little bubbles appear. (c) Electric arc discharge. At 120 kV, the bubbles grow until became large enough to initiate breakdown and an electric arc between the electrodes. (DOCX)

S2 Fig. Evolution of the number of photons created in function of the number of pulses. This experiment was made in triplicate. (DOCX)

S3 Fig. Detection of single-strand breaks, base excisions and pyrimidine dimers damage. (a) Detection of single-strand breaks. At low concentration, the S1 nuclease specifically recognizes single-strand breaks and converts them into double-strand breaks. (b) Detection of base excisions. The endonuclease IV specifically recognizes the apurinic/apirimidinic sites (AP sites) and cleaves the phosphodiester bond in 5' to generate a single-strand DNA break. The S1 nuclease cleaves the single-stranded regions to form double-strand breaks. (c) Detection of pyrimidine dimers. The T4 endonuclease V has both activities. First, the enzyme recognizes pyrimidine dimers and cleaves the glycosyl bond at the 5' end of the damage. Second, the endonucleolytic activity cleaves the phosphodiester bond at the AP site to generate a single-strand break. The S1 nuclease cleaves the single-stranded sites to form double-strand breaks (DOCX)

S4 Fig. Effect of ROS and UV radiation on the *Bacillus pumilus* spores after 500 electric arcs exposure. After 500 arcs in distilled water, an inactivation rate of $2.2 \log_{10} \pm 0.2$ (99%) was observed (dark bar). In presence of 1 mM pyruvate to neutralize the ROS, an inactivation rate of $1.78 \log_{10} \pm 0.2$ (98%) was obtained (grey bar). In presence of UVs alone (without ROS, shock waves and electric field), the inactivation rate was $0.72 \log_{10} \pm 0.08$ (81%) (bar hachured). This experiment was made in triplicate. Statistical analysis were performed using the t-test ($^{***}P < 0.001$). (DOCX)

S5 Fig. Electric arcs induce cytoplasm leakage on vegetative bacteria *Bacillus pumilus*. The inactivation rate was $2.55 \log_{10}$ after 500 electric arcs. (a) TEM images showing example of

untreated vegetative bacteria. Cell wall (CW), plasma membrane (PM) and cytoplasm (Cy) were undamaged. (b) Vegetative bacteria were visualized after electric arcs exposure. The presence of inclusion bodies (IB) was a consequence of the cytoplasm content leakage probably due to a cell wall disturbance. Scale bars: 100 nm. At least, 10 cells were imaged for each condition and one representative image was shown. (DOCX)

Acknowledgments

We thank all members of the Marie-Pierre Rols' team and ITHPP-Alcen company for scientific and experimental assistance. We express gratitude to Barbara Setlow and Peter Setlow (UConn Health, Farmington, USA) for their advice on DNA extraction from spores and Laurent Paquereau, Vincent Ecochard and Sébastien Britton for helpful discussion on DNA analysis. We are grateful to Gaëtan Daulac for his help with the generator and to Anthony Coe, Jemma Coe and Caroline Glorie for their careful editing of the manuscript. We also wish to thank the CMEAB platform for their technical assistance in electron microscopy experiments.

Author Contributions

Conceptualization: Camille Lamarche, Charlotte Da Silva, Gauthier Demol, Etienne Dague, Marie-Pierre Rols, Flavien Pillet.

Data curation: Flavien Pillet.

Formal analysis: Charlotte Da Silva, Gauthier Demol, Etienne Dague.

Investigation: Charlotte Da Silva.

Methodology: Camille Lamarche, Charlotte Da Silva, Etienne Dague, Marie-Pierre Rols, Flavien Pillet.

Resources: Gauthier Demol, Etienne Dague.

Supervision: Gauthier Demol, Marie-Pierre Rols, Flavien Pillet.

Writing – original draft: Camille Lamarche, Charlotte Da Silva, Flavien Pillet.

Writing – review & editing: Camille Lamarche, Gauthier Demol, Etienne Dague, Marie-Pierre Rols, Flavien Pillet.

References

1. Löffler F. Vorlesungen über die geschichtliche Entwicklung der Lehre von den Bakterien. Zentralblatt der DDR; 1887. book.
2. Enticknap JB, Galbraith NS, Tomlinson AJH, Elias-Jones TF. Pulmonary Anthrax Caused by Contaminated Sacks. *Br J Ind Med*. 1968 Jan; 25(1):72–4. PMID: 4966788
3. Erickson MC, Kornack JL. *Bacillus anthracis*: current knowledge in relation to contamination of food. *J Food Prot*. 2003 Apr; 66(4):691–9. PMID: 12696699
4. Stringer SC, Webb MD, Peck MW. Lag time variability in individual spores of *Clostridium botulinum*. *Food Microbiol*. 2011 Apr; 28(2):228–35. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2010.03.003> PMID: 21315978
5. Graham R, Schwarze H, Boughton IB. The Relation of Contaminated Rations to the Presence of *C. botulinum* in the Milk of Lactating Animals. *Am J Public Health (N Y)*. 1922 Aug; 12(8):659–65.
6. Vaishampayan PA, Rabbow E, Horneck G, Venkateswaran KJ. Survival of *Bacillus pumilus* spores for a prolonged period of time in real space conditions. *Astrobiology*. 2012 May; 12(5):487–97. <https://doi.org/10.1089/ast.2011.0738> PMID: 22680694
7. Cano RJ, Borucki MK. Revival and identification of bacterial spores in 25- to 40-million-year-old Dominican amber. *Science*. 1995 May 19; 268(5213):1060–4. PMID: 7538699

