

Centre Énergie, Matériaux et Télécommunications**INACTIVATION DES BACTÉRIOPHAGES *M13* ET *MS2* PAR UN LASER
FEMTOSECONDE.**

Par

Aziz Berchtikou

Thèse présentée pour l'obtention
du grade de Philosophiae doctor (Ph.D.)
en Sciences de l'Énergie et des Matériaux

Jury d'évaluation

Président du jury et
examineur interne

Marc-André Gauthier
INRS-EMT

Examineur externe

Guy Lemay
Département de microbiologie,
infectiologie et immunologie
Université de Montréal

Examineur externe

Michel Piché
Département de physique, génie
physique et d'optique
Université de Laval

Directeur de recherche

Tsuneyuki Ozaki
INRS-EMT

REMERCIEMENTS

Ce travail de thèse s'est déroulé au laboratoire ALLS de l'Institut National de la Recherche Scientifique (INRS) -Centre Énergie Matériaux Télécommunications (EMT) en collaboration avec le groupe de professeur Peter Tijssen du Centre INRS–Institut Armand-Frappier et le groupe de professeur Marc A. Gauthier (EMT). Mes remerciements vont tout d'abord à mon directeur de recherche, le professeur Tsuneyuki Ozaki, pour m'avoir proposé un sujet extrêmement stimulant et il a su se montrer d'une rare disponibilité, et ce malgré un emploi du temps déjà surchargé. Que ce soit pour discuter d'une nouvelle idée, pour résoudre des problèmes théoriques ou bien encore pour évoquer des sujets physiques, il a toujours réussi à trouver les bons moments. Sa grande expérience, sa disponibilité, son goût pour les bonnes choses de la vie et son intelligence, font de l'équipe des atouts plus et idéaux de travail. D'une grande simplicité, il a toujours su me comprendre et m'encourager au cours de mes périodes de doute.

Au titre des collaborations, je veux remercier le professeur Peter Tijssen du Centre INRS–Institut Armand-Frappier et le professeur Marc A. Gauthier (EMT), pour m'avoir ouvert les portes du laboratoire de biologie pendant 5 ans pour la préparation et le titrage des bactériophages et d'avoir toujours été disponibles, à l'écoute de mes questions et impliqués dans l'avancée de mes travaux de recherche.

Je voudrais également remercier les personnes qui ont accepté de faire partie de mon jury de soutenance. Je remercie le professeur Marc A. Gauthier (EMT) d'avoir accepté de présider ce jury. Également, je remercie le professeur Guy Lemay de l'université de Montréal ainsi que le professeur Michel Piché de l'université de Laval, pour avoir accepté de rapporter sur ce travail.

Un très grand merci revient à toute l'équipe scientifique et technique du laboratoire ALLS, Antoine, Philippe, Joël, pour m'avoir apporté de précieux conseils et de soutien technique et moral durant les longues semaines de temps de faisceau. En particulier, je remercie Antoine Laramée qui, par sa très grande connaissance technique des

systemes laser femtosecondes ainsi que son efficacite, m'a beaucoup appris et il a contribue fortement a la realisation des experiences.

Pensees affectueuses a l'ensemble des membres de l'INRS-EMT que j'ai cotoyes tout au long de ses annees de travail de recherche : les etudiants, le personnel administratif autant que les techniciens. Merci a tous.

RÉSUMÉ

L'inactivation par le traitement laser femtoseconde est le résultat d'une succession complexe de mécanismes d'interaction entre l'impulsion laser et le matériau biologique. Notre étude s'inscrit dans le cadre de la compréhension des mécanismes d'inactivation des particules virales suite à un traitement laser femtoseconde. Les objectifs généraux, au départ, étaient de mettre en place une stratégie expérimentale dans le but d'améliorer l'inactivation des agents infectieux en optimisant les différents paramètres clefs régissant le procédé d'inactivation par le laser femtoseconde et de déterminer les phénomènes impliqués dans les mécanismes d'inactivation des bactériophages. À cette fin, les bactériophages M13 et MS2, deux agents infectieux très différents sur le plan biologique, sont exposés à des impulsions femtosecondes intenses dans le visible et le proche infrarouge. Dans un premier temps, nous avons étendu les travaux menés sur l'inactivation des virus par le traitement laser au moyen d'un système laser femtoseconde à technologie titane: saphir. On a accéléré l'inactivation des bactériophages par le laser à impulsions ultra-courtes rapportée (> 1 heure) à 15 min au maximum en grands volumes (1cm^3). Pour raccourcir le temps d'exposition requis pour l'inactivation, nous avons utilisé des impulsions femtosecondes ultra-courtes (40 fs) et intenses (20 mJ) avec une cadence de 10 Hz. Avec ces paramètres, le temps d'exposition maximum requis pour l'échantillon est de 15 minutes, ce qui est considérablement plus court que celui utilisé dans les précédentes études d'inactivation des virus au laser. L'efficacité de l'inactivation des agents infectieux par le traitement laser femtoseconde dépend de nombreux facteurs. Ces facteurs peuvent être divisés en deux groupes: les paramètres laser femtoseconde (la durée d'impulsion, l'énergie d'irradiation, longueur d'onde d'excitation et la durée d'exposition) et les paramètres cibles (taille, structure de la capsid et composition de génome viral,...). Tous ces facteurs affectent les différentes étapes de l'inactivation des pathogènes. La fonctionnalité des bactériophages M13 et MS2 est montrée être dépendante de la densité d'énergie du laser d'excitation ainsi que du temps d'exposition. La diminution de la densité d'énergie d'irradiation semble réduire l'efficacité de l'inactivation des virus. L'augmentation du temps d'exposition induit une destruction progressive des particules. L'inactivation du virus s'est avérée très sensible à la durée de l'impulsion laser. L'inactivation est maximale lorsque la durée de l'impulsion est courte et diminue progressivement à mesure que la durée de l'impulsion du laser d'excitation augmente à densité de puissance laser constante (17 GW cm^{-2}) et à la longueur d'onde d'excitation. En outre, l'inactivation du virus s'est avérée dépendre de la longueur d'onde d'excitation. Pour des temps d'exposition courts, les deuxièmes harmoniques du laser Ti:saphir ont montré une efficacité

d'inactivation plus élevée que les longueurs d'onde fondamentales. Enfin, l'efficacité de ce traitement laser femtoseconde dépend également de la sensibilité de l'agent infectieux ciblé. Les M13 et MS2, deux agents infectieux très différents sur le plan biologique ont montré des comportements d'inactivation très différents au traitement laser à 400 nm. Les différences des comportements ne peuvent être rationalisées que si les mécanismes moléculaires induisant l'inactivation sont compris. Nous avons par conséquent déterminé comment des différences dans la composition du génome et des protéines virales peuvent avoir un impact sur les mécanismes d'inactivation des bactériophages par le traitement laser. Des études récentes soulignent que l'inactivation virale observée lors d'un traitement laser serait liée à des modifications au niveau de la capsidie des virus. La surface de la capsidie est ainsi le siège de réactions physico-chimiques liées au milieu qui peuvent altérer le caractère infectieux et en particulier la capacité du virus à reconnaître sa cellule hôte. C'est pourquoi nous avons étudié l'inactivation et l'évaluation des propriétés de surface de nos deux virus modèles au cours de ces traitements. Cette étude a pour but de mieux comprendre les processus de l'inactivation et de la dégradation des particules virales au cours d'un traitement technologique. L'étude des modifications physico-chimiques au cours de l'inactivation virale nous a souligné que les propriétés interfaciales sont différentes entre le phage MS2 et le phage M13. Ces résultats démontrent donc qu'il est possible de préciser les mécanismes responsables de la baisse des UFP. Ces résultats suggèrent que l'altération de la structure de la protéine de la capsidie virale due à l'agrégation des protéines est la cause d'inactivation de MS2 traitées au laser. Les vibrations induites par le traitement laser femtoseconde provoquent une perturbation transitoire des liaisons relativement faibles à l'intérieur d'une capsidie viral. Cela conduit par conséquence à un dépliement partiel des protéines virales en perturbant les liaisons hydrogène et / ou les interactions hydrophobes, conduisant à l'agrégation de protéines virales étroitement associées et à l'inactivation du virus. D'autre part, pour les bactériophages M13, des travaux antérieurs ont examiné les mécanismes d'inactivation du phage par le traitement laser femtoseconde. Ils ont démontré que l'inactivation des M13 est lié à la détérioration de leur capsidie protéique virale.

Ce travail de recherche s'est déroulé au laboratoire ALLS de l'Institut National de la Recherche Scientifique (INRS) -Centre Énergie Matériaux Télécommunications (EMT) en collaboration avec le groupe de professeur Peter Tijssen du Centre INRS–Institut Armand-Frappier et le groupe de professeur Marc A. Gauthier (EMT). Cette thèse présente un fort caractère expérimental, beaucoup de temps a été accordé pour effectuer les expériences, évaluer et trier les données obtenues. Ce document articulé en six chapitres présente les résultats obtenus au cours de ces cinq années d'étude. Le premier chapitre dédie à l'étude bibliographique qui

précise le contexte général de notre étude, en présentant les principes de ces différentes méthodes actuelles d'inactivation, mais également les limites qu'elles peuvent présenter, et la nouvelle technologie innovante d'inactivation, la décontamination par le traitement laser femtoseconde qui présentent une alternative séduisante. Nous développons pourquoi cette technologie se distingue des autres, et quelle pourrait être sa place dans le secteur industriel actuel. Le deuxième chapitre présente d'importantes applications biomédicales de l'inactivation par le laser femtoseconde pour la prévention des maladies infectieuses par la réduction des composants pathogènes du sang, la stérilisation des produits pharmaceutiques et biologiques, la décontamination des cultures cellulaires et la production de vaccins sûrs et efficaces. Le troisième chapitre donne une description succincte de mécanisme possible d'inactivation par le traitement laser femtoseconde. Dans cette section, le principe d'ISRS et son effet sur un système de agents infectieux (virus) sont introduits de manière concise. Le quatrième chapitre présente les dispositifs expérimentaux et les matériaux utilisés ainsi que les diverses méthodes mises en œuvre au cours de cette étude pour préparer une suspension du stock phagique isolés stable au cours du temps. Dans la première partie, nous ne donnons que les grandes lignes d'obtention de stock de bactériophages et culture de la bactérie nécessaire pour le titrage et les méthodes qui ont permis la caractérisation de cette suspension stock de même que les suspensions de phages obtenues après le traitement laser. Ensuite la seconde partie est consacrée à l'appareillage expérimental utilisé dans nos travaux. Nous donnons une description brève des éléments clés de ces dispositifs expérimentaux: la source laser femtoseconde et le montage expérimental. Ensuite, les résultats obtenus sont présentés et analysés dans le cinquième chapitre. Dans ce chapitre, nous montrons que l'efficacité de l'inactivation des agents infectieux par le laser femtoseconde dépend de nombreux facteurs. Ces facteurs peuvent être divisés en deux groupes: les paramètres de source laser femtoseconde (tels que la longueur d'onde, le temps d'exposition à l'irradiation et l'énergie et la largeur d'impulsion) et les paramètres cibles (taille biologique, composition du génome viral). Tous ces facteurs affectent les différentes étapes de l'inactivation des agents infectieux. Dans le sixième et dernier chapitre, des conclusions globales ainsi que des perspectives soulevées par ces travaux sont finalement formulées.

TABLE DES MATIÈRES

REMERCIEMENTS	I
RÉSUMÉ	V
LISTE DES FIGURES	XVII
LISTE DES TABLEAUX	XVII
LISTE DES ABRÉVIATIONS	XIX
1 INTRODUCTION ET PROBLÉMATIQUE	1
1.1 INTRODUCTION.....	1
1.1.1 Les méthodes traditionnelles pharmaceutiques	2
1.1.2 L'effet des rayons gamma et des rayons X sur les systèmes biologiques	3
1.1.3 L'effet des rayonnements ultraviolets sur les systèmes biologiques.....	5
1.1.4 L'effet des micro-ondes sur les systèmes biologiques.....	7
1.1.5 L'effet des ondes sonores sur les systèmes biologiques.....	8
1.1.6 L'effet du laser femtoseconde sur les systèmes biologiques	9
1.2 OBJECTIFS DE L'ETUDE	13
2 LES PERSPECTIVES DE L'INACTIVATION DES AGENTS PATHOGENES PAR DES LASERS FEMTOSECONDE.	15
2.1 DECONTAMINATION DES PRODUITS SANGUINS DESTINES A LA TRANSFUSION	15
2.2 STERILISATION DES PRODUITS BIOLOGIQUES ET LES PRODUITS PHARMACEUTIQUES	19
2.3 DECONTAMINATION DES CULTURES CELLULAIRES	20
2.4 GENERATION DE VACCINS EFFICACES ET SURS.....	20
3 THÉORIE: IMPULSIVE DIFFUSION RAMAN STIMULÉE	24
3.1 IMPULSIVE DIFFUSION RAMAN STIMULEE	24
3.2 L'IMPORTANCE DES IMPULSIONS ULTRACOURTES POUR L'INACTIVATION DES AGENTS PATHOGENES GRACE A L'ISRS	31
4 MATÉRIEL ET MÉTHODE	32
4.1 BACTERIOPHAGES.....	32
4.1.1 Bactériophages M13.....	33
4.1.2 Bactériophages MS2.....	34

4.2	PRODUCTION DES STOCKS DE PHAGE ET DES CULTURES BACTERIENNES.	35
4.2.1	Tampon phosphate.....	36
4.2.2	Préparation de LB Agar	36
4.2.3	Préparation de LB Broth	36
4.2.4	Préparation des suspensions bactériennes.....	37
4.2.5	Préparation du stock de bactériophages.....	38
4.2.6	Purification du phage par dialyse.....	39
4.2.7	Quantification par titrage.....	39
4.2.8	La limite de détection.....	41
4.3	DOSAGE DES DOMMAGES A L'ADN	42
4.4	DISPOSITIF EXPERIMENTAL: SOURCE D'EXCITATION.....	43
4.4.1	Chaîne laser femtoseconde	43
4.4.2	Montage expérimental	45
5	RESULTATS EXPERIMENTAUX ET ANALYSE.....	50
5.1	LES PARAMETRES DE SOURCE LASER FEMTOSECONDE	51
5.1.1	Influence de la durée du traitement.....	51
5.1.2	Détermination des paramètres cinétiques d'inactivation.....	53
5.1.3	Influence du temps d'irradiation sur l'intégrité de l'ADN.....	57
5.1.4	Effet de durée d'impulsion	61
5.1.5	Effet de la densité énergétique	66
5.1.6	Effet de la longueur d'onde d'excitation	70
5.1.7	Effet de dérive de fréquence (chirp) sur l'inactivation	74
5.2	LES PARAMETRES CIBLES.....	76
5.2.1	Influence de la durée du traitement.....	77
5.2.2	Effets thermiques.....	78
5.2.3	Modélisation cinétique de l'inactivation des phages M13 et MS2	79
5.2.3.1	Modélisation des courbes de survie: Modélisation log-Linéaire	80
5.2.3.2	Modélisation des courbes de survie: Modélisation non linéaire	81
A	Modèles basés sur la distribution de Weibull	82
B-	Modèles basés sur l'existence de deux sous-populations.....	83
C	Estimation des paramètres	87
5.2.4	Effet de durée d'impulsion	89
5.2.5	Effet de la densité énergie	91
5.3	ÉTUDE DES PROPRIETES INTERFACIALES DES BACTERIOPHAGES MS2 ET M13.....	94

5.3.1	Impact de la nature de l'interface des bactériophage MS2 et M13 sur les mécanismes d'inactivation.....	94
5.3.1.1	Effet du pH	95
5.3.1.2	Influence des caractéristiques du milieu.....	99
5.3.1.2.1	Effet de la concentration de phosphate disodique.	99
5.3.1.2.2	Effet de Chlorure de sodium (NaCl).....	100
5.4	EFFET DE CONCENTRATION INITIALE DE PHAGES.....	104
5.5	PURIFICATION DES PARTICULES VIRALES.....	107
5.6	EFFETS DES ESPECES REACTIVES DE L'OXYGENE	109
5.6.1	Bactériophage M13 + tempol	110
5.6.2	Détection de l'oxygène singulet	112
5.6.2.1	Détection directe de de l'oxygène singulet	112
5.6.2.2	Détection indirecte de l'oxygène singulet	113
A	Dispositif expérimental.....	114
B	Detection En solution: Calibration et limite de détection du dispositif	115
a)	Alignement du système (Lens + spectrometer).....	115
b)	Calibration de détection d'oxygène singulet.....	116
c)	Détection de 1O_2 avec un tube photomultiplicateur (PMT).....	118
5.6.2.3	Détection de la génération de 1O_2 lors de l'inactivation de M13.....	119
6	CONCLUSION	122
	REFERENCES	126

LISTE DES FIGURES

Figure 1. 1	Diagramme d'énergie électronique d'un système biologique tel qu'une particule virale excitée par rayonnement gamma ou rayons X [13].....	4
Figure 1. 2	Les principaux types de lésions induites par les UV [23].....	6
Figure 1. 3	Spectre d'absorption de l'eau pour les ondes électromagnétiques. La bande verticale bleue marquant les longueurs d'onde comprises entre 400 et 700 nm indique la gamme de longueurs d'ondes couverte par la lumière visible. Le minimum d'absorption dans cette région est centré à environ 450 nm [32].....	8
Figure 2. 1	Principe des techniques photochimiques d'inactivation virale des produits sanguins labiles cellulaires [11].....	17
Figure 2. 2	Le concept de réduction des agents pathogènes dans les produits sanguins [1].....	19
Figure 2. 3	Le concept d'inactivation virale pour la génération de vaccins [37].....	23
Figure 3. 1	Schéma générale de principe d'ISRS.....	25
Figure 3. 2	Démonstration de l'inactivation de bactériophage M13 par le traitement laser femtoseconde.....	28
Figure 3. 3	Un diagramme d'énergie simplifié pour un atome oscillant autour de sa position d'équilibre «0». Lorsqu'un atome est dans un état de basse énergie, il est limité par le puits potentiel $U(R)$	30
Figure 3. 4	Pousser un swing autour de sa position d'équilibre ('0'). Si le swing est poussé depuis la position d'équilibre '0', il faut un temps de $T/4$ pour atteindre l'amplitude maximale R_0 . Si la force de poussée dure plus longtemps que $T/4$, la partie de la force de poussée qui est plus longue que $T/4$ agit dans la direction opposée au mouvement de rotation, empêchant ainsi le mouvement de la balançoire et réduisant son amplitude d'oscillation.....	31
Figure 4. 1	Un diagramme schématique d'un seul bactériophage M13. Les étiquettes indiquent l'emplacement de chacune des cinq protéines qui constituent la capsid virale du bactériophage [8].....	33
Figure 4. 2	Composants et structure de la capsid du bactériophage MS2 [14]. A/ Représentation des structures : dimère symétrique C/C (rouge) et dimère asymétrique A/B	

(bleu/vert). La liaison du dimère C/C sur la séquence type « tige-boucle » de l'ARN viral de 19 nucléotides provoque le passage en conformation A/B de ces dimères. B/ Structure d'un bactériophage MS2 [14].....	34
Figure 4. 3 Colonies de bactéries dans une boîte de Petri contenant le LB agar comme milieu de culture.....	37
Figure 4. 4 Illustration schématique de la dilution de phages.....	41
Figure 4. 5 Schéma de la chaîne d'amplification à la dérive des fréquences : 1) Oscillateur 2) Impulsion femtoseconde (faible énergie) 3) Étireur 4) Impulsion étirée (faible énergie) 5) Amplificateur régénératif (Figure 4 (a)) 6) Impulsion étirée (haute énergie) 7) Compresseur 8) Impulsion femtoseconde (haute énergie).....	45
Figure 4. 6 Montage expérimental. Les diagrammes A, B et C concernent des expériences avec le laser 10 Hz à différentes longueurs d'onde: (A): 800 nm; (B): 400 nm et (C): 800 nm et 400 nm.....	48
Figure 5. 1 Réduction de charge du bactériophage M13 en fonction du temps d'irradiation pour les différentes longueurs d'onde laser. Toutes les données (n = 3) sont exprimées sous forme de moyenne ± écart type.....	53
Figure 5.2 Électrophorèse sur gel d'agarose d'ADN génomique extrait du phage M13 exposé à d'impulsions laser ultra-courtes à 400 nm.....	59
Figure 5. 3 Pourcentage d'ADN M13 endommagé après une exposition à des longueurs d'onde laser de 400 nm (bleu) et de 800 nm (rouge).....	60
Figure 5. 4 Réduction logarithmique de bactériophages M13 en fonction de la durée d'impulsion pour différentes longueurs d'onde d'excitation. Toutes les données (n = 3) sont exprimées sous forme de moyenne ± écart type. La durée d'exposition était de 2 minutes pour 400 nm et 800/400 nm et de 8 minutes pour 800 nm.....	63
Figure 5. 5 Réduction logarithmique de bactériophages M13 après le traitement laser femtoseconde selon les densités d'énergie et les longueurs d'onde d'excitation. Toutes les données (n = 3) sont exprimées sous forme de moyenne ± écart type. La durée d'exposition était de 2 minutes pour 400 nm et 800/400 nm et de 8 minutes pour 800 nm.....	67
Figure 5. 6 Représentation schématique de diagramme énergétique montrant les conditions d'absorption directe d'un photon de lumière visible par un système biologique tel qu'un virus. Pour simplifier, les états vibrationnels ne sont pas représentés.....	73

Figure 5. 7	Quantification le taux d'inactivation virale de bactériophage M 13 en fonction de la dérive de fréquence (chirp) pour différentes longueurs d'ondes. Toutes les données (n = 3) sont exprimées sous forme de moyenne ± écart type. La durée d'exposition.....	76
Figure 5. 8	Réduction logarithmique du bactériophage M13 et MS2 en fonction du temps d'irradiation pour différentes longueurs d'onde laser. Toutes les données (n = 3) sont exprimées sous forme de moyenne ± écart type.....	79
Figure 5. 9	Réduction logarithmique de bactériophages M13 et MS2 en fonction de la durée d'impulsion laser d'excitation pour différentes longueurs d'onde. Toutes les données (n = 3) sont exprimées sous forme de moyenne ± écart type.....	91
Figure 5. 10	Réduction logarithmique de bactériophages M13 et MS2 après le traitement laser femtoseconde selon les densités d'énergie et les longueurs d'onde d'excitation. Toutes les données (n = 3) sont exprimées sous forme de moyenne ± écart type. Le temps d'exposition est 20 min.....	93
Figure 5. 2	Réduction logarithmique de bactériophages MS2 (A) et M13 (B) en fonction du temps d'irradiation pour différentes valeurs du pH. L'énergie de rayonnement est d'environ 10 mJ par impulsion, avec un taux de répétition de 10 Hz et la durée d'impulsion est de 40 fs.....	97
Figure 5. 3	Réduction logarithmique de bactériophages M13 (A) et MS2 (B) dans du tampon PBS contenant 15, 50 et 150 mM de HNa ₂ O ₄ P a pH4 en fonction du temps d'irradiation. Toutes les données (n = 3) sont exprimées sous forme de moyenne ± écart type.....	99
Figure 5. 4	Évolution des concentrations en particules MS2 et M13 infectieux après 20 min de traitement laser à 400 nm dans du tampon PBS contenant différentes concentrations de NaCl:20, 137, 257 et 300 mM à pH7.....	100
Figure 5. 5	Série de Hofmeister [4-5].....	102
Figure 5. 6	Quantification du taux d'inactivation virale de MS2 et M13 après 20 min de traitement laser à 400 nm dans du tampon PBS en fonction de la concentration initiale pour les deux suspensions.....	104
Figure 5. 7	Représentation schématique des effets potentiels du volume exclu sur le comportement des protéines en milieu surpeuplé [30].....	106
Figure 5. 8	Quantification du taux d'inactivation virale de MS2 (A) et M13(B) purifié et non-purifié après 20 min de traitement laser à 400 nm dans du tampon PBS.....	108

Figure 5. 9	Quantification le taux d'inactivation virale de de bactériophage avec et sans tempol pour différentes longueurs d'ondes. Toutes les données (n = 3) sont exprimées sous forme de moyenne ± écart type. La durée d'exposition était de 2 minutes pour 400 nm et 800/400 nm et de 8 minutes pour 800 nm.....	112
Figure 5. 10	Schéma du dispositif expérimental pour la détection optique indirecte de l'oxygène singulet.....	115
Figure 5. 20	Spectres de fluorescence de Rhodamine avec éthanol. La longueur d'onde d'excitation était de 400 nm.....	116
Figure 5. 11	Spectre de chimiluminescence de la sonde de FCLA mesures en solution de H ₂ O ₂ /NaClO lors d'une réaction avec ¹ O ₂ a différent concentration de la sonde.....	118
Figure 5. 12	Signal de chimiluminescence de la sonde FCLA mesures en solution de H ₂ O ₂ /NaClO lors d'une réaction avec ¹ O ₂ a différent concentration de la sonde.....	119
Figure 5.23	Spectre et signal de chimiluminescence représentatif de FCLA- ¹ O ₂ mesures en solution de H ₂ O ₂ /NaClO (ligne noir) et de M13+FCLA (ligne rouge).....	120

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1. 1	Énergie de certaines liaisons retrouvées dans les systèmes biologiques [14].....	4
Tableau 1. 2	La liste complète des agent infectieux inactivés par laser femtoseconde à ce jour [45].....	11
Tableau 1. 3	Les paramètres d'exposition au laser utilisés dans les articles publiés sont comparés aux paramètres d'exposition au laser utilisés pour nos expériences.....	13
Tableau 2. 1	Rétention de l'activité du facteur de coagulation pour le plasma traité au laser avec des impulsions ultra courtes [1].....	18
Tableau 4. 1	Des propriétés clés des capsides virales couramment utilisées pour construire de nouveaux matériaux.....	35
Tableau 4. 2	Composante de milieu saline tamponnée PSB.....	36
Tableau 5. 1	Paramètres laser femtoseconde utilisés pour l'inactivation des virus.....	51
Tableau 5. 2	Les paramètres de la cinétique d'inactivation de du modèle de Weibull pour bactériophage M13 en fonction de temps de traitement pour différentes longueurs d'onde d'excitation.....	57
Tableau 5. 3	Temps requis par chaque longueur d'onde d'excitation pour obtenir l'élimination de $4 \log_{10}$, $3 \log_{10}$ et $2 \log_{10}$ et $1 \log_{10}$ des bactériophages M13 selon des modèles linéaires et de Weibull.....	58
Tableau 5. 4	La réduction virale et l'efficacité germicide (η) pour l'inactivation des bactériophages M13 soumis à un traitement laser femtoseconde et cela pour différentes longueurs d'onde. La densité d'énergie est de 25.5 mJ cm^{-2}	69
Tableau 5. 5	Les paramètres de la cinétique d'inactivation, estimés par les modèles: modèle linéaire et Weibull en fonction de temps de traitement pour différentes longueurs d'onde d'excitation.....	85
Tableau 5. 6	Les paramètres de la cinétique d'inactivation de phages M13 et MS2, estimés par le modèle biphasique pour différentes longueurs d'onde d'excitation.....	86
Tableau 5. 7	Comparaison des modèles log-linéaires, de la distribution de Weibull et biphasiques pour un meilleur ajustement aux courbes de survie de M13 et MS2 à 800, 400 et 800/400 nm.....	89

Tableau 5. 8 Temps requis pour chaque longueur d'onde d'excitation pour réduire le nombre de agent infectieux de 4 log₁₀, 3 log₁₀ et 2 log₁₀ et 1 log₁₀ selon des modèles de Weibull et de biphasique.....90

Tableau 5. 9 La réduction virale et l'efficacité germicide (η) pour l'inactivation des bactériophages M13 et MS2 soumis à un traitement laser femtoseconde et cela pour différentes longueurs d'onde. La densité d'énergie est de 25.5 mJ cm⁻²94

LISTE DES ABRÉVIATIONS

VIH	Virus de l'immunodéficience humaine
VHC	Virus de l'hépatite C
SRMO	Syndrome respiratoire du Moyen-Orient
ADN	Acide Désoxyribonucléique
ARN	Acide Ribonucléique
eV	Électron-volt
UV	Rayons ultraviolets
ROS	Espèces réactives de l'oxygène (Reactive oxygen species)
ISRS	Impulsive diffusion Raman stimulée «Impulsive Stimulated Raman Scattering»
PSL	Produits sanguins labiles
TRALI	Transfusion related acute lung injury
CGR	Concentrés de globules rouges
CMV	Infection à cytomégalovirus
I.E.V	Inactivation entière des virus
ssDNA	ADN simple brin (single strand DNA)
PBS	Phosphate Buffered Saline
LB agar	Luria-Bertani medium Agar
LB	Broth Lysogeny broth Miller
D.O.	Densité optique.
PEG	Polyéthylène glycol
UFP	Unités formant plages par millilitre «Unités Formant Plages»
PCR	Chaîne de la polymérase
Ti : Sa	Titane Saphir

ALLS	Advanced Laser Light Source
Al₂O₃	Le cristal de saphir
CPA	Chirped Pulse Amplification
SPIDER	Spectral phase interferometry for direct electric-field reconstruction
FROG	Frequency-Resolved Optical Gating
KDP	potassium-dideuterium phosphate
SHG	Seconde Harmonique
SD	Écarts-types
MSE	Erreur quadratique moyenne
pH	Potentiel hydrogène
DTS	Dispersion Technology Software
DLS	Diffusion dynamique de la lumière (Dynamic Light Scattering)
CL	Chimiluminescence
PMT	Photomultiplicateur

1 INTRODUCTION ET PROBLÉMATIQUE

1.1 Introduction

Les pathogènes représentent une menace constante pour tous les organismes vivants. Les pathogènes attaquent les humains, les plantes, les animaux et les bactéries. Ils provoquent une multitude de maladies chez l'homme et ils sont une menace pour l'agriculture. Ils ont tourmenté les humains depuis la préhistoire et ils évoluent au fil du temps dans de nouvelles entités qui résistent aux traitements et se propagent plus efficacement. À titre d'exemple dramatique, l'apparition d'agents tels que le virus de l'immunodéficience humaine (VIH) et le virus de l'hépatite C (VHC) dans les années 1970 ont provoqué des millions d'infections et de décès dans le monde entier. Nous faisons maintenant face à une liste grandissante de nouvelles menaces, notamment les virus de la grippe aviaire, les nouveaux coronavirus tels que le syndrome respiratoire du Moyen-Orient (SRMO) et les virus transmis par les moustiques tels que la dengue et le virus Zika. Bien d'autres feront leur apparition par évolution ou bioterrorisme. Bien que notre connaissance des agents pathogènes continue de croître, la situation sur le champ de bataille reste dans une impasse inconvenante.

Selon les études, l'inactivation des agents pathogènes peut être expliquée différemment. Clairement, l'inactivation est la perte d'infectivité des pathogènes dans la suspension. Dans le cas de virus c'est le résultat d'une altération de leur capsid [1, 2]. Une capsid altérée signifie que le virus n'est pas infectieux mais ceci n'implique pas nécessairement une altération de son génome désoxyribonucléique (ADN) ou ribonucléique (ARN). Au contraire, une altération du génome implique obligatoirement une altération de la capsid du virus. L'inactivation des pathogènes est une approche proactive dont une activité antimicrobienne de large spectre peut prévenir les infections des pathogènes connues ou inconnues. Le domaine de l'inactivation des agents pathogènes englobe toutes les méthodes chimiques et physiques utilisées pour inactiver les pathogènes. Ces méthodes comprennent le formaldéhyde, les détergents, l'eau de Javel, la chaleur, l'irradiation, les micro-ondes, les ultrasons et les produits photochimiques activés par la lumière. Les techniques physiques, visant à remplacer les additifs chimiques, offrent une meilleure image (préservation du naturel). Ces techniques physiques regroupent, entre autres, l'irradiation (Rayons X, Rayons γ), les ultraviolets (UV), micro-ondes... . Certaines d'entre elles, comme les ultraviolets, sont de bons candidats pour l'utilisation en industrie, en tant que techniques athermiques d'inactivation microbiologique [3-5]. Il est important de connaître les

principes de ces différentes méthodes, mais également les limites qu'elles peuvent présenter, dans le but de déterminer les applications possibles, et les intérêts industriels de ces technologies traditionnelles d'inactivation. Afin de mieux cibler les besoins et les problèmes rencontrés, il est indispensable d'avoir un certain recul sur les traitements appliqués. Le traitement pharmaceutique sera étudié dans une première partie. Ensuite, quelques-unes des nouvelles technologies physiques les plus utilisées seront détaillées et comparées. Enfin, le nouveau procédé de décontamination par le laser femtoseconde, sujet principal de cette étude, fera l'objet d'une troisième partie. Nous expliquerons pourquoi cette technologie se distingue des autres, et quelle pourrait être sa place dans le secteur industriel actuel.

1.1.1 Les méthodes traditionnelles pharmaceutiques

Diverses approches pharmaceutiques ont été développées pour traiter les infections virales. Ce domaine est dominé par des médicaments à petites molécules qui se lient aux protéines virales et empêchent les protéines de fonctionner correctement, ainsi que des médicaments d'anticorps (protéines) qui bloquent la fixation des particules virales aux cellules [6-7]. Les antirétroviraux sont des molécules de synthèses de différentes natures chimiques regroupées en trois grandes classes selon leur mode d'action [8-11]: deux classes d'inhibiteurs de la transcriptase inverse et une d'inhibiteurs de protéase. Les principales cibles des médicaments sont les enzymes virales du cycle de la réplication virale, lesquelles sont différentes selon les virus et impliquent les enzymes virales spécifiques à chaque virus. Le succès de ces médicaments chimiques et biologiques dépend entièrement de la forme et de la structure moléculaire qu'ils ciblent. Malheureusement, de nombreux pathogènes, y compris le VIH et le virus de la grippe, sont en constante mutation de leur génome, ce qui provoque la modification de leurs structures virales, de sorte que les médicaments ne peuvent plus les affecter. En général, le développement de traitements antiviraux contre un nouveau virus est un processus long et incertain qui nécessite une étude approfondie des structures détaillées du virus et de nombreuses années de tests de médicaments. Lorsque ces traitements arrivent finalement sur le marché, ils perdent fréquemment leur efficacité en raison d'une mutation génétique virale. Bientôt de nouveaux médicaments sont nécessaires, l'approche médicamenteuse est réactive, et vient toujours un pas derrière les pathogènes. Un autre problème lié à l'utilisation des antiviraux est celui des infections comme les infections à herpes-virus ou au VIH, qui sont des infections persistante de l'organisme. Les antiviraux ne bloquent que les phases actives de la réplication et ne peuvent éliminer le génome viral du chromosome cellulaire. Il n'y a pas d'éradication virale de l'organisme. Ils sont donc uniquement virustatiques, ce qui implique des traitements continus en

cas de réplication chronique. Cela génère un risque de développements de souches virales résistantes aux traitements; c'est une question particulièrement importante pour le VIH qui implique des traitements au long cours. De plus, les antirétroviraux ne sont pas des médicaments anodins. Ils présentent tous une certaine toxicité pour l'organisme, responsable d'effets secondaires ou indésirables plus ou moins marqués à court, moyen et long terme. De plus, les médicaments font tous face à un obstacle énorme: ils doivent éviter de s'attacher à toutes les structures cellulaires qui se trouvent normalement dans le corps, où ils peuvent provoquer des effets secondaires graves. Ces effets secondaires sont variés, bénins ou graves, et diffèrent selon le moment de leur apparition et la classe ou le type de molécule utilisée. Ces limitations montrent clairement que même si les médicaments peuvent offrir des solutions temporaires, une stratégie antivirale plus définitive sera la voie de l'avenir.

1.1.2 L'effet des rayons gamma et des rayons X sur les systèmes biologiques

Les énergies vibrationnelles des molécules sont généralement inférieures à 2000 cm^{-1} (ou 0.25 eV) [12], alors que l'énergie des photons gamma ou des rayons X est au moins 10^5 fois supérieure. Ainsi, par la loi de conservation de l'énergie, les photons gamma ou les rayons X ne peuvent pas être absorbés directement par les niveaux vibrationnels moléculaires. Au contraire, lorsqu'on éclaire une matière organique (tel qu'un virus) avec des rayonnements gamma ou des rayons X, on soumet les atomes de la cible à une pluie de photons (particules de lumière) très énergétiques dont l'énergie est de l'ordre de 1 MeV . Ceci a pour résultat d'arracher de nombreux électrons du matériau biologique via l'effet photoélectrique (figure 1.1). Dans le cas de l'effet photoélectrique, ce n'est donc pas le nombre de photons qui compte pour que le phénomène se produise mais la quantité d'énergie que chacun véhicule. L'intégralité de l'énergie d'un photon incident est transférée à un électron de l'un des atomes du milieu atténuant. Il y a une absorption totale du photon (et donc une atténuation du faisceau). L'énergie absorbée est d'autant plus utilisée pour ioniser un des électrons atomiques. On entend par rayonnement ionisant tout rayonnement susceptible d'arracher un électron à la matière. Par exemple, l'énergie d'ionisation d'un atome d'hydrogène est de 13.6 eV [13, 14], ce qui signifie qu'il faut 13.6 eV d'énergie pour retirer un électron d'un atome d'hydrogène.