8. Setlow P. Spores of *Bacillus subtilis*: their resistance to and killing by radiation, heat and chemicals. *Journal of Applied Microbiology*. 2006 Sep; 101(3):514–25. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2005.02736.x> PMID: 16907802
9. Setlow P. DNA in dormant spores of *Bacillus* species is in an A-like conformation. *Molecular microbiology*. 1992; 6(5):563–567. PMID: 1552855
10. McKenney PT, Dirks A, Eichenberger P. The *Bacillus subtilis* endospore: assembly and functions of the multilayered coat. *Nature Reviews Microbiology*. 2013 Jan 1; 11(1):33–44. <https://doi.org/10.1038/nrmicro2921> PMID: 23202530
11. Winward GP, Avery LM, Stephenson T, Jefferson B. Chlorine disinfection of grey water for reuse: effect of organics and particles. *Water Res*. 2008 Jan; 42(1–2):483–91. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2007.07.042> PMID: 17904612
12. Edébo L. Production of Photons in the Bactericidal Effect of Transient Electric Arcs in Aqueous Systems. *Appl Microbiol*. 1969 Jan; 17(1):48–53. PMID: 4886861
13. Vatansever F, de Melo WCMA, Avci P, Vecchio D, Sadasivam M, Gupta A, et al. Antimicrobial strategies centered around reactive oxygen species—bactericidal antibiotics, photodynamic therapy and beyond. *FEMS Microbiol Rev*. 2013 Nov; 37(6):955–89. <https://doi.org/10.1111/1574-6976.12026> PMID: 23802986
14. Lundbeck H, Sköldberg O. Effect of pressure waves on bacteria suspended in water. *Biotechnol Bioeng*. 1963 Sep 1; 5(3):167–84.
15. Marjanović I, Kotnik T. An experimental system for controlled exposure of biological samples to electrostatic discharges. *Bioelectrochemistry*. 2013 Dec; 94:79–86. <https://doi.org/10.1016/j.bioelechem.2013.09.001> PMID: 24076535
16. Ching W-K, Colussi AJ, Sun HJ, Nealson KH, Hoffmann MR. *Escherichia coli* disinfection by electrohydraulic discharges. *Environmental science & technology*. 2001; 35(20):4139–4144.
17. Dors M, Metel E, Mizeraczyk J, Marotta E. *Coli* bacteria inactivation by pulsed corona discharge in water. *Int J Plasma Environ Sci Technol*. 2008; 2(1):34–37.
18. Slieman TA, Nicholson WL. Artificial and Solar UV Radiation Induces Strand Breaks and Cyclobutane Pyrimidine Dimers in *Bacillus subtilis* Spore DNA. *Appl Environ Microbiol*. 2000 Jan 1; 66(1):199–205. PMID: 10618224
19. Melly E, Cowan A e, Setlow P. Studies on the mechanism of killing of *Bacillus subtilis* spores by hydrogen peroxide. *Journal of Applied Microbiology*. 2002 Aug 1; 93(2):316–25. PMID: 12147081
20. Setlow B, Setlow P. Binding of small, acid-soluble spore proteins to DNA plays a significant role in the resistance of *Bacillus subtilis* spores to hydrogen peroxide. *Appl Environ Microbiol*. 1993 Oct; 59(10):3418–23. PMID: 8250563
21. Pillet F, Formosa-Dague C, Baaziz H, Dague E, Rols M-P. Cell wall as a target for bacteria inactivation by pulsed electric fields. *Sci Rep*. 2016; 6:19778. <https://doi.org/10.1038/srep19778> PMID: 26830154
22. Chopinet L, Formosa C, Rols MP, Duval RE, Dague E. Imaging living cells surface and quantifying its properties at high resolution using AFM in QI™ mode. *Micron*. 2013 May; 48:26–33. <https://doi.org/10.1016/j.micron.2013.02.003> PMID: 23522742
23. Pillet F, Chopinet L, Formosa C, Dague E. Atomic Force Microscopy and pharmacology: from microbiology to cancerology. *Biochim Biophys Acta*. 2014 Mar; 1840(3):1028–50. <https://doi.org/10.1016/j.bbagen.2013.11.019> PMID: 24291690
24. Anon. Sterilization and sterility assurance of compendial articles. In: US Pharmacopeia. 23rd ed. 1995. p. 1976–8.
25. Cleghorn DA, Dunn J, Nabro SV. Sterilization of plastic containers using electron beam irradiation directed through the opening. *J Appl Microbiol*. 2002; 93(6):937–43. PMID: 12452949
26. Schaeffer P, Millet J, Aubert JP. Catabolic repression of bacterial sporulation. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1965 Sep; 54(3):704–11. PMID: 4956288
27. Troxell B, Zhang J-J, Bourret TJ, Zeng MY, Blum J, Gherardini F, et al. Pyruvate Protects Pathogenic Spirochetes from H2O2 Killing. *PLOS ONE*. 2014 Jan 2; 9(1):e84625. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0084625> PMID: 24392147
28. Björn LO. Photobiology: The Science of Life and Light. 2 edition. Springer; 2007. 684 p.
29. Formosa C, Grare M, Duval RE, Dague E. Nanoscale effects of antibiotics on *P. aeruginosa*. Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine. 2012 Jan; 8(1):12–6.
30. Douki T, Setlow B, Setlow P. Effects of the binding of alpha/beta-type small, acid-soluble spore proteins on the photochemistry of DNA in spores of *Bacillus subtilis* and *in vitro*. *Photochem Photobiol*. 2005 Feb; 81(1):163–9. PMID: 15458366
31. Dirks A, Setlow P, Setlow P. Morphogenesis and Properties of the Bacterial Spore. *2000 Jan 1*; 191–218.

32. Oliwka A, Oltuszak-Walczak E, Walczak P. Differentiation of strains from the *Bacillus cereus* group by RFLP-PFGE genomic fingerprinting. Electrophoresis. 2013 Nov; 34(20–21):3023–8. <https://doi.org/10.1002/elps.201300246> PMID: 23893780
33. Plomp M, Leighton TJ, Wheeler KE, Pitesky ME, Malkin AJ. *Bacillus atrophaeus* Outer Spore Coat Assembly and Ultrastructure. Langmuir. 2005 Nov 1; 21(23):10710–6. <https://doi.org/10.1021/la0517437> PMID: 16262341
34. Geigl E-M, Eckardt-Schupp F. Repair of gamma ray-induced S1 nuclease hypersensitive sites in yeast depends on homologous mitotic recombination and a RAD18-dependent function. Curr Genet. 1991 Jul 1; 20(1–2):33–7. PMID: 1934115
35. Ma W, Panduri V, Sterling JF, Van Houten B, Gordenin DA, Resnick MA. The Transition of Closely Opposed Lesions to Double-Strand Breaks during Long-Patch Base Excision Repair Is Prevented by the Coordinated Action of DNA Polymerase and Rad27/Fen1. Molecular and Cellular Biology. 2009 Mar 1; 29(5):1212–21. <https://doi.org/10.1128/MCB.01499-08> PMID: 19075004
36. Petersen S, Saretzki G, von Zglinicki T. Preferential Accumulation of Single-Stranded Regions in Telomeres of Human Fibroblasts. Experimental Cell Research. 1998 Feb; 239(1):152–60. PMID: 9511733
37. Roth CC, Barnes RA, Ibey BL, Beier HT, Christopher Mirmun L, Maswadi SM, et al. Characterization of Pressure Transients Generated by Nanosecond Electrical Pulse (nsEP) Exposure. Sci Rep. 2015 Oct 9; 5:15063. <https://doi.org/10.1038/srep15063> PMID: 26450165
38. Leighs JA, Appleby-Thomas GJ, Wood DC, Goff MJ, Hameed A, Hazell PJ. The bactericidal effect of shock waves. J Phys: Conf Ser. 2014; 500(18):182026.
39. Jeong J, Kim JY, Yoon J. The role of reactive oxygen species in the electrochemical inactivation of microorganisms. Environ Sci Technol. 2006 Oct 1; 40(19):6117–22. PMID: 17051809
40. Dizdaroglu M, Jaruga P, Birincioglu M, Rodriguez H. Free radical-induced damage to DNA: mechanisms and measurement1,2. Free Radical Biology and Medicine. 2002 Jun 1; 32(11):1102–15. PMID: 12031895
41. Husain I, Griffith J, Sancar A. Thymine dimers bend DNA. Proc Natl Acad Sci U S A. 1988 Apr; 85(8):2558–62. PMID: 3357882

Annexe 7 : Liste des protéines sous-exprimées chez *Bacillus pumilus*, d'après l'analyse quantitative à partir des protéines, après le traitement par décharges électriques