Effet photoélectrique dans une macromolécule excitée par rayonnement gamma ou X.
 E_L : énergie des photons

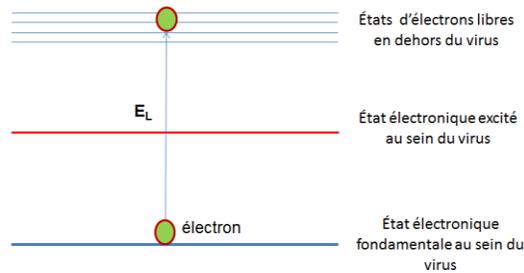


Figure 1. 1 Diagramme d'énergie électronique d'un système biologique tel qu'une particule virale excitée par rayonnement gamma ou rayons X [13].

Toutefois, lors de l'interaction du rayonnement avec la matière, toute l'énergie n'est pas déposée sur une cible unique. Des phénomènes d'excitation de la matière ont lieu et conduisent à une perte d'énergie de l'onde incidente. On considère qu'il faut environ 33 eV pour ioniser la matière [13, 15-19]. Cette énergie est à comparer avec les énergies de liaison C-C (3.6 eV) et celle de la liaison O-H (5.16 eV) (Tableau 1.1). Elle est suffisante pour entraîner la dissociation des molécules. Bien qu'elle paraisse faible (quelques électronvolts), au niveau d'une mole, elle représente des énergies considérables. Une énergie de 1 eV par atome représente 96.5 kJ.mol^{-1} (23 kilocalories par mole).

Tableau 1. 1 Énergie de certaines liaisons retrouvées dans les systèmes biologiques [14].

Liaison	Énergie (kJ.mol ⁻¹)	Énergie (eV)
O-H	480	4.974
C-H	410	4.249
N-H	390	4.041
C-O	370	3.834
C=C	830	8.601
C≡N	850	8.808

L'énergie cédée par les rayonnements ionisants à un organisme vivant entraîne, à l'échelle du matériel cellulaire, des lésions qui peuvent en altérer le bon fonctionnement, voire provoquer la mort cellulaire [19-22]. Dans une cellule vivante, toutes les molécules présentes peuvent être touchées. Cependant deux molécules ont une importance particulière: il s'agit de la molécule d'eau par son abondance au sein des cellules et de la molécule d'ADN/ARN du fait des conséquences majeures pouvant être dues à la modification de sa structure. Les effets

moléculaires sont soit directs, soit indirects [15-22]. L'action directe est due au transfert direct de l'énergie du rayonnement; la molécule ionisée ou excitée devient instable et va expulser l'excédent d'énergie soit par émission de photons de fluorescence, soit par rupture de liaisons chimiques qui pourront être à l'origine de lésions moléculaires. L'action indirecte est illustrée par la radiolyse de l'eau: sous l'influence des rayonnements ionisants, une molécule d'eau se décompose en deux radicaux libres porteurs d'un électron non apparié ou « célibataire ». Chimiquement instables et très réactifs, il s'agit de substances oxydantes (OH) et réductrices (H). Les radicaux libres (OH et H) ainsi formés agissent à leur tour sur d'autres molécules initiant ainsi une cascade de réactions, entraînant de nouvelles lésions moléculaires [6-9]. De nombreuses molécules (protéines, lipides, glucides, enzymes, ADN et ARN) peuvent être altérées par les rayonnements ionisants; les conséquences dépendent de l'importance biologique de la molécule lésée.

Il est établi que les rayonnements peuvent produire des effets au niveau des cellules, entraînant des dommages létaux ou non létaux importants (modification en raison de lésions directes sur les brins ADN ou ARN d'un chromosome) aux systèmes biologiques [19-22]. Si le nombre de cellules endommagées voire mortes est important, cela peut perturber le fonctionnement d'un organe ou même mener à la mort. L'ADN/ARN peut également être endommagé sans nécessairement provoquer la mort de la cellule. Généralement, ces lésions sont complètement réparées mais dans le cas contraire, la modification occasionnée, appelée mutation génétique, sera transmise au cours des divisions cellulaires successives avec le risque de causer un cancer à terme. Si les cellules mutées sont celles qui transmettent les informations héréditaires, des anomalies génétiques pourraient apparaître dans la descendance.

1.1.3 L'effet des rayonnements ultraviolets sur les systèmes biologiques

Les rayons ultraviolets, quant à eux, sont des rayonnements de type électromagnétique formés d'un photon émis à des longueurs d'ondes entre 100 et 400 nm. Leur niveau d'énergie (3-12.4 eV) ne leur confère pas de pouvoir ionisant mais ils peuvent tout de même avoir des effets très dommageables au sein d'une cellule vivante. Les ultra violets (UV) sont divisés en trois groupes en fonction de leurs longueurs d'ondes: les plus proches du spectre visible (entre 315 nm et 380 nm) sont les UV-A, les UV intermédiaires (entre 280 nm et 315 nm) sont les UV-B, et les longueurs d'ondes les plus éloignées du spectre visible (entre 100 nm et 280 nm) sont les UV-C [22]. Pour chaque longueur d'onde émise, des photons présentant des énergies spécifiques sont produits. Ces photons sont absorbés par différentes molécules selon leur énergie. La

courte longueur d'onde des UV-C font qu'ils sont moins pénétrants mais les plus énergétiques que les autres gammes d'UV. Les rayonnements UV-C ont une action virucide due au spectre d'absorption des acides nucléiques qui composent le matériel génétique des virus. En effet, les acides nucléiques absorbent les longueurs d'onde comprises entre 210 et 310 nm avec un maximum à 260 nm [3-5]. Les conséquences des UV sur les agents infectieux diffèrent en fonction de leur niveau énergétique [23]. Les radiations ultraviolettes peuvent altérer l'ADN des cellules. C'est l'absorption des photons par l'ADN qui conduit à la formation d'une lésion de la double hélice. En effet, le photon ultraviolet apporte suffisamment d'énergie pour créer un dimère de thymine (Figure 1.2). Mais cette liaison ne se produit pas par hasard le long de l'ADN. Sa localisation semble dépendre de l'ordre et de l'enchaînement des bases azotés. Il faut également savoir que les ultraviolets agressent plus facilement les bases de l'ADN -en les oxydant- lorsque ces dernières sont intégrées dans la structure en double hélice que lorsqu'elles sont isolées. La présence de ces dimères perturbe le fonctionnement cellulaire et provoque la mort de cellules, c'est-à-dire l'apoptose.

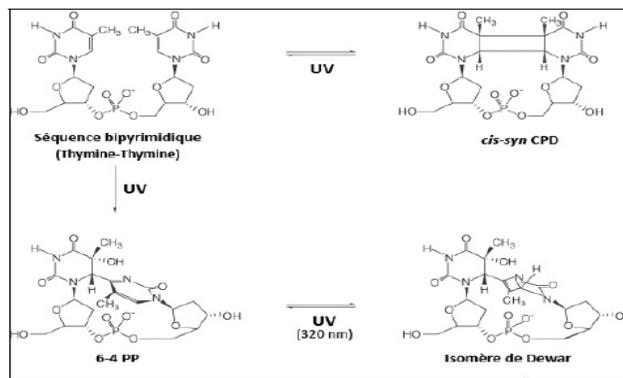


Figure 1. 2 Les principaux types de lésions induites par les UV [23]

Les UV peuvent également induire des dommages sur l'ADN de façon indirecte. En effet, les UVA ne sont que très faiblement absorbés par les bases de l'ADN mais ils peuvent exciter des chromophores cellulaires, appelés photo sensibilisateurs, comme les mélanines, les porphyrines, la riboflavine, le tryptophane, etc. [23-27]. Les photos sensibilisateurs excités par l'absorption des photons UV peuvent revenir à leur état d'énergie fondamental par dissipation de chaleur ou émission de photons (c'est le phénomène de fluorescence) mais ils peuvent également subir une transition vers un état énergétique plus stable appelée état triplet. Cet intermédiaire joue un rôle clé dans l'induction des dommages liés aux UVA. Il peut réagir directement avec d'autres molécules, comme les bases de l'ADN, (photosensibilisation de type

l) ou transférer son énergie aux molécules d'oxygène (photosensibilisation de type II), menant ainsi à la formation d'espèces réactives de l'oxygène («reactive oxygen species», ROS) comme l'oxygène singulet ($^1\text{O}_2$) ou l'anion superoxyde. Le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) est formé par dismutation de l'anion superoxyde. Les rayonnements UV peuvent être utilisés pour détruire les agents pathogènes, mais, comme les rayons gamma et les rayons X, ils endommagent sans discrimination tous les acides nucléiques et protéines sur leur chemin et induit la formation de souches mutées de pathogènes, un effet secondaire indésirable du traitement.

1.1.4 L'effet des micro-ondes sur les systèmes biologiques

Les fréquences des modes vibrationnels acoustiques globaux, à basse fréquence, des agent infectieux sont typiquement de l'ordre de 30 GHz à 300 GHz ($1. \text{cm}^{-1}$ - $10. \text{cm}^{-1}$) [28, 29]. Un des effets les plus connus des micro-ondes est leur capacité à mettre en résonance les molécules, provoquant une hausse de leur température. Le degré de réchauffement résultant dépend de l'intensité de la radiation et du temps d'exposition. L'énergie absorbée peut être suffisante pour provoquer de subtils changements dans la conformation de l'architecture moléculaire, provoquant des altérations biochimiques par détérioration de l'activité enzymatique [30]. Il existe des "fenêtres de fréquence", dans la gamme de 30 centimètres (1 GHz) à 1 millimètre (300 GHz), dans les quelles les champs électromagnétiques peuvent induire des effets biologiques [31] via le processus d'absorption directe. Cependant, à partir du spectre d'absorption de l'eau montré à la figure 1.3 [32], nous pouvons voir que les ondes électromagnétiques avec une longueur d'onde de 0.3 cm peuvent seulement pénétrer dans l'eau à une profondeur d'environ 0.1 mm; en d'autres termes, l'énergie des micro-ondes est fortement absorbée par l'eau et provoque le réchauffement de l'eau, un phénomène familier dans la vie quotidienne. Puisque presque tous les systèmes biologiques pertinents sont incorporés dans l'eau, la méthode d'absorption par micro-ondes cuit en effet le matériau et endommage toutes les structures à l'intérieur. Les micro-ondes ne sont donc pas idéales pour l'inactivation ou pour traiter les produits sanguins contaminés.

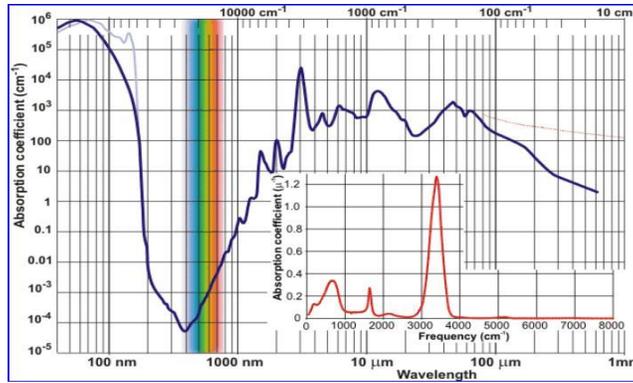


Figure 1.3 Spectre d'absorption de l'eau pour les ondes électromagnétiques. La bande verticale bleue marquant les longueurs d'onde comprises entre 400 et 700 nm indique la gamme de longueurs d'ondes couverte par la lumière visible. Le minimum d'absorption dans cette région est centré à environ 450 nm [32].

1.1.5 L'effet des ondes sonores sur les systèmes biologiques

Une onde sonore est une vibration mécanique pouvant se propager dans un milieu matériel (gaz, liquide ou solide). Les ondes sonores sont dénommées ultrasons quand leur fréquence est supérieure à 20 kHz. Dans l'eau, les ultrasons génèrent des bulles par cavitation. Ces bulles implosent en générant une grande pression et chaleur locale. Dans ces conditions extrêmes, des réactions chimiques qui ne se forment pas avec des conditions normales de température et de pression peuvent se produire. Il s'agit là du champ de la sonochimie [33-36]. Le pouvoir décontaminant des ultrasons a été mis en évidence en 1929 [37]. Le mécanisme est compris beaucoup plus tard: la cavitation générée par ultrasons crée des ondes de cisaillements sur les membranes cellulaires qui se disloquent et donc détruisent les agents infectieux [33-37]. Des expériences sur *E. coli* et *E. faecalis* ont montré qu'une exposition de six à dix impulsions par seconde, pendant dix minutes, permettent une inactivation de 3 log₁₀ [38]. Les auteurs ont aussi montré que l'efficacité de décontamination ne dépend pas de la charge bactérienne. Par ailleurs, une spécificité de souche y a également été notée. S'il est connu que les ultrasons peuvent générer des espèces chimiques oxydatives par sonochimie comme le peroxyde d'hydrogène (H₂O₂) [38-40], l'effet de décontamination est principalement dû aux ultrasons eux-mêmes [41]. Comme les micro-ondes, les ondes sonores subissent une absorption importante à la fréquence vibrationnelle virale d'environ 100 GHz [42]. Les ondes sonores chauffent donc le matériel biologique, inactivant (détruisant) les pathogènes sans sélectivité.

1.1.6 L'effet du laser femtoseconde sur les systèmes biologiques

Les technologies de décontamination existantes, telles que l'irradiation par la lumière ultraviolette, les rayons gamma, l'absorption par micro-ondes et les traitements pharmaceutiques ont toutes une limite d'application lors du traitement de l'infection causée par une bactérie résistante aux antibiotiques. La lumière ultraviolette et les rayons gamma sont une technique bactéricide efficace. Cependant, les irradiations UV et gamma n'ont aucune sélectivité entre les bactéries nocives et les cellules tissulaires car le photon de haute énergie provoque une réticulation ou une dissociation des liaisons chimiques le long de son trajet de propagation. Un autre inconvénient de ces deux traitements est le risque de mutation génétique à la fois sur le tissu infecté et sur les souches de bactéries, car l'énergie des photons est si élevée qu'elle pourrait briser le lien covalent dans les acides nucléiques. Pour les raisons susmentionnées et pour d'autres raisons analogues, il est nécessaire de développer des nouvelles méthodes qui seront efficaces pour inactiver les agents infectieux indésirables tels que les virus et les bactéries, tout en laissant les cellules sensibles indemnes.

Récemment, la technologie laser femtoseconde par l'intermédiaire d'un processus appelé impulsive diffusion Raman stimulée « Impulsive Stimulated Raman Scattering- ISRS » pourrait être efficace dans l'inactivation des virus non pathogènes [13, 43-53]. Le processus *ISRS* est un mécanisme qui agit sur le virus par l'intermédiaire de ses modes normaux de vibration conduisant ainsi à la destruction des bactéries et des virus [43-53]. Il nécessite donc des impulsions laser plus courtes que la période de vibration de mode de l'échantillon considéré [13, 43].

Les impulsions laser femtoseconde, émettant directement dans le visible ou le proche infrarouge inactive les agents pathogènes de manière sélective à travers le processus *ISRS* [13, 43-56], générant des vibrations moléculaires qui conduisent à des dommages critiques dans les structures pathogènes telles que les capsides virales. Une capside virale, étant un groupe de protéines à haute densité, est particulièrement sensible à la désintégration /l'agrégation induite par l'*ISRS*. Une fois endommagée par la destruction ou l'agrégation, la capside ne fonctionne plus correctement pendant le processus d'infection, et le virus perd son pouvoir infectieux. La perturbation mécanique produite par le laser à impulsions ultra-brèves par l'intermédiaire d'*ISRS* au sein des pathogènes diffère radicalement de celle de tous les autres traitements cités avant (le traitement chimique, des rayons X, des rayons gamma et le rayonnement ultraviolet). Les vibrations excitées par le traitement laser femtoseconde

provoquent une perturbation transitoire des liaisons relativement faibles (telles que les liaisons hydrogènes et les contacts hydrophobes) à l'intérieur de la structure protéique d'une particule virale, provoquant des dommages à la capsid du virus et ainsi l'inactivation virale. Le rayonnement laser à impulsions ultra-courtes, émettant directement dans le visible ou l'infrarouge proche, utilisé dans l'inactivation est à peine absorbé par l'eau qui entoure habituellement l'échantillon traité, car l'eau est pratiquement transparente à la lumière visible/ infrarouge proche [43, 44, 53]. De plus, l'énergie relativement faible des photons de 3.10 eV générés par le laser femtoseconde émettant à une longueur d'onde de 400 nm (pour $\lambda=800 \text{ nm}$, elle est de l'ordre de 1.55 eV) signifie que les faibles liaisons hydrogènes entre les protéines ou contacts hydrophobes peuvent être brisés mais pas des liaisons ioniques covalentes de l'ordre de 5 eV [13], les plus fortes qui tiennent des atomes individuels ensemble dans des systèmes biologiques. En revanche, d'autres formes d'énergie telles que les micro-ondes et les ondes sonores sont fortement absorbées par l'eau aux mêmes fréquences que les pathogènes. Cette absorption provoque l'échauffement du produit, et par conséquent l'endommagement non sélectif des matériaux. Comme ce fut décrit précédemment, le processus ISRS est un mécanisme qui agit sur le virus par l'intermédiaire de ses modes normaux de vibration. Ainsi les traitements par ISRS sont susceptibles d'éviter les problèmes de mutation. Par conséquent, la possibilité que des agents pathogènes développent une résistance au traitement est pratiquement inexistante. En effet, il est prouvé que le traitement par le laser à impulsions ultra-brèves a une efficacité à large spectre contre tous les virus, bactéries, champignons et mycoplasmes testés à ce jour (voir tableau 1.2).

L'inactivation des pathogènes par des impulsions femtosecondes ne nécessite l'utilisation d'aucun produit chimique. Il n'y a donc aucun composé résiduel à éliminer. Cela minimise grandement le risque d'effets secondaires lorsque le produit traité est administré à l'homme. Le fait d'éliminer totalement l'utilisation de produits chimiques est un avantage à la fois économique et environnemental. La technologie, probablement moins coûteuse à mettre en place industriellement que l'irradiation (rayons gamma radioactifs ou aux lampes à ultraviolet contenant du mercure), transmet aussi une image beaucoup moins négative auprès des consommateurs, la lumière n'étant pas un procédé émettant ou utilisant de la radioactivité. Un tel système d'inactivation est aussi moins compliqué parce qu'il emploie des équipements universels et un protocole semblable avec des paramètres ajustables pour un spectre spécifique des pathogènes ciblés. Ainsi une pratique de grande envergure de cette méthode peut réduire encore le prix des produits traités.

Tableau 1. 2 La liste complète des agent infectieux inactivés par laser femtoseconde à ce jour [45].

Microorganisme	Propriétés	réduction de la charge
Virus		
Human immunodeficiency Virus (HIV)	Enveloped, single stranded RNA	10 ⁴
Influenza virus (H1N1)	Enveloped, single stranded RNA	10 ⁵
Murine cytomegalovirus (MCMV)	Enveloped, double stranded DNA	10 ⁵
M13 bacteriophage	Non-Enveloped, single stranded DNA	10 ³
MS2 bacteriophage	Non-Enveloped, single stranded RNA	10 ³
Encephalomyocarditis virus (EMCV)	Non-Enveloped, single stranded RNA	10 ³
Murine norovirus (MNV)	Non-Enveloped, single stranded RNA	10 ³
Hepatitis A virus (HAV)	Non-Enveloped, single stranded RNA	10 ³
Enterovirus 71 (EV71)	Non-Enveloped, single stranded RNA	10 ³
Human papillomavirus (HPV)	Non-Enveloped, double stranded DNA	10 ⁵
Bactéries		
Listeria monocytogenes	Gram-positive, double stranded DNA	10 ⁴
Methicillin-resistant Escherichia coli (<i>E. coli</i>)	Gram-positive, double stranded DNA	10 ⁴
Salmonella typhimurium	Gram-negative, double stranded DNA	10 ⁴
Enterobacter sakazakii	Gram-negative, double stranded DNA	10 ⁵
	Gram-negative, double stranded DNA	10 ³
Mycoplasma		
Acholeplasma laidlawii	double stranded DNA	10 ³
Mycoplasma orale	double stranded DNA	10 ³
Fungi (fonge)		
Saccharomyces cerevisiae	double stranded DNA	10 ³

Une des applications immédiates probables de cette technique dans la recherche biomédicale sera les traitements efficaces et sûrs des maladies à diffusion hématogène [44, 47, 48, 53, 55] (voir le chapitre 2: les applications). Inactiver les virus de manière non invasive aura un impact énorme sur la façon dont nous affrontons les maladies virales. Par exemple, les médicaments obtenus à partir de sources animales (comme le facteur VIII porcin et la pancrélipase) sont souvent contaminés par des virus qui, en théorie, peuvent être inactivés par l'ISRS sans effets secondaires sur les composants actifs. Outre son impact sur la médecine, la récente découverte sur l'inactivation du virus par le laser femtoseconde illustre également le peu de

connaissances dont nous disposons sur l'interaction des sources de rayonnement ultracourtes avec les virus et sur les modifications qui en résultent.

Le travail innovateur effectué par le groupe à l'Université d'État de l'Arizona a révélé que l'ISRS pourrait être une méthode efficace d'inactivation des virus, sans endommager les tissus environnants [42-55]. Ce travail a attiré beaucoup d'attention de la communauté scientifique, mais il y a aussi beaucoup de questions qui doivent être répondues avant que la technique puisse être testée dans les applications industrielles. Par exemple, dans leurs travaux (Tableau 1.3), ils ont utilisé un oscillateur laser de très faible énergie (5 nJ/impulsion) et qui fournit des impulsions d'une durée de l'ordre de 100 fs avec une cadence de 80 MHz. La tache focale est d'environ 5 μm de diamètre pour induire le processus d'ISRS. Par conséquent, le volume d'irradiation du laser était petit, laissant ainsi des questions de l'extensibilité de cette technique. En outre, la durée relativement longue de l'impulsion (100 fs) et l'utilisation de seulement deux longueurs d'onde (850 nm et 425 nm) les empêchaient de clarifier le mécanisme détaillé du processus d'inactivation. Afin d'obtenir une inactivation virale significative, les travaux antérieurs [43-57] ont nécessité des durées d'exposition au rayonnement laser relativement longues (1 heure ou plus). Compte tenu de ces désavantages de cette technique, il est urgent d'éliminer la question du volume d'irradiation limité et de raccourcir le temps nécessaire pour inactiver les virus en utilisant des lasers femtoseconde.

Notre étude s'inscrit dans le cadre de la compréhension des mécanismes d'inactivation des particules virales suite à un traitement laser femtoseconde. Les objectifs généraux, au départ, étaient de mettre en place une stratégie expérimentale dans le but d'améliorer et d'accélérer l'inactivation des agents infectieux en optimisant les différents paramètres du laser femtoseconde et de déterminer les phénomènes impliqués dans les mécanismes d'inactivation des bactériophages. À cette fin, deux bactériophages MS2 et M13 qui présentent des propriétés de surface et biologiques différentes ont été exposés à un laser femtoseconde dans le visible et l'infrarouge proche. L'efficacité de l'inactivation des agents infectieux par le traitement laser femtoseconde dépend des différents paramètres du laser tels que la durée d'impulsion, l'énergie d'irradiation, longueur d'onde d'excitation et la durée d'exposition. Il est observé que les durées d'impulsions laser ultra-courtes sont favorables pour une inactivation efficace du virus. La fonctionnalité des bactériophages M13 et MS2 est montrée être dépendante de la densité énergétique d'irradiation du laser d'excitation ainsi que du temps d'exposition. La diminution de la densité d'énergie semble réduire l'efficacité de l'inactivation des virus. L'augmentation du temps d'exposition induit une destruction progressive des particules.

Tableau 1.3 Les paramètres d'exposition au laser utilisés dans les articles publiés sont comparés aux paramètres d'exposition du laser utilisé pour nos expériences.

Référence	44	51	Proposé	57
Type de laser	Diode pumped CW mode-locked Ti-sapphire	Diode pumped CW mode-locked Ti-sapphire	Femto seconde laser.	Fibre Oscillateur laser
Puissance de sortie (mW)	500	40	200	Non précisé
Longueur d'onde centrale(s)	850 nm	425 nm (seconde harmonique de 850 nm)	800 nm, 400 nm et les deux longueurs d'onde combinées 800 nm et 400 nm	776 nm (seconde harmonique de 1.55 μ m)
Cadence des impulsions	80 MHz	80 MHz	10 Hz	5 kHz
Durée d'impulsion	80 fs	100 fs	40 fs	600 fs
Énergie par impulsion	Non précisé	0.5 nJ	20 mJ	1.4 μ J
Gamme d'irradiance	5 to 60 MW.cm ⁻²	5 to 80 MW/cm ²	0.6 TW cm ⁻²	100 MW/cm ² to 22 GW/cm ²
Modifier la densité de puissance	Variation de la tache focale par des lentilles	Variation de la tache focale par des lentilles	Variation par une lame demi-onde et une unité polariseur	Variation de la tache focale par des lentilles
La tache focale	Non précisé	Non précisé	5 mm	Non précisé
Durée d'exposition	1 h	10h	20 min	2h
Volume de l'échantillon irradié	Non précisé	V= 10 ⁻⁴ cm ³ (Diamètre: 100 μ m, hauteur: 1.5 cm).	V= 0.8 cm ³ (Diamètre: 1cm, hauteur : 1. cm)	Non précisé

1.2 Objectifs de l'étude

La connaissance de la persistance et des moyens de réduction du pouvoir infectieux viral, est un enjeu essentiel pour la lutte contre la propagation des infections. Les objectifs de l'étude s'inscrivent dans le cadre de la compréhension des mécanismes d'inactivation des pathogènes, principalement des bactériophages M13 et MS2, suite à un traitement laser femtoseconde. Les objectifs généraux, au départ, étaient de mettre en place une stratégie expérimentale dans le but d'améliorer et accélère l'inactivation des agents infectieux en mettant l'accent sur le rôle

joué par les paramètres du laser femtoseconde et de déterminer les phénomènes impliqués dans les mécanismes d'inactivation des bactériophages. La problématique de la résistance des virus, M13 et MS2, au traitement laser a été abordée. L'hypothèse de l'existence dans une population virale de particules sensibles et résistantes au traitement laser a été étudiée.

Rappelons que les récentes avancées en inactivation par les impulsions ultracourtes sont principalement dues aux études menées sur les mécanismes d'inactivation des pathogènes. Dans ce contexte, en nous appuyant sur une synthèse des études publiées dans la littérature scientifique, nous avons élaboré une étude expérimentale en deux étapes : améliorer et accélère l'inactivation des agents infectieux en optimisant les différents paramètres du laser femtoseconde et de déterminer les phénomènes impliqués dans les mécanismes d'inactivation des bactériophages. Au cours de ces études, nous avons principalement étudié la cinétique d'inactivation des agents infectieux, les dommages occasionnés à ces derniers par de tels traitements et nous avons identifié les caractères responsables de l'inactivation pour, enfin, proposer un mécanisme d'inactivation en spécifiant le rôle et l'importance des différents phénomènes en jeu.

2 LES PERSPECTIVES DE L'INACTIVATION DES AGENTS PATHOGENES PAR DES LASERS FEMTOSECONDE.

Dans cette section, nous parlons d'une méthode scientifique – l'inactivation des agents pathogènes - pour la prévention des maladies infectieuses. Le traitement des pathogènes par le laser femtoseconde est une technologie d'inactivation athermique qui répond à tous les critères mentionnés ci-dessus: elle inactive les agents pathogènes, tout en ayant des effets minimes sur la structure et la fonction des matériaux désirables, et évite la nécessité d'introduire des agents chimiques ou biologiques dans le produit. Cette technique de traitement utilise un laser à impulsions ultra-courtes émettant directement dans le visible ou le proche infrarouge pour inactiver les agents pathogènes de manière sélective en excitant simultanément une multitude de vibrations mécaniques au sein des agents pathogènes eux-mêmes. Les aspects clés de cette technologie la rendent particulièrement prometteuse en tant que système de défense contre les agents pathogènes actuels et futurs. Cette technologie présente le bénéfice théorique de protéger contre de possibles pathogènes émergents, en plus de réduire le risque d'infection de pathogènes déjà connus. L'inactivation est accompagnée de petites quantités de dommages génétiques dus à une rupture de capsidie induite par les impulsions femtosecondes. Ces avantages conduisent à des applications importantes pour l'inactivation par le laser femtoseconde, telles que la sauvegarde de produits sanguins [13, 45, 58] et d'autres produits thérapeutiques, et la production de vaccins pour lutter contre la propagation de maladies infectieuses [13-48]. Ici, nous présentons quelques-unes des applications potentielles que nous envisageons pour cette technologie.

2.1 Décontamination des produits sanguins destinés à la transfusion

Les produits biologiques jouent un rôle important dans le système de santé du monde. Par exemple, le sang et ses composantes incluant les cellules rouges, le plasma, les plaquettes, les immunoglobulines et les facteurs coagulants sont utilisés depuis des décennies dans la transfusion ainsi que dans le traitement des maladies graves comme l'anémie, l'hémorragie et l'hémophilie, etc. Pourtant, l'utilisation clinique de ces produits est très risquée parce qu'ils peuvent contenir une variété des pathogènes du sang. La contamination bactérienne et la prolifération des produits sanguins labiles (PSL) restent le risque infectieux le plus important de la transfusion sanguine [59, 60]. Les incidents transfusionnels liés à la contamination bactérienne (ITCB) des PSL sont, certes rares, mais leur soudaineté, leur gravité et leur

contexte de survenue expliquent la crainte qu'ils inspirent. Les risques associés aux transfusions de produits sanguins labiles se regroupent en plusieurs catégories, notamment : les réactions fébriles, les réactions allergiques, la surcharge circulatoire, les réactions hémolytiques, les dommages pulmonaires aigus liés à la transfusion (ou TRALI, de l'anglais transfusion related acute lung injury) et les maladies infectieuses [59, 60].

Le principe de toute technique d'inactivation est d'utiliser un agent inactivant capable de détruire ou de réduire la charge infectieuse des agents pathogènes présents dans le PSL, qu'ils soient intracellulaires ou extracellulaires. Ces techniques doivent de plus éviter toutes altérations chimiques ou biologiques significatives des produits thérapeutiques. Ainsi, leur efficacité est basée sur la destruction ciblée d'un élément fonctionnel de l'agent pathogène, cet élément étant absent ou n'intervenant pas dans la fonctionnalité du composé sanguin. La plupart des techniques d'inactivation utilisent des agents pathogènes ayant pour cible les membranes ou la capsidie protéique des agents pathogènes ou leurs acides nucléiques. Des stratégies sont développées pour réduire ces pathogènes dans la banque du sang par l'utilisation d'agents physiques ou chimiques. La méthode physique (la déleucocytation par filtration, la déplasmatisation ou lavage des cellules) vise à réduire le contenu viral principalement en diminuant le contenu en leucocytes et/ou en plasma des produits cellulaires [61-64]. Historiquement, cela a été réalisé d'abord avec le procédé de décongélation des CGR cryopréservés, qui conduit à une déleucocytation de $3 \log_{10}$ et à une déplasmatisation [61-64]. Plusieurs évaluations cliniques rapportent l'efficacité de ce type de procédé pour réduire le risque de transmission du CMV (infection à cytomégalovirus), mais on ne peut pas atteindre l'efficacité suffisante pour le risque de transmission des hépatites B et C et du VIH. L'irradiation gamma est un moyen de décontamination virale d'efficacité reconnue pour les produits plasmatiques, mais les doses requises sont beaucoup trop élevées pour être applicables sans dommage aux globules rouges et aux plaquettes. L'irradiation des produits sanguins labiles a pour but de prévenir la survenue de la réaction du greffon contre l'hôte transfusionnelle ou, complication rare mais généralement fatale. La plupart des méthodes chimiques de décontamination virale de PSL cellulaires sont basées sur des réactions photochimiques [64-66]. Un composé photoréactif (amotosalen-HCl, bleu de méthylène, riboflavine, l'inactine) est ajouté au produit qui est ensuite exposé à une source lumineuse de longueur d'onde déterminée pour déclencher la réaction photochimique (figure 2.1). La présence d'hémoglobine dans le sang total et les globules rouges impose, pour la décontamination virale de ces produits, le choix de composées photo-activés à une longueur d'onde située au-delà des

maximums d'absorption de l'hémoglobine. Les composés photoréactifs évalués pour la décontamination virale du sang total et des globules sont en majorité des colorants.

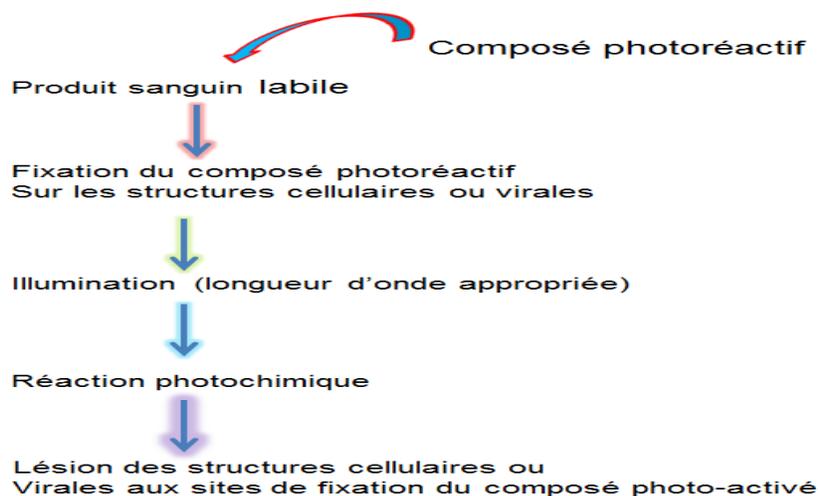


Figure 2. 1 Principe des techniques photochimiques d'inactivation virale des produits sanguins labiles cellulaires [65].

L'efficacité antivirale quantitative de ce type de procédé est satisfaisante (réduction de charge entre 5 et 7 \log_{10}) mais limitée aux virus enveloppés, comme cela est établi in vitro pour des nombreux virus modèles des virus enveloppes et virus pertinents (VIH). La décontamination antivirale peut atteindre les virus libres et les virus associés aux cellules [65-68]. En revanche, ces procédés peuvent être à l'origine de lésions cellulaires, touchant en particulier les globules rouges [65-68]. Des procédés physico-chimiques permettent de réduire le risque de transmission d'infections pour le plasma et ses dérivés. Mais ces procédés ne s'appliquent pas aux globules rouges, qui représentent la majorité des produits sanguins transfusés aux malades chaque année.

La mise en place universelle de l'inactivation des agents pathogènes dans les produits sanguins labiles est un objectif majeur, nécessaire et faisable pour améliorer la sécurité de la transfusion des produits sanguins labiles vis-à-vis des maladies infectieuses transmissibles et mettre les produits sanguins labiles au même niveau de sécurité que les médicaments dérivés du sang, qui ont tous subi une étape d'inactivation des pathogènes. La méthode idéale d'inactivation des agents pathogènes pour les produits sanguins doit satisfaire deux critères [59]. Premièrement, le traitement utilisé pour détruire les virus doit avoir des effets indésirables minimes sur la fonction des globules rouges, des plaquettes et des facteurs de coagulation humains (protéines de coagulation). Deuxièmement, le traitement ne doit pas ajouter de produits chimiques toxiques ou cancérigènes au produit et ne doit pas produire de sous-produits nocifs. Selon ces

critères, il n'existe actuellement aucune méthode idéale d'inactivation des agents pathogènes pour les produits sanguins [60]. Parmi les technologies innovantes, la décontamination par traitement laser femtoseconde présente une alternative séduisante [13, 45, 48, 54, 58]. La technologie laser a montré une réduction de charge entre 3 log₁₀ et 5 log₁₀ d'une variété d'agents pathogènes (voir le tableau 1.1); encore plus important, elle présente une sélectivité entre les pathogènes et les cellules de mammifères (voir le tableau 2.1). Par conséquent, la technologie de traitement par le laser femtoseconde représente une technologie d'inactivation des agents pathogènes probable pour la réduction des pathogènes des produits sanguins.

Tableau 2. 1 Réention de l'activité du facteur de coagulation pour le plasma traité au laser avec des impulsions ultra courtes [58].

Facteur de coagulation	Plasma de contrôle	Plasma irradié au laser	Plage de référence normale	% de réention après traitement
Fibrinogen (mg/dl)	218±4	158.5±2.5	170–400	73
Factor II (IU/ml)	0.82±0.02	0.98±0.03	0.75–1.30	120
Factor V (IU/ml)	0.84±0.01	0.80±0.06	0.50–1.25	95
Factor VII (IU/ml)	0.92±0.01	2.22±0.23	0.50–1.75	241
Factor VIII (IU/ml)	0.72±0.01	0.49±0.01	0.50–1.60	68
Factor IX (IU/ml)	1.01±0.01	0.96±0.09	0.55–1.60	95
Factor X (IU/ml)	1.02±0.03	1.04±0.03	0.60–1.60	102
Factor XI (IU/ml)	1.01±0.01	0.55±0.09	0.60–1.40	54
Factor XII (IU/ml)	0.90±0.00	0.69±0.02	0.45–1.70	77

L'application de cette technologie à l'inactivation des pathogènes dans des produits sanguins peut être réalisée avec des lasers à impulsions ultracourtes fonctionnant à une longueur d'onde d'environ 700 nm, où l'absorption de l'hémoglobine est minimale et les effets néfastes potentiels pouvant être minimisés. La figure 2.2 illustre le concept de réduction des agents pathogènes dans les produits sanguins. Cette méthode est en cours de développement clinique [1-2].