Nombre de protéines quantifiées	Numéro d'accession au gène	Nom du gène *
28	A0A1A6I6V5	BAY68_04785
	A8FCU3	BPUM_1377
	A0A1A6I772	BAY68_04840
	A0A1A6HZF7	BAY68_15305
	A0A0K0I334	B4107_1148
	A0A0H1RUJ1	XJ18_13085
	W8QTW7	BW16_04170
	A0A1A6I267	BAY68_11105
	W8QSM5	BW16_01730
	A8FCA1	BPUM_1184
	A0A1A6I8D4	fecE
	A0A0H1RVX9	XJ18_10440
	A0A1A6I8T1	BAY68_19065
	A0A0C2TRW4	B4107_0203
	A0A0H1RX21	XJ18_08675
	B4AFV6	BAT_3201
	A0A1A6I7D2	BAY68_18225
	W8QXK6	BW16_04590
	A0A063YYM6	B4107_2822
	METE	metE
	B4AEV7	metE
	A0A063Z9H9	BAY68_19060
	A0A0M2FX18	B4107_3496
	A0A1A6I9Y5	BAY68_16470
	A0A0H1RXR9	XJ18_07380
	B4AJK2	BAT_0894
	A0A0C2NP49	B4107_3610
	A0A0H1RVC0	XJ18_13250

Annexe 8 : Liste des protéines sous-exprimées chez *Bacillus pumilus*, d'après l'analyse quantitative à partir des peptides, après le traitement par décharges électriques

Critère	Nombre de protéines quantifiées	Numéro d'acquisition au gène	Nom du gène *
T/E	33	A0A0K0HYD0	B4107_1364
		A0A1A6I1E6	BAY68_12030
		B4AEV7	metE
		A8FCD2	metE
		A0A1A6I6V5	BAY68_04785
		W8QXK6	BW16_04590
		A0A1A6I322	BAY68_10115
		A0A0C2NP49	B4107_3610
		A0A1A6HZF7	BAY68_15305
		A0A096VLB7	Non renseigné
		A0A0M2FWJ2	B4107_3619
		A0A1Q9BCD7	carB_1
		A0A1Q9BBY6	blaSE
		A0A1A6I9Y5	BAY68_16470
		A0A1A6I7D2	BAY68_18225
		A0A0K0I334	B4107_1148
		A0A1A6IAD8	BAY68_15965
		A0A1A6I731	BAY68_04595
		A0A0C2TRW4	B4107_0203
		A0A1A6I200	BAY68_12970
		A0A1A6I392	BAY68_12765
		A0A0H1RU95	B4107_2708
		A8FCA1	BPUM_1184
		A0A1A6I267	BAY68_11105
		A8FG79	dbpA
		A0A1A6I772	BAY68_04840
		A0A0H1RY28	XJ18_08015
		W8QSM5	BW16_01730
		A0A1A6I2P0	BAY68_10780
		A0A063YYM6	B4107_2822
		A0A0K0I3H3	B4107_0407
		B4AEV0	BAT_2834
		A0A0H1RT71	XJ18_15550
E absent	18	A0A1A6I952	BAY68_01205
		A0A0M2FWZ0	argG
		A0A1A6HZF7	BAY68_15305
		B4AJK2	BAT_0894
		A0A0H1RVX9	XJ18_10440
		A0A1A6I9V7	pyrC

Critère	Nombre de protéines quantifiées	Numéro d'accession au gène	Nom du gène *
		A0A1A6I9Y5	BAY68_16470
		A0A1A6I8T1	BAY68_19065
		A0A0H1RYK8	argH
		A0A1A6I267	BAY68_11105
		B4ANI6	BAT_1692
		A0A0H1RUJ1	XJ18_13085
		A0A1A6I1B0	BAY68_11795
		A0A0H1S3Y9	XJ18_10000
		A0A0H1RXU1	XJ18_09570
		A0A1A6I8D4	fecE
		W8R513	BW16_18745
		A0A0K0I155	B4107_3132

* Pour un même nom de gène, il peut y avoir différents numéros d'accession si les souches dans lequel le gène est retrouvé sont différentes.

Annexe 9 : Liste des protéines surexprimées chez *Bacillus pumilus*, d'après l'analyse quantitative à partir des peptides, après le traitement par décharges électriques

Critère	Nombre de protéines quantifiées	Numéro d'accession au gène	Nom du gène
E/T	6	A0A1A6I7B5 A0A0C2SAJ2 A0A1A6I5N7 A8FE15 W8QWS8 W8RGB3	BAY68_04600 menB lipM BPUM_1811 BW16_09940 BW16_05840
T absent	4	A0A1A6I139 A8FE15 A0A0K0HYT3 A0A0H1S2A5	BAY68_14735 BPUM_1811 B4107_1853 XJ18_12945

Annexe 10 : Liste des protéines surexprimées chez les spores de *Bacillus pumilus*, d'après l'analyse quantitative à partir des protéines, après le traitement par décharges électriques

Nombre de protéines quantifiées	Numéro d'accession au gène	Nom du gène
18	W8QZJ8 A0A0H1RY15 A0A1A6I384 A0A1A6I5V3 A0A1A6I134 A0A0H1S1M0 A0A1A6I7L4 A8FFA2 A8FEZ2 A0A1A6I3Z0 AOA0K0I4E5 RL32 A0A1A6I0Y4 A0A0H1RUT4 A0A0H1S058 A0A0H1RTM1 A0A1Q9B561 W8QXPO	topA pepT hemC BAY68_08260 BAY68_13785 trmD ppaC BPUM_2250 BPUM_2140 BAY68_09795 B4107_0657 rpmF guaA XJ18_12735 XJ18_04920 XJ18_15735 BACPU_31170 glpK

Annexe 11 : Liste des protéines sous-exprimées chez les spores de *Bacillus pumilus*, d'après l'analyse quantitative à partir des peptides, après le traitement par décharges électriques

Critère	Nombre de protéines quantifiées	Numéro d'acquisition au gène	Nom du gène
T/E	17	B4AE09 W8QUS7 A0A1A6I7M2 A8F988 A0A1A6I6F0 A0A0H1RXC7 B4ANC6 B4AJK2 A0A0H1S2J3 A0A1Q9BBY6 A0A0H1RTD2 A0A063Z5T9 A0A063Z7H0 A0A0H1RZT1 W8QP50 A8FCK2 A0A0K0I2H0	hsIU BW16_06110 glmM rplB BAY68_03950 XJ18_08320 BAT_1756 BAT_0894 XJ18_00850 blaSE XJ18_14890 BAY68_06925 BAY68_07185 XJ18_04500 BW16_11095 BPUM_1286 B4107_2596
E absent	5	B4ANC6 A0A0H1S2J3 A0A1A6I2M8 A0A1A6I7Z5 A0A0H1RUT4	BAT_1756 XJ18_00850 BAY68_11670 BAY68_17100 XJ18_12735

Annexe 12 : Liste des protéines surexprimées chez les spores *Bacillus pumilus*, d'après l'analyse quantitative à partir des peptides, après le traitement par décharges électriques

Critère	Nombre de protéines quantifiées	Numéro d'accesion au gène	Nom du gène *
E/T	90	B4APD5 A0A0C2SS73 A0A1A6I5W2 A0A0K0I2G7 W8RIW8 A0A0M2FW48 A8FHT1 A0A1A6IA74 W8QN85 A0A1A6IA69 A0A0K0I4W2 A8F9E7 A8FC18 W8QXPO A0A063Z353 A0A0K0I1C9 A0A063Z1A9 A8FEF3 A0A1A6I5V3 A0A1A6I7L4 A0A1Q9B9A5 A0A0M2FX62 A0A0C2Q2U2 B4AN35 A0A1A6I2M2 A0A1A6I2P6 A0A1A6IC55 A8FDF9 A0A0C2TIG4 A0A063Z4D5 B4AME7 A0A0H1RRS4 A0A1A6I8G9 A0A1A6I384 B4AJ93 A8FEZ2 A0A1A6I5F3 A0A1A6I0Y4 A0A0H1RSU5	guaB rnj pyrG gcvPA B4107_2078 B4107_1667 BPUM_3144 nusA BW16_11265 ftsY B4107_0235 glmS BPUM_1101 glpK sucD B4107_2362 B4107_0753 BPUM_1950 BAY68_08260 ppaC tpiA fold B4107_0766 rpsG BAY68_14150 rph cinA BPUM_1594 B4107_1077 rimP dbpA XJ18_18350 BAY68_17845 hemC rpmE1 BPUM_2140 rpmG guaA gatB

Critère	Nombre de protéines quantifiées	Numéro d'accesion au gène	Nom du gène *
		A0A0M2FVL6	B4107_1616
		A8FFV9	clpX
		A8FCS4	BPUM_1358
		A8FD73	sucC
		A0A0C2P6U8	rnj
		A8FG78	nadK
		A0A1A6I7Q9	serS
		W8QZJ8	topA
		A0A0H1RZV3	tgl
		A8FGD6	BPUM_2645
		W8QUS7	BW16_06110
		A8FE79	BPUM_1876
		A0A0C2TS51	XJ18_13210
		A0A0H1RY15	pepT
		A0A1A6I7M2	glmM
		A0A0K0I229	B4107_3570
		A0A0C2PCA4	murA
		A0A1A6I960	BAY68_00530
		F6KSH9	gyrB
		A0A0K0HZ38	B4107_1606
		A0A0H1RZH4	XJ18_05375
		A0A0C2SPW1	B4107_3667
		A0A0C2SAJ2	menB
		A0A1A6I3D1	BAY68_10060
		A0A1A6I134	BAY68_13785
		A0A0H1S1H7	hprK
		A0A1A6I9N1	BAY68_00890
		A0A063Z2B1	BAY68_18260
		A0A0H1RUS3	XJ18_15310
		A0A0H1RUH1	B4107_2799
		A0A0H1RYK9	serC
		A0A0H1RY23	XJ18_07140
		A0A0H1S0P8	XJ18_15480
		A0A0K0HYK4	B4107_1344
		A0A1Q9B5Q1	serC
		A0A0K0HZ76	B4107_0544
		A0A1A6I6W5	BAY68_18620
		A0A0C2PKL3	B4107_2631
		A8FCZ4	BPUM_1428
		A0A1A6I7N5	fabZ
		A0A0K0I4E5	B4107_0657
		A0A0H1RS29	dltA
		A0A0H1RRX5	folE2
		A0A0H1S031	XJ18_02435

Critère	Nombre de protéines quantifiées	Numéro d'acquisition au gène	Nom du gène *
		A0A0K0I2U4 A0A0H1S2D3 A8FCA6 A0A0H1S1M0 A0A0H1RZ94 A0A0H1RTM1 A0A0H1S058	B4107_2805 XJ18_00305 BPUM_1189 Non renseigné Non renseigné Non renseigné Non renseigné
T absent	57	A8FD73 W8QVP6 B4AGR2 A0A1A6I5W2 A0A1A6I7Q9 A0A0M2FW48 B4ANL4 A0A0K0I4W2 B4ANFO A0A1A6I960 B4AJ54 A0A0H1S5F7 A0A063Z712 A0A063Z1A9 A0A0M2FXM5 A0A063Z8Z1 A0A063Z4V2 A0A1A6I952 A0A1A6I9J8 A0A0C2Q2U2 B4ALL4 A0A1A6I9D8 A8FH66 A0A1A6I208 A0A063Z2B1 A0A0H1S1I0 B4APC2 W8QTM7 A0A0C2NQT8 A0A1A6I1J6 A0A1A6I582 A0A063Z2D6 B4AEKO A0A1A6I8G9 A0A0H1RX95 A0A1A6I174 B4AL15	sucC gltX uvrA pyrG serS B4107_1667 BAT_1220 B4107_0235 dnaJ BAY68_00530 BAT_0741 sdhB BAY68_09150 B4107_0753 murC BAY68_03820 B4107_0840 BAY68_01205 radA B4107_0766 mtnN glsA BPUM_2929 proS BAY68_18260 XJ18_01130 BAT_4136 BW16_03495 ispG BAY68_10940 BAY68_07710 luxS BAT_2732 BAY68_17845 XJ18_08135 BAY68_13990 BAT_2197

Critère	Nombre de protéines quantifiées	Numéro d'accession au gène	Nom du gène *
		A0A0C2PKL3	B4107_2631
		B4AEN4	BAT_2767
		A0A063Z948	B4107_3463
		A0A1A6I2S3	thiG
		A0A1Q9B4N9	abrB
		A0A0H1RWE0	mnmA
		A0A1Q9BCH3	BACPU_08270
		A0A0K0I2U4	B4107_2805
		A0A0H1RYR5	XJ18_06415
		A0A0H1S114	XJ18_03550
		A0A0K0HXV0	B4107_1613
		A8FCW7	rpmF
		A0A1A6I857	BAY68_17995
		A0A0H1RT81	whiA
		A0A063Z3P9	B4107_0756
		A0A0C2TS92	nadK
		A0A0H1RXE6	purK
		A0A1Q9B4P3	BACPU_33510
		W8QS11	tilS
		A0A0K0I4K7	B4107_0710

* Pour un même nom de gène, il peut y avoir différents numéros d'accession si les souches dans lequel le gène est retrouvé sont différentes.

Annexe 13 : Définition des termes GO pour la localisation des protéines

Terme GO	Définition
cytoplasme	Tous les composants de la cellule en excluant la membrane plasmique.
membrane	Une double couche lipidique avec toutes les protéines et complexes protéiques en interaction avec elle.
membrane plasmique	La membrane délimitant la cellule de son environnement. Elle est constituée d'une double couche de phospholipides et de protéines associées.
composant intégral de la membrane	Les composants de la membrane composés des complexes protéiques ayant au moins une partie de leur séquence peptidique incorporée dans la région hydrophobe de la membrane.
complexe enzymatique du cycle de Krebs	Enzymes qui interviennent dans le cycle de Krebs.
intracellulaire	La matière contenue dans (mais ne l'incluant pas) la membrane cellulaire.
transporteur à ATP Binding cassette	Un complexe pour le transport de métabolites dans et en dehors de la cellule. Il est typiquement composé de quatre domaines : deux domaines associés à la membrane et deux domaines de liaison à l'ATP au niveau de la face interne de la membrane qui forment un pore central à niveau de la membrane cellulaire. Chez des bactéries, les transporteurs d'ABC incluent aussi les protéines de liaison au substrat pour lier le substrat présent dans le milieu extérieur au cytoplasme.
cellule	L'unité structurelle et fonctionnelle de base de tous les organismes. Inclut la membrane cellulaire et n'importe quelle structure encapsulante externe comme la paroi et l'enveloppe cellulaire.
complexe bêta-galactosidase	Un complexe de protéines qui possède une activité bêta-galactosidase, c'est-à-dire qui catalyse l'hydrolyse du beta-D-galactosides en beta-D-galactose.
intérieur de la bicouche lipidique	L'intérieur de la double couche lipidique d'une enveloppe, généralement très sélectif à la plupart des ions et métabolites.
ribosome	Organite intracellulaire composé d'ARN et de protéines. C'est le site de la biosynthèse des protéines résultant de la traduction de l'ARNm. Chez les bactéries, il est constitué de deux sous-unités, une grande (50 S) et une petite (30 S).
chromosome	Une structure composée d'une très longue molécule d'ADN et de protéines associées (par exemple des histones) qui porte des informations héréditaires.