Figure 2. 2 Le concept de réduction des agents pathogènes dans les produits sanguins [1].

2.2 Stérilisation des produits biologiques et les produits pharmaceutiques

Les produits biologiques et pharmaceutiques utilisés en clinique ou dans les laboratoires de recherche comme des réactifs ou des cultures cellulaires peuvent être contaminés par des microbes tels que *Mycoplasma* spp [69], les virus et les bactéries, ce qui peut affecter leur profil d'innocuité et leur fonction biologique [70-71]. Traditionnellement, les virus enveloppés ou des bactéries peuvent être inactivés (détruits) par l'ajout de détergent ou de produits chimiques à base d'alcool. Les virus non enveloppés sont plus difficiles à détruire et sont généralement inactivés soit par le chauffage ou de l'eau de Javel; toutefois, que ce soit le processus de chauffage ou l'addition de tels produits chimiques soulève l'inquiétude des effets secondaires potentiels.

La filtration est un moyen efficace d'éliminer les agents pathogènes, mais elle n'est pas applicable lorsque la taille de l'agent pathogène indésirable est comparable à celle du produit désiré. Dans ces cas, une technique qui peut stériliser de manière non invasive une solution contenant un réactif désiré, la culture cellulaire, ou pharmaceutique, sans modifier la structure du produit ou sa fonction est souhaitable. À cet égard, la technologie laser représente une méthode probable pour accomplir la stérilisation des produits biologiques, les produits pharmaceutiques, les cultures cellulaires et réactifs. Nos résultats préliminaires et ceux du groupe de Tsen et al. suggèrent qu'un laser à une longueur d'onde dans le visible ou l'infrarouge peut être utilisé pour inactiver les particules virales et bactériennes, tout en ayant des effets minimes sur la structure et la fonction des matériaux désirables [13, 45, 48, 58]. Par conséquent, la technologie laser peut éventuellement être utile pour la stérilisation des produits biologiques, les produits pharmaceutiques, les cultures cellulaires et réactifs.

2.3 Décontamination des cultures cellulaires

La contamination microbienne des cultures cellulaires affecte à la fois les laboratoires universitaires et les industries biotechnologiques/pharmaceutiques, et elle peut avoir des conséquences désastreuses, notamment la perte d'expériences ou de produits entiers. Les principaux agents responsables de la contamination de la culture cellulaire comprennent les mycoplasmes, les bactéries, les champignons (y compris les levures) et les virus [72, 73]. Certains contaminants, tels que les bactéries et les champignons, sont plus facilement détectés car ils provoquent une toxicité sur les cellules et augmentent la turbidité (opacité) des milieux de culture; d'autres, comme les mycoplasmes et les virus, nécessitent souvent des dosages spécifiques pour la détection. Traditionnellement, les antibiotiques sont utilisés pour inhiber la croissance bactérienne et fongique dans les cultures cellulaires. Cependant, l'utilisation systématique d'antibiotiques conduit au développement des agents infectieux résistants [74]. L'exposition prolongée à des produits chimiques tels que les antibiotiques peut également entraîner des effets néfastes dans les cellules, tels que l'altération du métabolisme ou du comportement cellulaire. De plus, les antibiotiques sont inefficaces contre les mycoplasmes et la contamination virale. D'un autre côté, des techniques physiques telles que les rayons gamma, les rayons X, le rayonnement UV, la chaleur, les micro-ondes et les ondes sonores causent toutes des dommages indiscriminés aux cellules cultivées et aux agents infectieux. Ainsi, il existe un besoin pour une méthode de décontamination universelle qui soit capable d'inactiver sélectivement ces agents infectieux sans provoquer de toxicité pour les cellules cultivées.

Des études récentes ont montré que le traitement par un laser femtoseconde dans le visible peut inactiver les agents infectieux qui sont des principales causes de la contamination de la culture cellulaire, y compris les virus, les bactéries, les mycoplasmes et les levures, avec une bonne préservation de la viabilité cellulaire des mammifères [52]. Les résultats (tableau 1.5) démontrent que l'irradiation laser femtoseconde (décontamination photonique sélective) a le potentiel de servir de méthode universelle pour la décontamination des cultures cellulaires [13-45, 48, 52].

2.4 Génération de vaccins efficaces et sûrs

Les pathogènes viraux émergents constituent une menace constante et importante pour la santé humaine dans le monde entier, comme en témoigne le syndrome respiratoire aigu sévère

(SRAS), coronavirus, le virus MERS, la dengue et le virus Zika, ainsi que de nouvelles souches grippales potentiellement pandémiques. De plus, il existe un risque persistant de nouveaux virus issus du bioterrorisme. La stratégie la plus logique et la plus rentable pour protéger la population humaine contre ces maladies virales émergentes est la vaccination. Ainsi, il existe un besoin d'une méthode capable de produire rapidement des vaccins efficaces et sûrs contre tout agent pathogène émergent.

La méthode idéale d'inactivation des agents pathogènes pour produire des vaccins qui permettent une inactivation entière des viraux (I.E.V) doit s'efforcer de satisfaire à deux critères. Premièrement, le traitement utilisé pour inactiver (détruire) le virus doit avoir des effets négatifs minimes sur la structure des protéines extérieures (enveloppe lipidique ou capsidique) du virus, car elles sont essentielles à la stimulation des réponses immunitaires au vaccin. Deuxièmement, le traitement ne doit pas ajouter de produits chimiques toxiques ou cancérogènes au produit et il ne doit pas générer de sous-produits dangereux. Par ces considérations, il n'existe actuellement aucune méthode idéale d'inactivation des agents pathogènes pour la production de vaccins [75]. Diverses techniques sont appliquées à cette fin, y compris le procédé chimique, [76] le traitement UV / psoralène [77] et l'irradiation aux rayons gamma [78]. Les méthodes chimiques telles que l'application de formol (application de formaldéhyde) ont l'avantage d'être simples et rentables, mais ils ne sont pas aussi efficaces que d'autres méthodes. De plus, l'ajout de produits chimiques suscite des inquiétudes sur les effets secondaires potentiels. Contrairement aux autres modalités, les vaccins I.E.V. peuvent être produits rapidement en utilisant des méthodes d'inactivation chimique ou physique et ils évitent d'identifier des antigènes pertinents. En d'autres mots, des recherches détaillées sur la structure et l'importance immunologique des composants individuels d'un virus, qui peuvent durer plusieurs années, peuvent être évitées. Les vaccins I.E.V. contiennent de nombreux antigènes immunogènes et des composants immuno-stimulateurs (tels que les récepteurs de type toll TLR (toll-like receptor) qui sont nécessaires à une réponse immunitaire efficace spécifique au virus. Le vaccin I.E.V. idéal est celui qui est inactivé (non infectieux), mais imite le pathogène naturel dans tous les autres aspects de la structure et de la fonction. En particulier, les protéines extérieures (capsidique virale) des particules virales doivent rester intactes après le traitement, car leur structure est importante pour la production de réponses immunitaires aux anticorps, tandis que les dommages aux autres composants viraux doivent également être minimisés pour prévenir tout effet secondaire inattendu.

Malheureusement, jusqu'à présent, il n'existe pas de méthode universelle pour produire ce type de vaccin I.E.V. idéal [75]. La formaline, un agent alkylant, est l'une des méthodes les plus couramment utilisées pour l'inactivation virale dans la fabrication des vaccins [79-81]. Cependant, le traitement au formol a plusieurs limites cruciales: (1) il cause des dommages structuraux aux épitopes des cellules B (les fragments de protéines qui stimulent les cellules B du système immunitaire), ce qui réduit la spécificité des réponses anticorps provoquées par le vaccin [29]; (2) il génère des groupes carbonyle dans la protéine [82], une forme de dommage oxydatif qui induit des réponses immunitaires indésirables de type T auxiliaires de type 2 (Th2) pouvant entraîner des effets secondaires chez les humains [83]; et (3) il ajoute des coûts inutiles et cause des inquiétudes au public en introduisant un cancérigène dans le vaccin. Ces limites peuvent être observées dans l'échec des vaccins contre le virus respiratoire syncytial (VRS) inactivés au formol et contre la rougeole qui ont provoqué une aggravation désastreuse de la maladie lors d'une infection naturelle [84–87]. D'autres méthodes d'inactivation virale, y compris d'autres agents alkylants, les rayons gamma, les rayons X, le rayonnement UV et la chaleur, sont toutes affectées par de diverses combinaisons des limites susmentionnées [83–88].

Il y a plusieurs raisons théoriques pour lesquelles le traitement par le laser femtoseconde serait plus avantageux que d'autres méthodes pour la production de vaccins I.E.V [13, 48, 89]. Le laser femtoseconde dans la gamme de longueur d'onde de 400-800 nm n'a pas de l'énergie de photons suffisante pour perturber les liaisons covalentes dans les macromolécules biologiques telles que les virus; par conséquent, l'irradiation au laser femtoseconde ne devrait pas générer de groupes carbonyles induisant une réponse Th2 dans les protéines [13, 48, 89] En l'absence de chromophores, la lumière visible montre une absorption intrinsèque négligeable par les protéines et les acides nucléiques; ainsi, l'irradiation au laser femtoseconde ne doit pas dénaturer les épitopes structuraux des cellules B par chauffage. De plus, l'irradiation au laser femtoseconde n'induit pas de réticulation protéine-acide nucléique et, par conséquent, la capacité de stimulation TLR des acides nucléiques viraux doit être préservée. En outre, la méthode au laser femtoseconde n'implique pas l'introduction de produits chimiques potentiellement toxiques ou cancérigènes pendant le traitement et atténue les préoccupations du public à cet égard. Ces raisons font du traitement au laser femtoseconde une méthode potentielle attrayante pour générer des vaccins I.E.V sûrs et efficaces. La figure 2.3 illustre le concept d'inactivation du virus pour la génération de vaccin.

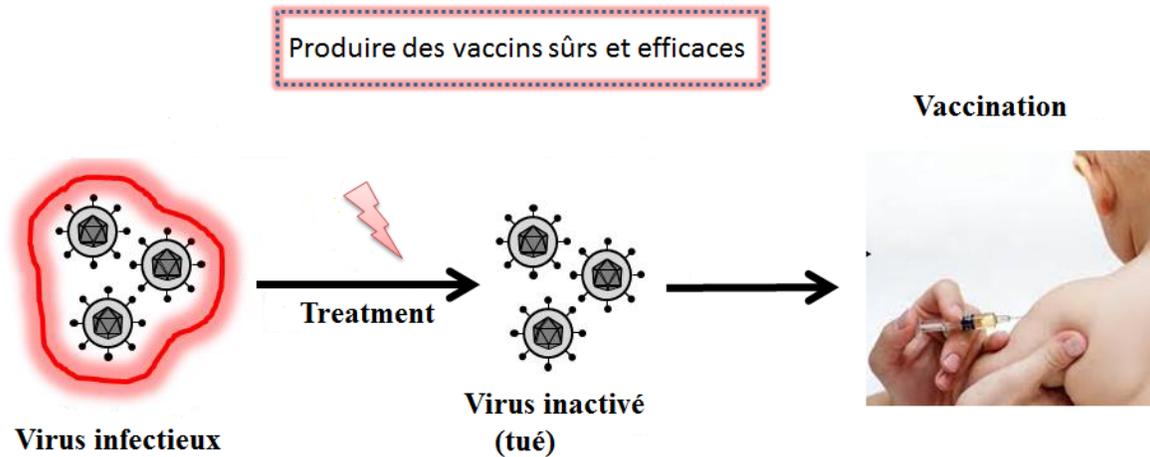


Figure 2. 3 Le concept d'inactivation virale pour la génération de vaccins [37].

Les vaccins viraux inactivés peuvent être produits rapidement et ils contiennent de nombreuses structures et éléments viraux nécessaires pour générer des réponses immunitaires fortes et spécifiques contre le virus. Ces propriétés font des vaccins viraux inactivés une stratégie puissante et attrayante pour relever le défi des pathogènes émergents. La technologie d'inactivation par le laser femtoseconde est une méthode prometteuse pour le développement rapide et simple des vaccins contre les maladies infectieuses. Tsen et ses collègues ont récemment découvert qu'un vaccin contre la grippe préparé par le traitement laser à impulsions ultracourtes a le potentiel d'être beaucoup plus sûr et plus efficace que les vaccins préparés par d'autres procédés [13, 48, 89].

3 THÉORIE: IMPULSIVE DIFFUSION RAMAN STIMULÉE

Tous les objets mécaniques ont des fréquences propres ou des 'modes normaux' de vibration (phonons) dans lesquelles ils oscillent autour de leur géométrie d'équilibre. Par exemple, un verre a des fréquences vibratoires naturelles, les ponts et les bâtiments ont leurs propres fréquences vibratoires naturelles, qui sont radicalement différentes de celles d'un verre. Le fait que des ondes sonores d'une amplitude suffisante, lorsqu'elles sont réglées sur une fréquence spécifique, peuvent briser un verre fournit une preuve concrète de l'existence de ces fréquences naturelles.

Pour les biomolécules, le mouvement collectif global est de l'ordre de 10 GHz à 1 THz [29, 90, 91]. Les recherches antérieures ont démontré la possibilité d'exciter des états vibrationnels d'un virus de la grippe par le guide d'ondes à micro-ondes [92, 93]. Cette technique est décrite comme étant une technique résonnante d'absorption des micro-ondes. Cependant, l'eau, qui coexiste habituellement avec les agents infectieux, est un absorbant dans la gamme spectrale des micro-ondes. Ainsi, il est extrêmement difficile de transférer l'énergie d'excitation de micro-ondes aux niveaux vibrationnels des agents infectieux qui sont typiquement de l'ordre de 30 GHz à 300 GHz (1 cm^{-1} - 10 cm^{-1}) [29, 43, 47, 94]. Pour surmonter cette difficulté, il est essentiel d'utiliser d'autres sources d'excitation comme le domaine visible ou infrarouge, dans lesquels l'eau est transparente.

Récemment, il a été montré que la technologie laser femtoseconde à des longueurs d'onde dans le visible ou l'infrarouge proche, par l'intermédiaire d'un processus appelé Impulsive diffusion Raman stimulée «ISRS» est efficace dans l'inactivation des virus non pathogènes [43-58, 95]. Dans cette section, le principe d'ISRS et son effet sur un système de agents infectieux (virus) sont introduits de manière concise.

3.1 Impulsive diffusion Raman stimulée

Le laser femtoseconde par l'intermédiaire d'un processus appelé *ISRS* représente un moyen actif pour exciter simultanément de nombreux états vibrationnels d'une capsid virale conduisant ainsi à l'inactivation (destruction) des bactéries et des virus [43-58] (Figure 3. 1). L'*ISRS* est basée sur l'excitation cohérente des modes de vibration d'un matériau par une ou plusieurs impulsions lumineuses. Ce processus est présenté pour être un procédé efficace de produire de grandes amplitudes des modes de vibration de molécules en solution, ainsi que

dans les dispositifs à semi-conducteurs. Il nécessite donc des impulsions lasers plus courtes que la période de vibration des modes de l'échantillon considéré [43-58].

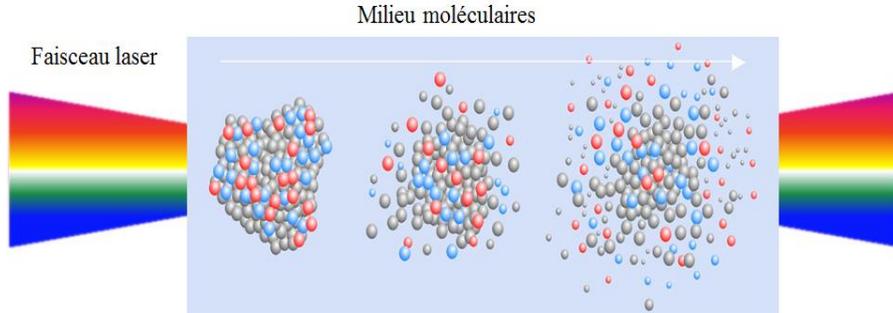


Figure 3. 1 Schéma générale de principe d'ISRS

Ce processus d'ISRS peut être décrit par un modèle classique simple [43,50, 51, 94-97]. Les modes normaux de vibration induites par l'excitation laser peuvent être décrits par les coordonnées cartésiennes de déplacement des atomes ou par les coordonnées internes qui reflètent le changement de forme de la molécule au cours de la vibration. Mais il est plus pratique d'associer à chaque mode normal une seule coordonnée, appelée coordonnée normale Q ($Q=R-R_0$, où R_0 est la distance pour la position d'équilibre) [91, 95, 98]. Nous pouvons décrire cette interaction en modélisant les modes de vibration du milieu par un ensemble d'oscillateurs harmoniques. L'impulsion va lancer les oscillateurs en un temps beaucoup plus court que leur période, qui vont ensuite osciller à leur fréquence propre. Si on ignore la dispersion dans l'indice de réfraction, ce qui semble raisonnable pour la diffusion non résonante avec de petits changements de fréquence, et si on suppose que le champ électrique incident n'est pas affecté par la diffusion stimulée, alors l'équation du mouvement relative à la diffusion Raman stimulée «Q» est décrite par un mouvement d'oscillation harmonique simple amorcée et pilotée par une force $F(t)$ fournie par les photons du laser incident et elle est donnée comme suite [7-10]:

$$\frac{\partial^2 Q}{\partial t^2} + 2\gamma \frac{\partial Q}{\partial t} + \omega_0^2 Q = F(t), \quad (3. 1)$$

où γ et ω_0 sont respectivement la constante d'amortissement et la fréquence angulaire du mode vibratoire (l'un des modes normaux), et $F(t)$ est la force motrice du laser d'excitation. Cependant, $F(t)$ peut être écrit comme [13, 96]:

$$F(t) = -\frac{\partial U(Q,t)}{\partial Q}, \quad (3. 2)$$

Où

$$U(Q, t) = -\frac{1}{2} \vec{P}(Q, t) \cdot \vec{E}_L(t) \quad (3. 3)$$

Le facteur de 1/2 provient de l'accumulation de la polarisation \vec{P} avec le champ \vec{E}_L , bien que ce soit le même facteur qui se produit dans l'énergie de charge d'un condensateur.