Annexe 14 : Définition des termes GO pour les processus biologiques des protéines

Terme GO	Définition
aminoacylation des ARNt pour la synthèse des protéines	L'aminoacylation des ARNt pour la synthèse des protéines est une étape qui permet de fixer l'acide aminé sur son ARNt correspondant avant l'incorporation du complexe dans la grande sous-unité du ribosome pour la synthèse des protéines à partir de l'ARN messager.
assimilation des nitrates	Le processus métabolique de l'azote qui englobe l'assimilation du nitrate de l'environnement et la réduction de l'ammoniaque et qui aboutit à l'incorporation des dérivés azotés à partir du nitrate (NO_3^-) des substances cellulaires.
biosynthèse des acides aminés de la famille des aromatiques	Les réactions chimiques et les voies aboutissant à la formation d'acides aminés aromatiques (phénylalanine, tyrosine, tryptophane).
biosynthèse 'de novo' d'uridine monophosphate synthase (UMP)	Les réactions chimiques et les voies aboutissant à la formation d'UMP (uridine monophosphate) commençant par la synthèse du (S)-dihydroorotate à partir du bicarbonate. La biosynthèse de l'UMP peut se faire via la réduction par une quinone, NAD(+) ou l'oxygène.
biosynthèse des composés contenant de la porphyrine	Les réactions chimiques et les voies aboutissant à la formation de n'importe quel dérivé ou analogue de la porphyrine. Les porphyrines sont impliquées dans le transport du dioxygène ou la chaîne de transfert des électrons.
chaîne de transport d'électrons	Le processus dans lequel une série de transporteurs d'électrons opère ensemble pour transférer des électrons d'un donneur vers n'importe quel accepteur d'électrons pour générer un gradient électrochimique transmembranaire.
changement topologique de l'ADN	Le processus dans lequel une transformation est induite dans la structure topologique de la double hélice de l'ADN, aboutissant à un changement du nombre de liaisons. C'est un changement conformationnel.
ciblage des protéines	Le processus ciblant des protéines spécifiques dans des régions particulières de la cellule.

Terme GO	Définition
complexe phosphoenolpyruvate - sucre phosphotransférase (PTS)	Un système complexe, appelé phosphoénolpyruvate - sucre phosphotransférase (PEP-PTS, ou plus simplement PTS), assure la phosphorylation et le transport du sucre. Le système PTS fait intervenir plusieurs protéines et enzymes du cytoplasme et de la membrane bactérienne. Les composants cytoplasmiques sont non spécifiques et communs à tous les sucres transportés par le PTS. Parce qu'il possède une très haute affinité pour chacun des substrats, le PTS permet à la cellule bactérienne de s'approprier rapidement la moindre trace de sucre présent dans l'environnement. Ainsi, le PTS serait particulièrement efficace dans des conditions de pénurie de sucre. L'énergie nécessaire et le phosphate proviennent du phosphoénolpyruvate, un métabolite intermédiaire de la glycolyse.
cycle de Krebs	Le cycle de Krebs est situé à un carrefour des métabolismes glucidique, lipidique et protéique. Il permet de dégrader le glucose, les acides gras ou les protéines afin de produire de l'énergie sous forme d'ATP.
déphosphorylation des protéines	Le processus qui consiste à enlever un ou des résidus phosphoriques à une protéine.
élimination des radicaux superoxydes	N'importe quel processus, agissant au niveau cellulaire, impliqué dans la conversion des radicaux superoxydes (O_2^-) d'une cellule ou d'un organisme, par exemple par conversion en dioxygène (O_2) et en eau oxygénée (H_2O_2).
germination des spores	Les changements physiologiques et liés au développement qui surviennent depuis la sortie de la phase de dormance jusqu'aux tous premiers signes de croissance.
gluconéogenèse	La formation de glucose à partir de précurseurs non-glucides, comme le pyruvate, les acides aminés et le glycérol. Ce n'est pas l'inverse de la glycolyse car les voies biochimiques empruntées ne sont pas identiques.
glycolyse	Les réactions chimiques et les voies aboutissant à la dégradation du glucose en pyruvate, avec la production concomitante d'ATP et la réduction de NAD(P) en NAD(P)H. Le pyruvate peut être converti en acétyl-coenzyme A, en éthanol, en acide lactique.
hydrolyse de la liaison phosphodiester d'acide nucléique	Le processus métabolique des acides nucléiques dans lequel les liaisons phosphodiester entre les nucléotides sont rompus par l'hydrolyse.
isomérisation de la protéine peptidyl-prolyle	La modification d'une protéine par isomérisation cis-trans d'un résidu proline.

Terme GO	Définition
lipoylation des protéines	La lipoylation du peptidyl-lysine pour former le peptidyl-N6-lipoil-L-lysine. C'est un phénomène rare qui conduit à la modification post-transcriptionnel de la lysine.
maturation de l'ARNt	Le processus dans lequel la molécule de pré-ARNt (ARNt avec introns) est convertie en ARNt mature, prêt pour l'acétylation.
méthylation	Le processus par lequel un groupement méthyle (-CH ₃) est attaché de manière covalente à une molécule.
méthylation de l'ARNt	L'ajout post-transcriptionnel de groupements méthyles au sein de mARNt.
modification de l'ARN	Le changement covalent d'un ou de plusieurs nucléotides au sein de l'ARN pour produire un ARN avec une séquence qui diffère de ce qui est codé génétiquement.
modification de l'ARNt	Le changement covalent d'un ou de plusieurs nucléotides au sein de l'ARNt pour produire une molécule d'ARNt avec une séquence qui diffère de celle codée génétiquement.
phosphorylation	La phosphorylation regroupe les processus permettant l'introduction d'un groupement phosphate dans une molécule, avec classiquement la formation d'un ester phosphorique, un amide phosphorique ou un pentoxyde de phosphore.
phosphorylation des protéines	Le processus d'introduction d'un groupe phosphate au sein d'une protéine.
processus métabolique du glycérol-3-phosphate	Les réactions chimiques et les voies impliquant le glycérol-3-phosphate, un monoester phosphorique (-P=O) du glycérol.
processus métabolique des glutamines	Les réactions chimiques et les voies impliquant des glutamines.
processus catabolique des nucléotides	Les réactions chimiques et les voies aboutissant à la dégradation de nucléotides.
processus catabolique des peptides	Les réactions chimiques et les voies aboutissant à la dégradation des peptides (composés de 2 ou plusieurs (mais moins de 100) acides aminés).
processus catabolique du glycérol	Les réactions chimiques et les voies aboutissant à la dégradation du glycérol.
processus de biosynthèse	Les réactions chimiques et les voies aboutissant à la formation de substances, typiquement la partie du métabolisme nécessitant de l'énergie pour transformer les substances plus simples en plus complexes.
processus de biosynthèse de la lysine via le diaminopimélate	Les réactions chimiques et les voies aboutissant à la formation de lysine, via l'intermédiaire diaminopimélate.
processus de biosynthèse de la méthionine	Les réactions chimiques et les voies aboutissant à la formation de méthionine.

Terme GO	Définition
processus de biosynthèse de la protoporphyrinogène IX	Les réactions chimiques et les voies aboutissant à la formation de protoporphyrinogène IX. C'est un intermédiaire du métabolisme des porphyrines (impliquées dans le transport du dioxygène ou la chaîne de transfert des électrons).
processus de biosynthèse de la valine	Les réactions chimiques et les voies aboutissant à la formation de valine.
processus de biosynthèse de la vitamine B6	Les réactions chimiques et les voies aboutissant à la formation de vitamine B6.
processus de biosynthèse de l'arginine	Les réactions chimiques et les voies aboutissant à la formation d'arginine.
processus de biosynthèse de l'arginine via l'ornithine	Les réactions chimiques et les voies aboutissant à la formation d'arginine, via l'intermédiaire ornithine.
processus de biosynthèse 'de novo' L-méthionine	Les réactions chimiques et les voies aboutissant à la formation de L-méthionine à partir de composés simples.
processus de biosynthèse des acides aminés	Les réactions chimiques et les voies aboutissant à la formation d'acides aminés.
processus de biosynthèse des acides aminés à chaîne ramifiée	Les réactions chimiques et les voies aboutissant à la formation d'acides aminés contenant un squelette carboné ramifié (isoleucines, leucine et valine).
processus de biosynthèse des guanosines monophosphates (GMP)	Les réactions chimiques et les voies aboutissant à la formation de GMP.
processus de biosynthèse des isoleucines	Les réactions chimiques et les voies aboutissant à la formation d'isoleucine.
processus de biosynthèse des leucines	Les réactions chimiques et les voies aboutissant à la formation de leucine.
processus de biosynthèse des lipoates	Les réactions chimiques et les voies aboutissant à la formation des lipoates. Les lipoates sont connus pour être des cofacteurs nécessaires à la fonction de plusieurs enzymes impliquées dans les métabolismes oxydatifs. Son activité rédox lui donne une fonction d'antioxydant et de piégeur de radicaux libres. L'acquisition et l'utilisation du lipoate diffère en fonction du microorganisme mais il affecte la virulence et la pathogénicité de ces microorganismes.
processus de biosynthèse des menaquinones	Les réactions chimiques et les voies aboutissant à la formation des menaquinones. Les menaquinones sont essentielles dans le transport d'électrons et pour la génération d'ATP chez toutes les bactéries Gram+.
processus de biosynthèse des nucléotides purique	Les réactions chimiques et les voies aboutissant à la formation de nucléotides puriques.
processus de biosynthèse des nucléotides pyrimidiques	Les réactions chimiques et les voies aboutissant à la formation de nucléotides pyrimidiques.
processus de biosynthèse du glutamate	Les réactions chimiques et les voies aboutissant à la formation du glutamate.
processus de biosynthèse du NADP	Les réactions chimiques et les voies aboutissant à la formation de NADP, une coenzyme impliquée dans beaucoup de réactions d'oxydoréduction et de

Terme GO	Définition
	biosynthèse. Il peut se présenter à la fois sous la forme oxydée, NADP, ou sous la forme réduite, NADPH.
processus de biosynthèse du phosphate de pyridoxal	Les réactions chimiques et les voies aboutissant à la formation du phosphate de pyridoxal, la forme active de la vitamine B6.
processus de biosynthèse du tétrapyrrole	Les réactions chimiques et les voies aboutissant à la formation de tétrapyrroles, pigments naturels.
processus de modification des protéines cellulaires	Le changement covalent d'un ou plusieurs acides aminés présents au sein d'une protéine, d'un peptide et ou polypeptides naissants (modifications pendant la traduction ou post-traductionnelles). Inclut la modification des ARNt ayant fixés un acide aminé destiné à arriver dans une protéine (modification pré-traductionnelle).
processus d'oxydoréduction	Les procédés métaboliques qui conduisent au retrait ou à l'ajout d'électron(s) d'une substance avec ou sans retrait ou ajout de proton(s). L'espèce chimique qui capte les électrons est appelée oxydant et celle qui les cède, réducteur.
processus métabolique	Les réactions chimiques et les voies, d'anabolisme et de catabolisme, par lequel des organismes vivants transforment des substances chimiques. Des processus métaboliques transforment typiquement de petites molécules, mais incluent aussi des processus macromoléculaires comme la réparation et la réPLICATION de l'ADN et la synthèse ou la dégradation de protéines.
processus métabolique de l'acide carboxylique	Les réactions chimiques et les voies impliquant des acides carboxyliques, n'importe quel acide organique contenant un ou plusieurs groupes carboxyles (-COOH) ou la forme ionisée (-COO ⁻).
processus métabolique de l'acide gamma-aminobutyrique	Les réactions chimiques et les voies impliquant l'acide de gamma-aminobutyrique (GABA, 4-aminobutyrate). Son rôle chez les bactéries n'est pas encore prouvé mais il est possible qu'il soit impliqué dans les réponses aux stress oxydatifs ou le métabolisme du glutamate.
processus métabolique des acides aminés à chaîne ramifiée	Les réactions chimiques et les voies impliquant les acides aminés contenant un squelette carbonique embranché, comme l'isoleucine, la leucine et la valine.
processus métabolique des acides aminés cellulaires	Les réactions chimiques et les voies impliquant des acides aminés, acides carboxyliques contenant un ou plusieurs groupes amines (-NH ₂).
processus métabolique des acides gras	Les réactions chimiques et les voies impliquant des acides gras, des acides monocarboxyliques aliphatiques libérés par l'hydrolyse des graisses et des huiles.

Terme GO	Définition
processus métabolique des composés azotés	Les réactions chimiques et les voies impliquant des composés organiques ou inorganiques qui contiennent de l'azote.
processus métabolique des glucides	Les réactions chimiques et les voies impliquant des glucides, soit un composé ayant pour formule générale $C_x(H_2O)_y$. Inclut la formation de dérivées de glucide par l'ajout d'un résidu glucidique à une autre molécule.
processus métabolique des lipides	Les réactions chimiques et les voies impliquant les lipides, les composés solubles dans un solvant organique mais pas, ou avec modération, dans un solvant aqueux. Inclut les acides gras, les graisses neutres, d'autres esters d'acide gras et savons, les glycolipides, phospholipides, carotènes, polyprénols, stérols,...
processus métabolique des longues chaînes d'acides gras	Les réactions chimiques et les voies impliquant de longues chaînes d'acides gras. Une longue chaîne d'acide gras est un acide gras avec une longueur de chaîne comprise entre C13 et C22.
processus métabolique des nucléosides	Les réactions chimiques ou voies impliquant un nucléoside.
processus métabolique des peptides	Les réactions chimiques et les voies impliquant des peptides.
processus métabolique des substances organiques	Les réactions chimiques et les voies impliquant une substance organique (n'importe quelle entité moléculaire contenant des atomes de carbone).
processus métabolique du fumarate	Les réactions chimiques et les voies impliquant le fumarate. C'est un intermédiaire clé dans le métabolisme et est formé dans le cycle de Krebs à partir du succinate et converti en malate.
processus métabolique du glycérol	Les réactions chimiques et les voies impliquant le glycérol.
processus métabolique du pyruvate	Les réactions chimiques et les voies impliquant le pyruvate.
processus métabolique NAD	Les réactions chimiques et les voies impliquant le NAD, une coenzyme présente dans la plupart des cellules vivantes et dérivée de la vitamine B.
protéolyse	L'hydrolyse de protéines en de plus petits polypeptides et/ou acides aminés par clivage de leurs liaisons peptidiques.
recombinaison de l'ADN	N'importe quel processus dans lequel un nouveau génotype est formé par le réarrangement de gènes aboutissant à une combinaison de gènes différente de celle qui était présente chez le parent.
régulation de la transcription	N'importe quel processus qui module la fréquence, le taux ou l'ampleur de la transcription de l'ADN. Cette régulation modifiera la quantité d'ARN produit.
repliement des protéines	Repliement des protéines en leur structure tertiaire.