$\vec{P}(Q, t)$: La polarisation induite est liée au champ électrique du laser d'excitation $\vec{E}(t)$ à travers l'équation :

$$\vec{P}(Q, t) = \alpha(Q) \cdot \vec{E}_L(t) \quad (3. 4)$$

La polarisabilité a une partie statique qui produit une diffusion élastique de Rayleigh, et une partie qui est modulée par le déplacement oscillant Q . C'est cette contribution modulée qui produit l'effet Raman et qui présente un intérêt ici. Si nous faisons une expansion en série de Taylor de la polarisabilité α autour de la position d'équilibre de la coordonnée normale, alors:

$$\alpha(Q) = \alpha_0 + \left(\frac{\partial \alpha}{\partial Q}\right)_0 Q + \frac{1}{2} \left(\frac{\partial^2 \alpha}{\partial Q^2}\right)_0 Q^2 + \dots \quad (3. 5)$$

avec α_0 représentant le tenseur de polarisabilité à l'équilibre et $\left(\frac{\partial \alpha}{\partial Q}\right)_0$ est la dérivée de la polarisabilité à déplacement nul. Cette valeur est proportionnelle à l'amplitude de la section efficace de diffusion Raman (en notant $\alpha_1 = \left(\frac{\partial \alpha}{\partial Q}\right)_0$).

En remplaçant (3. 2), (3. 3), (3. 4), (3. 5) à (3. 1) tout en respectant le terme du premier ordre dans la polarisabilité. Nous obtiendrons:

$$\frac{\partial^2 Q}{\partial t^2} + 2\gamma \frac{\partial Q}{\partial t} + \omega_0^2 Q = \frac{1}{2} \left(\frac{\partial \alpha}{\partial Q}\right) E_L^2. \quad (3. 6)$$

L'équation (3.6) peut être facilement calculée en utilisant l'analyse de la fonction de Green [13]. Le côté droit de l'équation (3.6) est la force motrice externe de la vibration en mode normal. Si les forces qui unissent la molécule sont des fonctions linéaires du déplacement des atomes, alors les vibrations moléculaires seront harmoniques et les déplacements des atomes seront décrits par des sinusoides lorsque la molécule vibre selon un mode normal. Dans cette approximation harmonique, les coordonnées normales varient périodiquement [13, 99]:

$$Q(t) = Q_0 e^{-\gamma t} \sin(\omega t) \quad (3. 7)$$

L'équation (3. 7) montre que, grâce à l'ISRS, une impulsion ultracourte peut donc générer une onde de vibration optique cohérente dans la direction de propagation de la lumière.

L'information la plus importante quand on peut avoir de l'équation des vibrations moléculaires (3.7) peut facilement être déduite de l'amplitude de vibration induite Q_0 , donnée par [13, 44-51]:

$$Q_0 = \frac{\sqrt{\pi}}{2} \frac{n\alpha_1 \tau_L}{cK\varepsilon_0 \omega_0} I_0 e^{-\omega_0 \tau_L / 4} \quad (3.8)$$

où I_0 est l'intensité crête d'une impulsion, τ_L est la durée de l'impulsion, α_1 est la polarisabilité proportionnelle à l'amplitude de la section efficace de diffusion Raman ($\alpha_1 = \left. \frac{\partial \alpha}{\partial Q} \right|_0 Q$), $K\varepsilon_0$ est la permittivité du milieu diélectrique, n est l'indice de réfraction et c la vitesse de la lumière.

D'après l'équation (3.8), il est clair qu'une section efficace de diffusion Raman plus grande, des intensités laser plus élevées (ou des densités de puissance laser plus élevées si la durée d'impulsion du laser reste fixe), et des fréquences vibrationnelles plus faibles entraîneraient des amplitudes vibratoires excitées plus élevées. Cet impact mécanique pourrait exciter de manière cohérente les modes de vibration Raman d'une capsid virale du bactériophage M13 (ou MS2) ce qui provoque un fort dommage à la capsid virale ainsi l'inactivation d'un pathogène viral (figure 3.2). L'inactivation d'une particule virale signifie la perte d'infectivité du virus dans une suspension. Clairement, l'inactivation est « la destruction du pouvoir pathogène d'une substance ou d'un agent infectieux ». Dans le cas de virus, l'inactivation est le résultat d'une altération de la capsid virale. La capsid est une structure qui entoure le génome, l'acide nucléique. Elle est constituée de très nombreuses unités protéiques qui se regroupent pour former des ensembles structuraux identiques appelés capsomères. M13 est un virus non-enveloppé avec un diamètre d'environ $6 \sim 7 \text{ nm}$ et une longueur d'environ 850 nm . Il est composé de plusieurs blocs de construction α -Hélice, chaque hélice contenant 50 acides aminés (figure 3.2 (a)). Les virus peuvent être inactivés suite à une altération de leur capsid et/ou leurs acides nucléiques. Les différentes analyses ont révélé que le traitement laser entraînait des changements structuraux des particules virales, allant de la déformation à une déstructuration, corrélés à une rupture des liaisons hydrogène / hydrophobes ou la séparation des liaisons protéiques faibles dans la capsid protéique d'une particule virale (Figure 3.2 (b)) [13, 43, 57]. L'endommagement est le résultat d'une succession complexe de mécanismes d'interaction entre l'impulsion laser et le matériau biologique. Ces derniers sont très variés, et dépendent d'un nombre important de paramètres. Si l'énergie laser déposée sur la capsid protéique ou l'amplitude du mode de vibration de la capsid d'une particule virale est assez grande, elle peut briser les faibles liaisons (les liaisons hydrogènes ou des contacts

hydrophobes) entre les protéines provoquant des dommages à la capsid du virus et ainsi l'inactivation virale capsid (Figure 3.2 (c)).

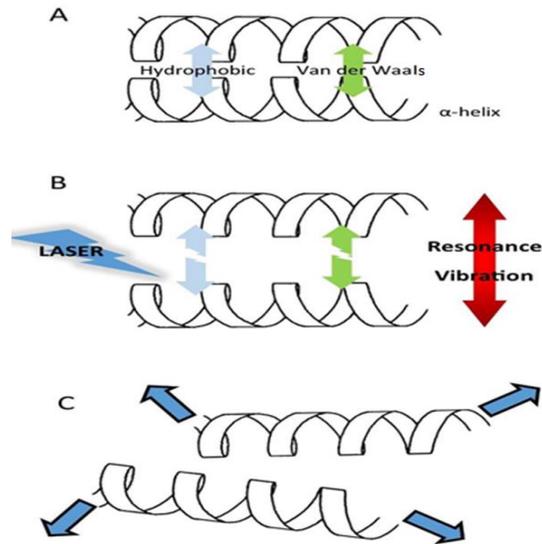


Figure 3.2 Démonstration de l'inactivation de bactériophage M13 par le traitement laser femtoseconde. (A) Le laser interagit avec la particule virale. (B) Cette interaction provoquera l'excitation cohérente de nombreux états vibrationnels d'une capsid virale. (C) [46].

D'après l'équation (3.8), on constate que l'amplitude de la vibration induite Q_0 dépend fortement de la durée des impulsions laser : la durée des impulsions doit être inférieure à la période du mode excité pour avoir une excitation efficace. Il est intéressant de trouver la durée d'impulsion laser τ_L qui donne lieu à l'amplitude vibrationnelle maximum excitée par laser Q_0 . Pour ce faire, nous considérons que $Q_0 = Q_0(\tau_L)$ dans l'équation (3.8); définissons $dQ_0/d\tau_L = 0$ (condition d'équilibre) et résolvons pour τ_L . Si l'on suppose que l'intensité crête d'une impulsion est constante, l'équation décrivant l'amplitude de vibration induite (équation (3.8)) sera de la forme suivante :

$$Q_0 = M \frac{\tau_L}{\omega_0} e^{-\omega_0 \tau_L / 4} \quad (3.9)$$

où $M = \frac{\sqrt{\pi}}{2} \frac{n\alpha_1}{cK\epsilon_0} I_0 = \text{constante}$

Alors la dérivée de Q_0 par rapport à la durée des impulsions laser permet de retrouver la condition d'équilibre.

$$\frac{dQ_0}{d\tau_L} = \frac{d}{d\tau_L} \left(M \frac{\tau_L}{\omega_0} e^{-\omega_0^2 \tau_L^2 / 4} \right) = 0 \quad (3.10)$$

$$\frac{dQ_0}{d\tau_L} = \frac{M}{\omega_0} e^{-\omega_0^2 \tau_L^2 / 4} + M \frac{\tau_L}{\omega_0} \left[-2\tau_L \frac{\omega_0^2}{4} e^{-\omega_0^2 \tau_L^2 / 4} \right] = 0 \quad (3.11)$$

$$\frac{dQ_0}{d\tau_L} = \frac{M}{\omega_0} e^{-\omega_0^2 \tau_L^2 / 4} \left(1 - \frac{\omega_0^2 \tau_L^2}{2} \right) = 0 \quad (3.12)$$

on a $\frac{M}{\omega_0} e^{-\omega_0^2 \tau_L^2 / 4} \neq 0$

Alors:

$$\left(1 - \frac{\omega_0^2 \tau_L^2}{2} \right) = 0 \quad (3.13)$$

$$\left(\frac{\omega_0^2 \tau_L^2}{2} \right) = 1 \quad (3.14)$$

$$\tau_L = \frac{\sqrt{2}}{\omega_0} = \frac{T}{\sqrt{2} * \pi} = \frac{T}{4.44} \quad (3.15)$$

Nous avons trouvé que Q_0 suppose avoir une valeur maximale lorsque $\tau_L = T / 4.44$, où T est la période de vibration $T = (2\pi/\omega_0)$.

Ce résultat théorique présenté dans le paragraphe ci-dessous repose sur des développements mathématiques assez complexes. On peut comprendre cette technique «l'inactivation des agents pathogènes par l'intermédiaire d'ISRS» en faisant l'analogie avec un pendule simple qui formé par des particules virales (capsides) excitées par une force extérieure fournie par les photons du laser incident. On peut alors différencier les positions d'équilibre stables et instables selon que l'énergie potentielle est minimale ou maximale respectivement (Figure 3.3). Si les atomes des sous-unités protéiques d'une capsid virale n'ont pas assez d'énergie potentielle pour sortir du puits (sont dans un état de faible énergie), ils sont contraint à rester entre deux positions et peut éventuellement osciller autour de leur position d'équilibre à '0' (sont confinés dans un puits de potentiel), de la même manière qu'un pendule se déplace de l'avant en arrière autour du point le plus bas (figure 3.3). Comme on peut le voir sur la figure 3.3, cette position d'équilibre correspond au minimum strict de l'énergie potentielle du système; c'est donc une position d'équilibre stable. Cependant, lorsque l'énergie totale de la vibration (qui est

proportionnelle au carré de son amplitude vibratoire) dépasse la valeur de liaison du puits (U_0), ces atomes sont maintenant dans un état de haute énergie et ne sont plus contraints d'effectuer un aller-retour autour de la position d'équilibre dans le puits d'énergie potentielle. Ces atomes franchissent la barrière de potentiel et peuvent 's'échapper' de leurs positions d'équilibre (positions instables) provoquant des dommages aux molécules ainsi la rupture des faibles liaisons (les liaisons hydrogènes ou des contacts hydrophobes) entre les molécules. De cette manière, un laser femtoseconde avec des impulsions suffisamment courtes ($\tau_L < T / 4$) est capable d'exciter simultanément de nombreux états vibrationnels d'une capsid virale, entraînant ainsi la rupture des contacts moléculaires et l'inactivation subséquente du virus. Il nécessite donc des impulsions laser plus courtes que la période du mode de vibration de l'échantillon considéré [13, 43, 57].

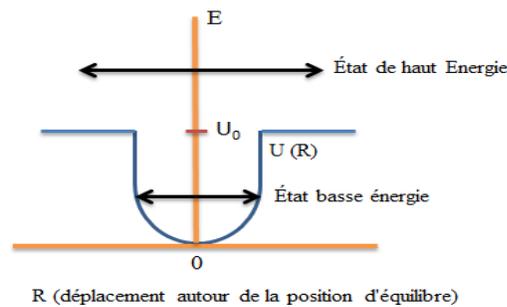


Figure 3. 3 Un diagramme d'énergie simplifié pour un atome oscillant autour de sa position d'équilibre «0». Lorsqu'un atome est dans un état de basse énergie, il est limité par le puits potentiel $U(R)$. Il oscille autour de la position d'équilibre [8].

De tout cela, nous pouvons déduire la durée d'impulsion optimale de laser femtoseconde pour l'inactivation des agents pathogènes par l'ISRS. Si la période de la vibratoire T_0 ($T_0 = 2\pi/\omega_0$) d'un pathogène est connue, et si l'intensité maximale du laser reste constante dans le temps, alors le moyen le plus efficace d'inactiver le pathogène est d'utiliser un laser avec des impulsions très courtes qui ont une durée d'impulsion d'environ un quart de la période ($T_0/4$). En sélectionnant la durée d'impulsion ultracourte d'un laser pulsé, l'amplitude de ce mode de résonance peut avoir une excitation assez élevée pour endommager la capsid et inactiver les bactériophages.

3.2 L'importance des impulsions ultracourtes pour l'inactivation des agents pathogènes grâce à l'ISRS

Pourquoi les lasers à ondes continues (non pulsées) ne peuvent-ils pas atteindre l'effet ISRS ? Dans l'analogie un pendule simple (figure 3.4), si la force de poussée est constante dans le temps, alors l'amplitude de l'oscillation (R_0) atteindra un maximum lorsque la durée de poussée est approximativement $T/4$, où T est la période de l'oscillation de la pendule simple. Si la force de poussée dure plus longtemps que $T/4$, la partie de la force de poussée qui est appliquée après $T/4$ agit contre le mouvement de la balançoire et réduit ainsi l'amplitude de l'oscillation.

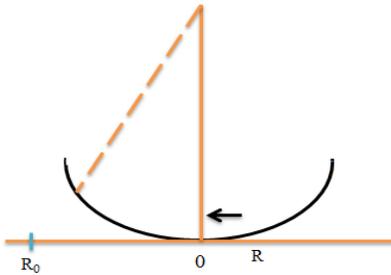


Figure 3.4 Pousser un oscillateur autour de sa position d'équilibre ('0'). Si l'oscillateur est poussé depuis la position d'équilibre '0', il faut un temps de $T/4$ pour atteindre l'amplitude maximale R_0 . Si la force de poussée dure plus longtemps que $T/4$, la partie de la force de poussée qui est plus longue que $T/4$ agit dans la direction opposée au mouvement de rotation, empêchant ainsi le mouvement de la balançoire et réduisant son amplitude d'oscillation [13].

Un cas extrême est une poussée qui dure éternellement. Dans ce scénario, le pendule reste immobile et n'oscille plus. Cette 'poussée qui dure éternellement' est le type de force appliquée par un laser continu, qui a essentiellement une durée d'impulsion infinie. Par conséquent, en utilisant l'équation (3.8), nous notons qu'un laser à onde continue a une 'durée d'impulsion' $\tau_L = \infty$, l'amplitude du mode vibrationnel excité est nulle. Ceci explique pourquoi les lasers à ondes continues ne peuvent pas exciter les modes vibrationnels par un processus ISRS et ne peuvent donc pas inactiver les agents pathogènes en utilisant ce nouveau mécanisme. Un laser fonctionnant en régime déclenché (Q-switching en anglais), peut-il exciter ces vibrations dans les capsides virales à travers l'ISRS?. La fréquence caractéristique de mode normal de vibration f_0 ($\omega_0 \equiv 2\pi f_0$) des virus se situe typiquement dans la gamme de 100 GHz [44]. Par exemple, pour le bactériophage M13 en hélice, il est d'environ 255 GHz (8.5cm^{-1}) [44, 90, 91] et pour les phages MS2 d'environ 27 nm, il est d'environ 60.56 GHz (2.2cm^{-1}) [90]. Un laser à un régime déclenché, qui a une durée d'impulsion typique d'environ 100 ns, ne peut donc pas exciter le mode normal ω_0 d'un virus par ISRS. Cela peut facilement être vu à partir de l'équation (3.8).

4 MATÉRIEL ET MÉTHODE

Ce chapitre est consacré à la préparation du stock de bactériophages et aux dispositifs expérimentaux utilisés pour la réalisation de nos travaux d'inactivation. Il est divisé en deux sous chapitres. Dans les premières sous chapitres, nous allons donner que les grandes lignes d'obtention du stock de bactériophages et culture de la bactérie nécessaire pour le titrage. Ensuite le second sous chapitre est consacré à la description de l'appareillage expérimental utilisé dans nos travaux. Nous donnons une description succincte des éléments clés de ces dispositifs expérimentaux.

4.1 Bactériophages

Les bactériophages (ou phage en abrégé; du grec phagein, signifiant «manger») sont présents partout sur la planète et sont reconnus comme étant l'entité biologique la plus abondante sur Terre. Ils seraient dix fois plus nombreux que les bactéries [100, 101]. En effet, on estime entre 10^{30} et 10^{32} bactériophages dans notre environnement [100, 101]. Ils se retrouvent dans les océans, dans le sol, dans l'eau potable et même dans la nourriture que nous consommons. Ils sont définis comme des virus qui infectent les bactéries et tout comme les virus, ils sont de véritables parasites qui doivent envahir des cellules hôtes et détourner leur machinerie pour se multiplier. Au cœur d'un phage se trouve un génome d'acide nucléique, soit le désoxyribonucléique (ADN) ou le ribonucléique (ARN), qui contient des instructions pour produire des copies supplémentaires du même phage (virus). Cet acide nucléique est entouré d'une couche de protéines appelée capsid, qui peut être assimilée à une armure protégeant le génome viral contre les forces externes. La capsid est un composant intégral présent dans tous les virus, - comme nous le verrons c'est important dans le processus de l'inactivation par le laser femtoseconde. L'association du génome et de la capsid forme la nucléocapsid.

Les phages peuvent être divisés en deux catégories principales: non enveloppés et enveloppés. Les bactériophages non enveloppés ne contiennent que de l'acide nucléique et une capsid. Les phages enveloppés contiennent de l'acide nucléique et une capsid, ainsi qu'une 'enveloppe' (une couche externe de lipide autour de la capsid). Un type de bactériophage précis ne peut infecter qu'une espèce ou qu'une souche de bactéries très spécifique. La spécificité de cette interaction est dictée par la capacité d'adsorption qui elle, est directement en lien avec le type de récepteurs présents sur la paroi cellulaire bactérienne.

Dans cette étude, ces deux phages, MS2 et M13, sont utilisés comme un modèle pour fournir des preuves que le laser femtoseconde Ti:saphir peut être utilisé comme une méthode d'inactivation virale d'un virus non-enveloppé à ADN ou ARN. Leurs différences de taille ainsi que leur forme peuvent également être utilisées pour évaluer l'impact des paramètres du laser sur différents types de virus. Les raisons qui ont motivé le choix de ces bactériophages sont multiples: en premier lieu, les phages n'infectent pas l'homme et sont donc plus faciles à manipuler et à maintenir en laboratoire, ainsi que grâce à la simplicité de leur propagation et de leur dénombrement.

4.1.1 Bactériophages M13

Les bactériophages M13 font partie de la famille de virus non lytiques qui infectent les bactéries gram négatives telles qu'*E. Coli*. Ils possèdent, un génome circulaire d'ADN, encapsidé dans un long tube flexible de nature protéique [102-108]. Le phage M13 possède un diamètre de 6.5 nm et une taille de 900 nm de long [103, 105]. Classiquement, il est constitué d'un filament d'ADN simple brin (ssDNA: single strand DNA) d'environ 6500 nucléotides encapsidé par 5 types de protéines du manteau. La g8p (ou pVIII) est la protéine majeure du phage (figure 4.1), et est présente à raison de 2700 copies par phage. Les quatre autres sont présentes à raison de 5 par phage, la g7p (pVII) et la g9p (pIX) d'un côté de la particule et la g3p (pIII) et la g6p (pVI) de l'autre côté. Chacune de ces protéines de la capsid mineures est présente en 4 ou 5 copies par phage [103-107]. Bien que ces 5 protéines assurent la stabilité de la structure phagique, seule la g3p est nécessaire à la reconnaissance et à l'infection de la cellule hôte via son extrémité N-terminale.

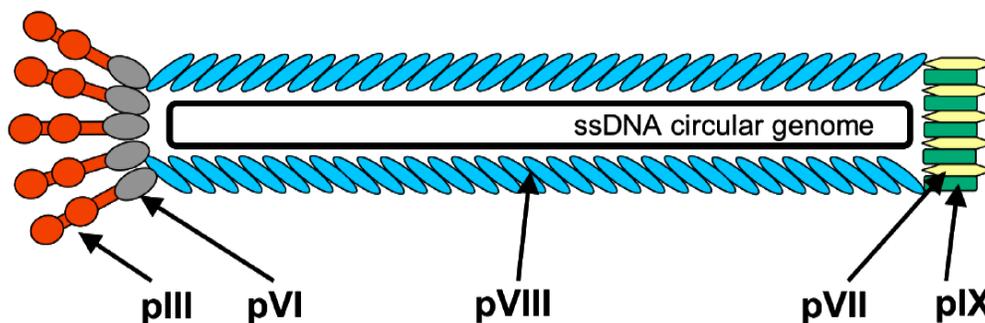


Figure 4.1 Un diagramme schématisé d'un seul bactériophage M13. Les étiquettes indiquent l'emplacement de chacune des cinq protéines qui constituent la capsid protéique du bactériophage [107].

4.1.2 Bactériophages MS2

Le bactériophage MS2 appartient à la famille des Leviviridae, comprenant les phages MS2, Q β , fr, GA, R17, f2 et phiCb5 [100, 107,109]. MS2 est un bactériophage lytique non enveloppé qui infecte également le pilus *E. Coli F +* (C3000) [109-111]. C'est un virus à ARN simple non segmenté de polarité positive de 3 569 bases, qui n'a qu'un diamètre de 27 nm (figure 4. 2) [112-116] et avec une structure d'icosaèdre simple. La capside du phage MS2 est composée d'une protéine de maturation ou protéine A responsable de l'assemblage cellulaire, de 44 000 Da présente en une seule copie, d'une protéine de capsidite de 13700 Da qui est la protéine majoritaire du phage puisqu'elle est présente en 180 copies [113] et d'une protéine de lyse. La protéine A est utilisée par le phage pour assurer la médiation de la fixation du phage aux pili de la cellule hôte [99]. La capsidite du bactériophage MS2 est constituée de 60 unités asymétriques identiques. Les 60 capsomères constitutifs de la capsidite de MS2 ont une forme triangulaire avec une base d'environ 60 Å et une hauteur de 20 Å.

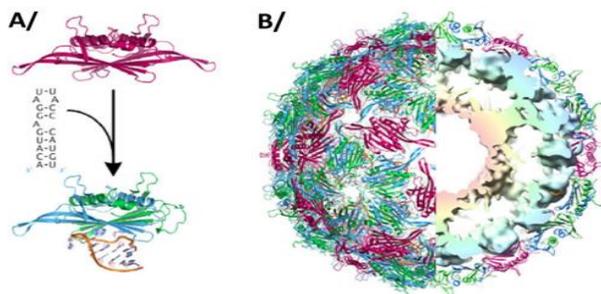


Figure 4. 2 Composants et structure de la capsidite du bactériophage MS2 [113]. A/ Représentation des structures : dimère symétrique C/C (rouge) et dimère asymétrique A/B (bleu/vert). La liaison du dimère C/C sur la séquence type « tige-boucle » de l'ARN viral de 19 nucléotides provoque le passage en conformation A/B de ces dimères. B/ Structure d'un bactériophage MS2. La partie gauche est la vue de la surface de la structure icosaédrique (T=3) moyenne d'un bactériophage MS2 aux rayons X [113]. La partie droite est une coupe schématique de la reconstitution d'une image de microscopie électronique avec une résolution de 9 Å. Ce schéma montre les nombreux points de contacts entre le génome viral (densité radiale de couleur rose à bleu à mesure que le rayon augmente) et la capsidite protéique.

Les principales caractéristiques de ces deux agents infectieux sont résumées dans le tableau 4.1 ci-dessous.

Tableau 4. 1 Des propriétés clés des capsides virales couramment utilisées pour construire de nouveaux matériaux [102-113].

	Bacteriophage M13	Bacteriophage MS2
Famille	Inoviridae	Leviviridae
Membres	66	38
Capside de protéine	2700 copies la protéine majeure du phage (gp8- pVIII)	180 copies protéine majoritaire du phage (A)
Morphologie	Filamenteux	Polyédrique
Capside lipidique	Non	Non
Taille (nm)	diamètre de 6.5 nm et une taille de 900 nm de long	Diamètre de 27 nm
Génome (taille)	ADN sb C (7-9 kb)	ARN sb L (3-4 kb)
MM_{total} (x 10⁶ Da)	2964,5	5.3 ± 0.6, 3.8, 3.87
MM_{PROTEINES} (x 10⁶ Da)	70.000	2.1 ± 0.1
MM_{DNA ou ARN} (x 10⁶ Da)	2	1.6 ± 0.1

MM: masses moléculaires, sb: simple brin, C : circulaire, L : linéaire, kb: kilobases; Da: Dalton (1 Da = 1 g/mol).

4.2 Production des stocks de phage et des cultures bactériennes.

La préparation du stock de bactériophages est réalisée à température ambiante et sous un poste de sécurité microbiologique de type II. L'effet antibactérien des phages est évalué sur les bactéries cultivées en milieu solide gélosé en boîte de Petri par la méthode des plages de lyse. Cette section est consacrée à la description de cette méthode et aux matériaux nécessaires pour la mettre en œuvre. Nous décrivons ici la préparation de la culture bactérienne, la production de phages et la mesure quantitative de la zone de lyse. Les deux stocks de phages MS2 et M13 sont produits selon le même protocole.

Pour des raisons du niveau de sécurité insuffisant de nos laboratoires, des cultures bactériennes non pathogènes de type *E. coli JM103* pour M13 et *C3000* pour MS2 sont ici utilisées. La préparation et le dénombrement de la culture se déroulent en plusieurs étapes et nécessitent l'utilisation des milieux de culture tels que le tampon phosphate salin (souvent abrégé PBS, de l'anglais Phosphate Buffered Saline), LB agar (Luria-Bertani medium Agar) et LB Broth (Lysogeny broth Miller).

4.2.1 Tampon phosphate

Nous avons utilisé une solution saline tamponnée communément appelée PBS que nous avons nous même préparée en raison de la grande quantité utilisée (composition, tableau 4. 2). Le tampon est ajusté au pH souhaité ($\text{pH}=7.2 \pm 0.2$) à l'aide d'une solution d'HCl (chlorure d'hydrogène) ou de NaOH (hydroxyde de sodium). La solution contenant le chlorure de sodium est autoclavée à 120 °C, 15 minutes pour stérilisation. Le phosphate mono-potassique et le phosphate disodique sont ensuite ajoutés à température ambiante car ces deux composés chimiques ont tendance à devenir troubles à température élevée. Afin d'éviter toute contamination, l'ajout de ces composés est effectué sous un poste de sécurité microbiologique. Le pH est vérifié et ajusté si nécessaire.

Tableau 4. 2 Composante de milieu saline tamponnée PSB

Composant	Masse	Molarité
Chlorure de sodium :NaCl (MW: 58.4 g/mol)	8 g	137 mM
Chlorure de potassium : kCl (MW: 74.551 g/mol)	200 mg	2.7 mM
Phosphate disodique: $\text{HNa}_2\text{O}_4\text{P}$ (MW: 141.96 g/mol)	1.44g	10 mM
Phosphate de monopotassium: KH_2PO_4 (MW: 136.086 g/mol)	240 mg	1.8 mM
Eau distillée	1 L	

MW: Poids moléculaire (Molecular weight).

4.2.2 Préparation de LB Agar

Ces agars LB sont basés sur le milieu LB décrit par Miller. LB signifie Lysogeny Broth. Ils conviennent à la croissance et au maintien des souches d'*Escherichia coli* utilisées dans les procédures de microbiologie moléculaire, ainsi que des coliformes (non sélectif). Une masse de 30 g de LB Agar est dissout dans 750 ml d'eau déminéralisée. La solution est ensuite portée à ébullition sur une plaque chauffante jusqu'à dissolution complète en remuant avec un agitateur magnétique puis distribuée ensuite stérilisée dans un autoclave à 121 °C pendant 15 minutes. La solution est étalée dans plusieurs boîtes de Petri (une petite quantité de de LB Agar pour remplir une surface de boîte de Petri). Les boîtes sont ensuite laissées refroidir (couvercle fermé) environ une heure. Les boîtes doivent être entreposées dans un réfrigérateur à 4 °C jusqu'à utilisation. Les boîtes sont nécessaires au dénombrement des bactéries.

4.2.3 Préparation de LB Broth

Le LB est un milieu nutritif liquide. La nature liquide facilite la préparation des cultures homogènes. Le milieu permet la croissance d'un grand nombre de agent infectieux, en

particulier des bactéries. Une masse de 10 g de LB Broth Miller est dissoute dans 450 ml d'eau déminéralisée. La solution est ensuite portée à ébullition sur une plaque chauffante jusqu'à dissolution complète en remuant avec un agitateur magnétique. La solution est ensuite stérilisée dans l'autoclave pendant 20 minutes avant d'être stockée dans un réfrigérateur jusqu'à l'utilisation.

4.2.4 Préparation des suspensions bactériennes

La bactérie hôte de référence *E. Coli* est utilisée pour mettre en évidence le pouvoir infectieux du bactériophage. Ces bactéries *E. coli JM103* et *C3000* sont sensibles à l'ensemble des bactériophages M13 et MS2, respectivement. Ces bactériophages provoquent l'apparition de plage de lyse sur un tapis bactérien d'*E. Coli*. Cette dernière a la particularité de développer des F-pili lors de sa phase exponentielle de croissance à 37 °C.

La préparation de bactéries se fait en plusieurs étapes. La première étape de préparation de la culture bactérienne est de « repiquer » une boîte de bactéries. Une petite quantité de solution bactérienne est étalée dans une boîte de Petri contenant le LB agar. À 37 °C dans un milieu riche, la souche bactérienne *E. coli* se divise pour donner une nouvelle génération toutes les 20 minutes. Après 18 heures dans un incubateur à $T = 37^{\circ}\text{C}$ afin de faire proliférer les bactéries, les bactéries grandissent et forment des colonies par regroupement de plusieurs bactéries visibles à l'œil nu, tel qu'illustré à la figure 4. 3.

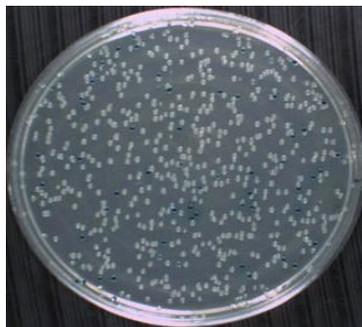


Figure 4. 3 Colonies de bactéries dans une boîte de Petri contenant le LB agar comme milieu de culture.

La seconde étape consiste à préparer une pré-culture bactérienne à partir de la boîte de bactéries. Une colonie isolée est mise dans un tube de LB (5 mL) puis elle est conservée à l'incubateur-agitateur à $T = 37^{\circ}\text{C}$ pendant 24 heures afin que les bactéries se développent. La

souche bactérienne *E. coli* est cultivée jusqu'à atteindre la phase exponentielle de croissance, celle-ci est contrôlée par la mesure d'absorbance à 600 nm. La mesure de densité optique sera ensuite utilisée pour déterminer si la bactérie est en phase exponentielle de croissance. Selon la norme ISO 10705-1 (2001), une densité optique à $\lambda = 600$ nm comprise entre 0.3 et 0.5 correspondrait à ce stade. Ensuite, la culture bactérienne est utilisée pour la réalisation d'un stock de phage (M13 ou MS2) ou le titrage des phages par la technique des plages de lyse.

4.2.5 Préparation du stock de bactériophages

La préparation de phages se fait en plusieurs étapes. La journée avant l'étape d'amplification des phages spécifiques, il faut lancer une culture bactérienne d'*E. Coli* qui servira à amplifier les phages spécifiques. Le lendemain, il faut partir une autre culture bactérienne d'*E. Coli*. Pour cette culture, une colonie d'*E. Coli* est piquée et inoculée dans 10 ml de LB. La culture est arrêtée à une densité optique (D.O.) de 0.5 et elle sera utilisée pour le titrage. Cette solution est incubée pendant 4h30 à 37°C avec une agitation vigoureuse. Suite à l'incubation, la culture bactérienne contenant les phages est transférée dans un tube Falcon de 50 ml et centrifugée pendant 60 minutes à 3000 tours par minutes. Le surnageant est récupéré dans un autre tube et centrifugé une autre fois pendant 60 minutes à 3000 tours par minutes. 80 % du haut du surnageant est récupéré dans un autre tube et une solution de 20 % PEG/2.5M NaCl correspondant à 1/6 du volume total est ajoutée. Les phages vont précipiter durant la nuit à 4 °C. Le précipité de phages liés au PEG est centrifugé pendant 60 minutes à 3000 tours par minutes à 4 °C. Il faut ensuite décanter et jeter le surnageant. Le tube est centrifugé brièvement et le résidu de surnageant est enlevé avec une pipette. Le culot blanc représente les phages. Ce culot est suspendu dans 1 ml de TBS et ensuite transféré dans un tube Eppendorf pour être centrifugé à 16060 tours par minutes pendant 5 minutes à 4 °C. Le surnageant est transféré dans un autre tube Eppendorf dans lequel une solution de 20 % PEG/2,5M NaCl, correspondant à 1/6 du volume total du surnageant est ajoutée. La solution de phages liés au PEG est incubée sur glace pendant 60 minutes et centrifugée à 16060 tours par minutes pendant 10 minutes à 4 °C. Le surnageant est jeté et le culot est centrifugé brièvement pour ensuite enlever le résidu de surnageant. Le culot obtenu est resuspendu dans 200 μ l de TBS. Cette solution est centrifugée pendant 1 minute à 16060 tours par minutes à 4 °C. Le surnageant est récupéré dans un autre tube et il représente les phages amplifiés purifiés. Une fois que la croissance des bactériophages est terminée, il est nécessaire de les séparer des bactéries.

4.2.6 Purification du phage par dialyse.

De nombreux paramètres peuvent influencer les interactions entre les particules virales, aussi bien leurs propriétés physico-chimiques que le milieu dans lequel les virus se trouvent. La purification nous permettrait de nous affranchir au maximum des interactions liées au milieu et ainsi d'observer les effets de différents paramètres (pH, force ionique) sur les virus seuls.

Pour purifier les bactériophages, il faut d'abord centrifuger la solution. La centrifugation se fait à 2000 tours par minutes pendant 20 minutes, ce qui permet de retirer les plus grosses particules trouvées dans le milieu. Par la suite, le surnageant doit être filtré. Pour réaliser cette étape, des unités de filtration frontales sont utilisées; ce sont les unités jetables et les unités réutilisables. Les unités réutilisables nécessitent plusieurs manipulations: les filtres doivent être posés manuellement et l'unité doit être stérilisée à l'autoclave. Les dispositifs jetables sont stérilisés à l'usine et ne sont utilisés qu'une seule fois. Ils ont l'avantage d'être plus performants et d'être plus faciles à utiliser. Le chargement des deux types d'unités est fait grâce à un tube stérile reliant l'unité et le milieu à filtrer. Lors des filtrations, la cuve réceptrice est mise sous vide ce qui force le milieu à travers le filtre. Deux filtrations sont faites, une à 2.0 μm et une autre à 0.4 μm . C'est la seconde filtration qui permet réellement de retirer les bactéries du milieu. Les filtrats obtenus à la suite de ces manipulations contiennent moins de bactéries qu'il est possible d'en détecter. Cette solution est prête à l'emploi. Il faut la conserver au froid puisque quelques bactéries peuvent avoir traversé le dernier filtre. Elle peut être ainsi conservée à cette température pendant 1 semaine sans que le titre infectieux ne diminue.

4.2.7 Quantification par titrage

La méthode de quantification de bactériophages utilisée dans cette étude est la méthode des plages de lyse (communément appelée méthode UFP «Unités Formant Plages»). Le principe de cette méthode classique de mise en évidence repose sur le fait que certains bactériophages sont capables de se multiplier sur des bactéries hôtes et que cette multiplication peut être visualisée par des plages de lyse.