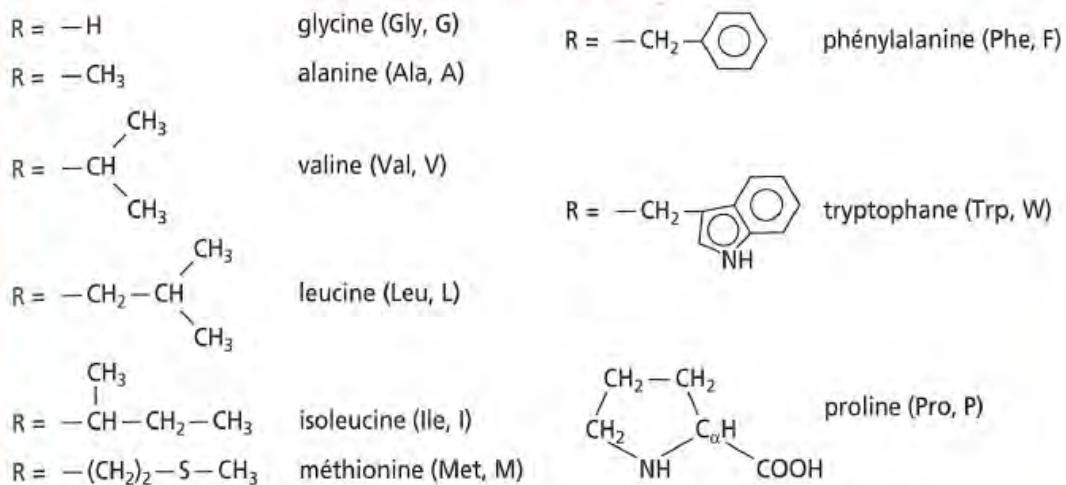
Terme GO	Définition
rupture du cofacteur peptidyle-pyrrométhane	La liaison covalente entre le cofacteur pyrrométhane et une protéine via l'atome de soufre de la cystéine formant le dipyrrolylméthanéméthyl-L-cystéine.
sauvetage de l'inosine monophosphate (IMP)	N'importe quel processus qui produit l'inosine monophosphate (IMP) à partir des dérivées de ce composé, sans synthèse <i>de novo</i> .
sauvetage des nucléotides puriques	Une voie de sauvetage est une voie métabolique par laquelle des nucléotides, ici puriques, sont synthétisés à partir d'intermédiaires de dégradation des nucléotides.
synthèse de la pseudo-uridine	La conversion intramoléculaire de l'uridine en pseudo-uridine présent au sein d'une molécule d'ARN. Cette modification post-transcriptionnelle de base se retrouve chez les ARNt et ARNr. La structure de la pseudo-uridine par rapport à l'uridine permet de stabiliser l'ARN en créant une liaison hydrogène supplémentaire (avec le groupement $-\text{NH}$ de l'uridine).
système de transduction du signal phosphorelais	Les systèmes de transduction du signal à phosphorelais contribuent à la survie des micro-organismes en leur permettant d'évaluer les variations des caractéristiques du milieu de croissance et de développer une réponse adaptative. Ces systèmes fonctionnent sur la base d'échange d'un groupement phosphoryl (PO_3^{2-}) entre une histidine et un aspartate.
traduction de l'ARN	A partir d'ARN messager ou de l'ARN circulaire, traduction des acides nucléiques en acides aminés afin de créer les protéines. Cette action est guidée par les ribosomes.
transcription	La transcription de l'ADN en ARN permet, à l'aide de protéines, de synthétiser de l'ARN à partir de l'ADN.
transduction du signal	Le processus cellulaire dans lequel un signal est transmis pour déclencher un changement de l'activité ou de l'état d'une cellule. La transduction du signal commence par la réception d'un signal (par exemple, un ligand lié à un récepteur ou l'activation d'un récepteur par un stimulus comme la lumière), ou au contraire, dans le cas de transduction du signal en l'absence de ligand, un retrait de signal ou d'activité d'un récepteur constitutivement actif. La transduction du signal couvre le signalement par les récepteurs situés sur la surface de la cellule ou via les molécules situées dans la cellule. Pour les signaux intracellulaires, la transduction du signal est limitée aux événements au niveau de la cellule réceptrice.

Terme GO	Définition
transduction du signal par phosphorylation des protéines	Chez les bactéries, une grande diversité enzymatique est retrouvée pour les kinases et les phosphatases. Ces enzymes phosphorylent et déphosphorylent des résidus d'acides aminés présent au sein des protéines. Les plus communs sont les séries, thréonines, tyrosines, histidines et arginines. La phosphorylation de ces acides aminés spécifiques au sein des protéines est un élément important dans la voie de transduction du signal. La phosphorylation peut contrôler l'activité des protéines ciblées soit directement en conduisant à des changements conformationnels, soit indirectement en régulant les interactions protéine/protéine.
transport de dérivés de carbohydrates	Le mouvement dirigé d'un dérivé de carbohydrate (ou glucide) à l'intérieur, à l'extérieur ou dans la cellule ou entre les cellules par l'intermédiaire d'un agent comme un transporteur ou un pore.
transport de la glycine bétaine	Le mouvement dirigé de la glycine bétaine à l'intérieur, à l'extérieur ou dans la cellule ou entre les cellules par l'intermédiaire d'un agent comme un transporteur ou un pore. La glycine bétaine est l'un des osmoprotecteurs les plus puissants connus.
transport des acides aminés	Le mouvement dirigé d'acides aminés à l'intérieur, à l'extérieur ou dans la cellule ou entre les cellules par l'intermédiaire d'un agent comme un transporteur ou un pore.
transport des carbohydrates	Le mouvement dirigé de glucides à l'intérieur, à l'extérieur ou dans la cellule ou entre les cellules par l'intermédiaire d'un agent comme un transporteur ou un pore. Les glucides sont n'importe lequel d'un groupe de composés organiques basés de la formule générale $C_x(H_2O)_y$.
transport des cations de Nickel	Le mouvement dirigé des cations de nickel à l'intérieur, à l'extérieur ou dans la cellule ou entre les cellules par l'intermédiaire d'un agent comme un transporteur ou un pore.
transport des composés azotés	Le mouvement dirigé des composés azotés à l'intérieur, à l'extérieur ou dans la cellule ou entre les cellules par l'intermédiaire d'un agent comme un transporteur ou un pore.
transport des peptides	Le mouvement dirigé de peptides à l'intérieur, à l'extérieur ou dans la cellule ou entre les cellules par l'intermédiaire d'un agent comme un transporteur ou un pore.
transport des protéines	Le mouvement dirigé de protéines à l'intérieur, à l'extérieur ou dans la cellule ou entre les cellules par l'intermédiaire d'un agent comme un transporteur ou un pore.
transport des protéines par le complexe Sec	Le processus dans lequel les protéines dépliées sont transportées à travers la membrane cytoplasmique

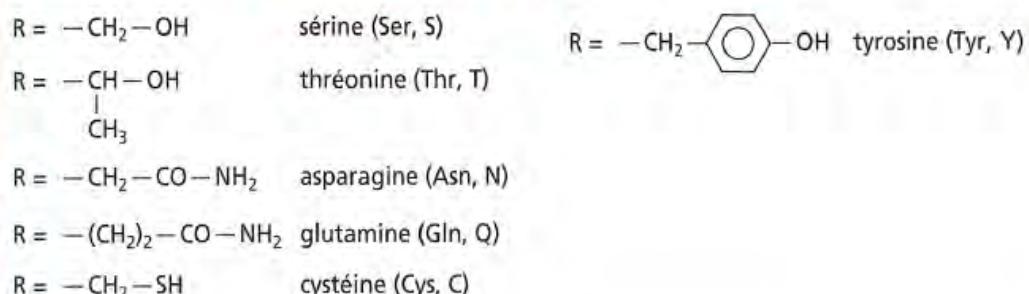
Terme GO	Définition
	par le translocon Sec (complexe de translocation pour la sécrétion des protéines), dans un processus impliquant un clivage protéolytique (hydrolyse) en N-terminal d'un peptide de signal.
transport du galactitol	Le mouvement dirigé de galactitol à l'intérieur, à l'extérieur ou dans la cellule ou entre les cellules par l'intermédiaire d'un agent comme un transporteur ou un pore. Le galactitol est un dérivé du galactose, après réduction de ce dernier. C'est un alcool de sucre.
transport intracellulaire des protéines	Le mouvement dirigé de protéines à l'intérieur d'une cellule.
transport transmembranaire des carbohydrates	Le processus par lequel les carbohydrates sont transportés à travers la membrane.
transport transmembranaire	Le processus par lequel un soluté est transporté à travers la bicoche lipidique depuis un côté de la membrane vers un autre.
transport transmembranaire des acides aminés	Le processus par lequel les acides aminés sont transportés à travers la membrane.
transport transmembranaire des protons	Le mouvement dirigé des protons à travers la membrane.
transport transmembranaire du fructose	Le mouvement dirigé du fructose à l'intérieur, à l'extérieur ou dans la cellule ou entre les cellules par l'intermédiaire d'un agent comme un transporteur ou un pore.
transport transmembranaires des protéines intracellulaires	Le mouvement dirigé de protéines à l'intérieur d'une cellule, depuis un côté de la membrane vers l'autre côté par l'intermédiaire d'un agent comme un transporteur ou un pore.
voie de signalisation du récepteur ionotropique au glutamate	Une série de signaux moléculaires initiée par la liaison du glutamate avec son récepteur à la surface de la cellule cible, suivie par le mouvement d'ions par un canal dans le complexe récepteur.

Annexe 15 : Classification des acides aminés, d'après [171]

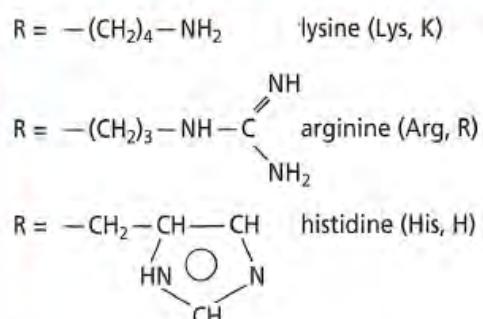
Chaîne latérale hydrophobe (non polaire)



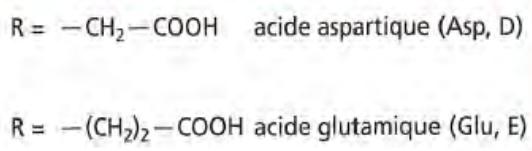
Chaîne latérale hydrophile (polaire) « neutre »



Chaîne latérale hydrophile (polaire) basique



Chaîne latérale hydrophile (polaire) acide



Classification des aminoacides.

Résumé

L'efficacité bactéricide des faisceaux d'électrons pulsés et des décharges électriques dans l'eau est admise depuis plusieurs années. Cependant, les mécanismes responsables de l'inactivation bactérienne restent toujours à déterminer. *Bacillus pumilus* est une bactérie de référence pour les traitements ionisants. Elle a été choisie dans notre étude car les deux technologies produisent des radiations. De plus, cette bactérie a la capacité de sporuler. Les spores ont une organisation spécifique constituée de différentes couches (protéines, lipides, peptidoglycans, ...) et d'un cœur déshydraté qui leur permet d'être extrêmement résistantes aux stress environnementaux. Une telle résistance peut également être expliquée par la présence de petites protéines acido-solubles (SASPs) de type α/β . Ces protéines saturent l'ADN et le protégent. Dans l'étude, nous avons investigué les mécanismes responsables de la mortalité de *Bacillus pumilus* après l'exposition au traitement. Des outils de microscopie de pointe à l'échelle du nanomètre (microscope électronique à balayage, à transmission et microscope à force atomique) ont permis de révéler une désorganisation de *Bacillus pumilus* après son traitement avec les décharges électriques. Une modification de l'hydrophobicité de *Bacillus pumilus* est également mise en évidence par AFM. Les gels d'électrophorèse à champ pulsé (PFGE) révèlent des dommages au niveau de l'ADN, notamment des cassures simple et double brin. Enfin, l'analyse quantitative des protéines réalisée par spectrométrie de masse a permis d'identifier les processus biologiques (transformations moléculaires nécessaires au fonctionnement d'entités biologiques) affectés par le traitement. Les résultats obtenus à travers cette thèse peuvent apporter une explication à l'inactivation de *Bacillus pumilus* par faisceau d'électrons pulsés et les décharges électriques.

Mots clés : dommages à l'ADN, inactivation des spores, gel d'électrophorèse à champ pulsé, microscopie électronique, microscopie à force atomique, protéomique

Abstract

The efficiency of pulsed electron beam and electrical discharges in water, in the research of bacterial breakdown, was proved many years ago. However, the explanation of the mechanisms responsible for bacterial inactivation following the treatment are still unknown. *Bacillus pumilus* is the reference for ionizing treatment and was chosen for this study because both technologies produced radiation. This bacteria has the ability to sporulate. Spores have a specific organization with different layers (proteins, lipids, peptidoglycans,...) and a dehydrated core, which allow them to be very resistive in an inauspicious environment. Such resistance can be explained by the presence of α/β -type small, acid-soluble spore proteins (SASPs), in the core. These proteins saturate and protect the DNA. Here, we investigated the mechanisms involved in the death of *Bacillus pumilus* after exposure to a pulsed electron beam or to electrical discharges in water. Cutting-edge microscopies (Scanning Electron Microscopy, Transmission Electron Microscopy, Atomic Force Microscopy) at the nanoscale reveal structural disorganization of *Bacillus pumilus* treated by electrical discharges. A modification of *Bacillus pumilus* hydrophobicity is also revealed by AFM. Pulsed-Field Gel Electrophoresis (PFGE) revealed genomic DNA damage. In particular, it showed single or double-strand breaks. Finally, proteomic analysis allowed to identify proteins and their biological processes affected by the treatment. Our findings can explain an unexpected mechanism of cell death.

Keywords: DNA damage, spore inactivation, Pulsed-Field Gel Electrophoresis, Electron Microscopy, Atomic Force Microscopy, proteomic.