Dans cette étude, les stocks de bactériophages ainsi que les échantillons prélevés lors des différentes expériences sont dénombrés selon la méthode UFP. C'est une méthode relativement rapide, les plages de lyses obtenues sont bien visibles et facilement dénombrables. La procédure de double couche d'agar est utilisée. Elle consiste à ajouter la bactérie hôte et de la gélose molle à l'échantillon contenant des bactériophages, puis de verser le volume total du

mélange sur une boîte de Petri préalablement remplie avec de la gélose LB Top agar. Ci-dessous est détaillée la méthode: 1) La bactérie réceptrice *E. coli* est décongelée et un repiquage de la souche sur gélose LB est effectué, une première fois pendant 24h à 37°C, puis une seconde fois pendant 24h à 37°C. 2) Le stock de phages congelé ou alors les échantillons prélevés lors des expériences conservés à 4°C sont placés à température ambiante et une série de dilutions du bactériophage 1/10 (figure 4.4) est effectuée dans du TBS en mettant 50 µl de suspension de phages dans 450 µL de TBS (le diluant) dans un tube en verre, et agité au Vortex. Ces dilutions permettent de diminuer la concentration de bactériophages en dessous de 300 UFP/mL, de manière à dénombrer plus facilement les plages de lyse. Toute concentration en bactériophages inférieure ou égale à 300 UFP/mL peut être facilement comptée sur chaque boîte à l'oeil nu. 3) Parallèlement un bouillon d'*E. Coli* est préparé dans du TBS à une concentration de 10^8 UFC/mL («UFC : «Unité Formant Colonie») approximativement; cette concentration est obtenue en mesurant la densité optique à 640 nm au spectrophotomètre UV, une suspension à 70% de transmission présentant une concentration comprise entre 1 et 3.10^8 bactéries/mL. 4) Puis, à 100 µL de chacune des dilutions obtenues dans les tubes en verre en 2), sont ajoutés 100 µL de la culture de la souche sensible préparée en 3) (bouillon d'*E. Coli*). À noter que pour le dénombrement de suspensions contenant un grand nombre de bactériophages ($>10^2$ UFP/mL), 100 µL de dilution suffit à déterminer de façon précise le titre de la solution, les plages de lyse obtenues sont plus faciles à dénombrer à l'œil nu (entre 30 et 300 plages de lyse). 5) Après homogénéisation, les bactériophages et la culture d'*E.coli* doivent rester en contact l'un avec l'autre pendant 5 minutes au plus. Passé ce temps, une réplication du bactériophage peut avoir lieu et la concentration peut alors être surestimée. 6) 3 mL de gélose molle nutritive pour surface préalablement fondue puis refroidie et maintenue en surfusion à 50°C sont alors ajoutés dans chaque tube en verre. Après homogénéisation, le mélange est immédiatement étalé à la surface d'une gélose nutritive pour profondeur (gélose LB Top Agar) préalablement coulée en boîte de Petri stérile et solidifiée. Les séries de boîtes obtenues sont incubées à 37°C pendant 24 heures. 7) De la même façon, un témoin d'*E. Coli* est préparé en remplaçant 100 µL de dilution de la suspension de bactériophages par 100 µL de bouillon d'*E. coli*, pour vérifier si la présence de bactériophages n'est pas due à une contamination du matériel (pipette...). 8) Passé ce temps, la lecture est réalisée en comptant, pour chaque boîte, le nombre de plages de lyse obtenues. 9) Le titre de la suspension virale, exprimé en « unités formant plages par millilitre » (UFP/mL) est obtenu en multipliant le nombre de plages par le facteur de dilution décimale correspondant:

$$\frac{UFP}{mL} = \frac{Avg.\# \text{ de plages de lyse}}{D*V} \quad (4.1)$$

Ici, D est la dilution et V est le volume du virus dilué ajouté à la plaque.

NOTE: Par exemple, 30 et 32 plaques comptées pour des répliquats de la dilution 1×10^{-5} [31 (moyenne) / 10^{-5} (dilution) x 0.1 ml (volume)] donneraient un titre de 31×10^6 pfu / mL.

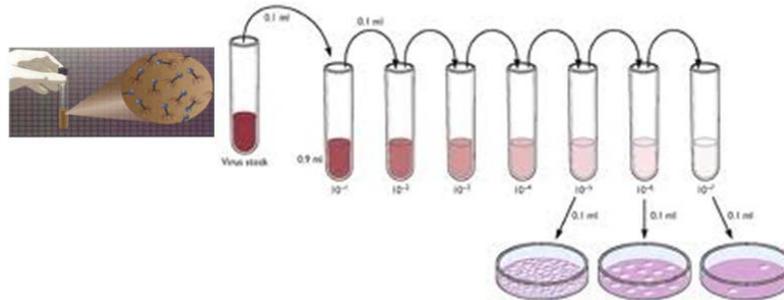


Figure 4. 4 Illustration schématique de la dilution de phages

En parallèle du titrage des échantillons, un témoin positif pour les bactériophages M13 et MS2 sont réalisés afin de confirmer les résultats. Il permet de garantir la bonne réceptivité et sensibilité de la souche hôte vis-à-vis du bactériophage MS2. Conservé à -80°C , le témoin positif du bactériophage et M13 et MS2 sont calibré à environ 100 UFP/mL. Afin de valider ce témoin positif, il est nécessaire que celui-ci appartienne à l'intervalle constitué par la moyenne de tous les précédents témoins ± 2 écart-types. De plus, deux témoins négatifs sont réalisés lors de chaque titrage, l'un avec la bactérie seule afin de vérifier que la culture bactérienne n'est pas contaminée et l'autre avec le tampon phosphate utilisé pour les dilutions du phage afin de confirmer également l'absence de contamination.

4.2.8 La limite de détection

Nous avons établi une différence entre seuil de détection (plus petite quantité de bactériophages pouvant être détectée) et seuil de quantification (plus petite quantité pouvant être dosée). En effet, la plus petite quantité de bactériophages pouvant être détectée mais non nécessairement quantifiée avec exactitude (résultats non reproductibles) correspond à la limite de détection, tandis que la plus petite quantité de bactériophages pouvant être dosée (résultats reproductibles) équivaut à la limite de quantification.

Les limites de quantification (inférieure et supérieure) pour l'énumération du phage sont respectivement 30 et 300 UFP par boîte de Petri. Étant donné les limites de quantification

(inférieure et supérieure) accordées au comptage de plaque de lyse qui consiste à prendre en compte seulement les boîtes contenant entre 30 et 300 plages, le plus petit nombre de plages de lyse qu'il sera possible de quantifier correspond à 30 plages. La limite de détection déterminée pour les bactériophages M13 dans une étude précédente est identique pour les 2 phages égale à 1 UFP/mL, équivalente à la limite de détection que nous avons observée. Les limites de quantification n'étant jamais différenciées des limites de détection souvent très faibles, nous proposons d'en tenir compte lorsque des concentrations seront calculées. Ainsi, d'après la limite de quantification indiquée ci-dessus (30 UFP/mL) à atteindre égal à 6.92 en échelle logarithmique ($\text{Log}_{10}(2.48 \times 10^8 / 30)$), la concentration initiale minimum que l'on devra choisir pour la suspension est de 2.48×10^8 UFP/mL.

L'incertitude sur le nombre de plages de lyse est l'accumulation de deux événements. Le premier correspond à l'erreur effectuée lors du comptage des plages de lyse sur une même boîte : plus ou moins 2 plages de lyse. Le second est dû à l'erreur expérimentale relative au dénombrement qui a été déterminée par une expérience réalisée à partir d'une solution stock de bactériophages M13, en effectuant une série de dilutions de 1/10 (de 10^9 à 1) dans du TBS. Chaque dilution a été ainsi étalée 10 fois. Les 10 boîtes correspondant à une même dilution ont été comptées et comparées.

4.3 Dosage des dommages à l'ADN

Pour déterminer si l'ADN viral est affecté par l'irradiation laser, une portion de 400 paires de bases est amplifiée par la réaction en chaîne de la polymérase (PCR), puis analysée pour déterminer la fragmentation par l'électrophorèse sur gel d'agarose et comparée aux échantillons de contrôle.

Pour la PCR, un volume d'échantillon total de 25 μL est préparé dans un tampon 1xTAQ. Chaque échantillon contenait 1.5 μL MgCl_2 (25 mM), 0.5 μL de dNTP (200 μM), 1 μL (0.2 μM) de chaque amorce, 0.125 μL (0.75 μM) de polymérase TAQ, and 0.5 μL de l'échantillon M13 exposé. L'amorce avant (Forward primers) 21 bases de long et l'amorce inverses de 22 bases de long, respectivement (Forward: 5'-TGTACCGTAACACTGAGTTTC-3'; Reverse: 5'-ATTCACCTCGAAAGCAAGCTGA-3'). Tous les échantillons ont été préparés en trois exemplaires. Le protocole pour la PCR est:

- ✓ Eau Nucléase (Nuclease-free Water): 16.375 μL ;
- ✓ TAQ Buffer(10X ThermoPol or Standard Taq Reaction Buffer) : 2.5 μL ;
- ✓ Chlorure de magnésium (MgCl_2): 1.5 μL ;

- ✓ 10 mM dNTP (10 mM dNTPs): 0.5 µl;
- ✓ 10 µM FWD (10 µM Forward Primer): 1 µl;
- ✓ 10 µM Reverse Primer :1 µl;
- ✓ Simple (l'échantillon): 0.5 µl;
- ✓ TaqDNA Polymerase: 0.125 µl.

L'amplification est effectuée dans un thermocycleur TProfessional Basic Gradient de Biometra. Le programme d'amplification a débuté à 94 °C pendant 10 min, suivi de trente-cinq cycles de 94 °C pendant 1 min, ensuite de 49 °C durant 1 min et de 72 °C pendant 1 min. Après les cycles, la température est maintenue à 72 °C pendant 10 min, puis maintenue à 4 °C pour le stockage.

L'analyse des produits de PCR est effectuée en utilisant une électrophorèse sur gel d'agarose à 1%, à une tension constante de 80 V pendant 60 minutes. Pour chaque puits, 10 µL de produit de PCR et 4 µL de mélange glycérol / colorant sont préparés. En utilisant une échelle d'ADN, les bandes résultantes sont identifiées comme étant le «produit souhaité» (400 paires de bases) ou le «produit endommagé» (consistant principalement en fragments de 100 et 200 paires de bases). Les intensités de bande sont identifiées et quantifiées par rapport à l'intensité de l'échantillon contrôle non irradié (contrôle), à l'aide du logiciel d'analyse ImageJ. L'imagerie de l'ADN a été réalisée à l'aide de Safe-T-Stain, un agent intercalant qui devient fluorescent après une excitation UV.

Les intensités des bandes résultantes sont analysées en utilisant l'analyse de la variance à un facteur (ANOVA) à un facteur ($n = 3$ pour chaque point de temps) suivi d'un test de Tukey (déterminer les différences significatives entre les moyennes de groupes dans une analyse de variance) qui peut être utilisé pour déterminer les différences significatives entre les moyennes de groupes dans une analyse de variance). Chaque point a été comparé à la référence. Si $p < 0.05$, les données sont significativement différentes de la référence. On décrit également que l'intervalle de confiance est de 95%.

4.4 Dispositif expérimental: Source d'excitation

4.4.1 Chaîne laser femtoseconde

Cette section a pour objet la description de l'outil essentiel pour l'étude de l'inactivation des bactériophages, le laser à technologie titane-saphir. Comme nous venons de le préciser, ce laser est un outil de travail, c'est-à-dire il ne fait l'objet d'aucun développement particulier dans le cadre de ce travail de thèse. Cependant, il convient d'en comprendre les détails de

fonctionnement, car ce sont eux qui caractériseront les propriétés des impulsions en sortie du boîtier laser. Il faut donc être capable de réaliser la mesure des propriétés des impulsions générées par le système laser et, en cas de problème, être capable d'identifier les possibles problèmes afin de les résoudre. Dans ce but, nous commencerons tout d'abord par une description assez brève de fonctionnement général des lasers à technologie titane-saphir, en particulier les mécanismes permettant la génération d'impulsions courtes. La figure 4. 5 est une vue schématique des divers éléments de cette chaîne [117]. Une source femtoseconde est généralement constituée d'un oscillateur produisant un train d'impulsions ultracourtes, d'un étage d'amplification augmentant l'énergie des impulsions de plusieurs ordres de grandeur, et enfin d'un étage de génération d'impulsions de longueurs d'onde appropriées obtenues par des processus d'optique non-linéaire. Le système laser développé à ALLS est basé sur la technologie Titane-Saphir (Ti:Saphir). Le cristal de saphir Al_2O_3 , d'une excellente conductivité thermique, chimiquement stable, très dur et réfractaire, est dopé avec des ions Ti^{3+} avec une concentration de 0.2 % en masse. Ce milieu correspond à un système à quatre niveaux, dont le spectre d'absorption est situé entre 400 nm et 600 nm et celui de fluorescence entre 700 nm et 1100 nm. La courbe de gain de ce milieu est très large et permet d'obtenir un laser à large spectre dont la longueur d'onde centrale varie entre 750 et 950 nm (en changeant la série de miroirs diélectrique utilisés dans la cavité).

Le point de départ de toutes les impulsions disponibles dans notre chaîne est l'oscillateur. L'oscillateur fournit des impulsions d'une durée de l'ordre de 20 fs, avec une énergie de 4 nJ et d'une largeur spectrale de 47 nm. La cadence de l'émission des impulsions est de l'ordre de 75 MHz. Cependant, cette énergie n'est pas suffisante pour les applications désirées (accélération et amélioration de l'inactivation des bactériophages). Il faut donc maintenant amplifier ces impulsions. L'amplification est fortement limitée par le seuil d'endommagement des optiques d'amplification, notamment le milieu de gain, ce qui a longtemps empêché la génération d'impulsions de très hautes puissances crêtes. Ce problème fut résolu par Gérard Mourou et Donna Strickland en 1985 [118] grâce à la technique de l'amplification à dérive de fréquence ou CPA (acronyme anglais de: «Chirped Pulse Amplification»). Tout d'abord, la puissance des impulsions est réduite en passant dans l'étireur (figure 4.5 (n 3)). Celui-ci est composé de deux réseaux de diffraction qui vont étirer temporellement les impulsions d'un facteur entre 100 et 10^5 (rapport entre la durée de l'impulsion étirée et la durée de l'impulsion initiale) afin de réduire l'intensité crête des impulsions au cours de l'amplification. Ensuite, l'énergie des impulsions est augmentée dans l'amplificateur régénératif.

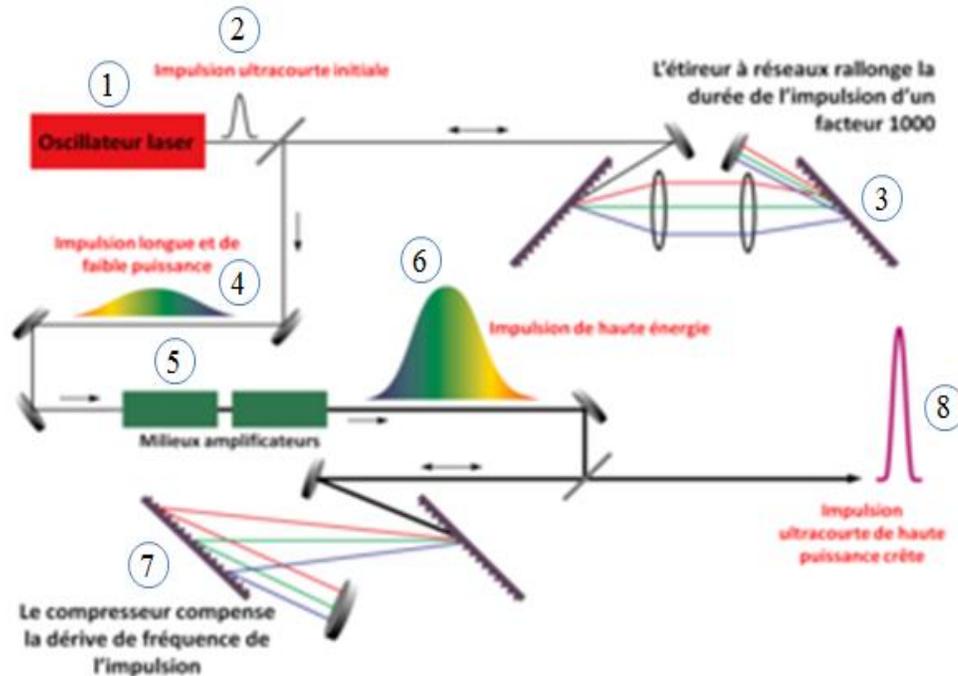


Figure 4. 5 Schéma de la chaîne d'amplification à la dérive des fréquences : 1) Oscillateur 2) Impulsion femtoseconde (faible énergie) 3) Étireur 4) Impulsion étirée (faible énergie) 5) Amplificateur régénératif (Figure 4 (a)) 6) Impulsion étirée (haute énergie) 7) Compresseur 8) Impulsion femtoseconde (haute énergie) [117].

L'amplification se fait au moyen d'un laser Nd:YLF Q-switched doublé en fréquence, d'un second cristal titane-saphir et d'une cavité régénérative. Le laser Nd:YLF pompe le Ti:Sa et les impulsions étirées vont s'amplifier par émission stimulée. Les impulsions effectuent de multiples passages dans la cavité avant d'atteindre leurs puissances maximales. Après un nombre optimum de passage, les cellules de Pockels tournent la polarisation des impulsions de manière à ce qu'elles soient envoyées hors de la zone d'amplification par le polarisateur. Après amplification, les impulsions ont une durée égale à 210 ps, une énergie maximale de 300 mJ à un taux de répétition de 10 Hz. A la sortie de l'amplificateur, les impulsions sont recomprimées temporellement dans le compresseur à vide afin de retrouver des impulsions courtes. Il est composé de deux réseaux de diffraction dont un qui est mobile. Ainsi, nous pouvons régler la durée des impulsions et compenser la dispersion chromatique.

4.4.2 Montage expérimental

Le dispositif expérimental effectivement utilisé au cours de cette étude est présenté sur la figure 4.6. La source d'excitation utilisée dans ce travail est un laser titane saphir (*Ti-Sa*) avec la

longueur d'onde centrée autour de 800 nm, la largeur spectrale de 47 nm. La fréquence de tir de l'oscillateur de 75 MHz est ramenée à une cadence moindre à l'aide d'un sélecteur d'impulsion basé sur un cristal électro-optique. Dans le cas de notre laser pour l'étude de l'inactivation, la cadence est ramenée à 10 Hz. Le faisceau est émis en géométrie colimatée avec un diamètre initial de 3 cm. L'un des principaux avantages de ce système pour nos expériences est le compresseur réglable, qui permet de modifier la durée du laser en introduisant une modulation de fréquence linéaire en ajustant la distance entre les réseaux de diffraction du compresseur. Ce réseau de diffraction va introduire une différence de chemin entre les différentes composantes spectrales de l'impulsion. Certaines « couleurs » parcourront donc une distance plus grande que d'autres dans le dispositif d'étirement de l'impulsion. La calibration du compresseur a été effectuée à l'aide d'un autocorrélateur pas à pas. La position $d=0$ correspond à la durée minimum de l'impulsion $\tau_L=40$ fs sans chirp. Lorsque l'on augmente la distance entre les deux réseaux du compresseur, la durée de l'impulsion est augmentée en introduisant un chirp en raison des effets dispersifs et par la même occasion l'intensité laser est diminuée. On parle alors d'introduction d'un « chirp » dans l'impulsion, c'est-à-dire, la phase de l'impulsion sera une fonction du temps, quadratique idéalement. Une impulsion chirpée positivement verra donc les composantes rouges arriver avant les bleues et inversement pour une impulsion chirpée négativement. La durée d'impulsion est modifiée par pas selon le besoin de l'expérience, de 40 fs jusqu'à 1.5 ps. Le système laser délivre une impulsion de durée nominale 40 fs, et son étirement dans le temps est géré par l'introduction d'une dérive de fréquence contrôlée en déréglant le compresseur en fin de chaîne laser par rapport à sa position optimale. Pour toutes les expériences présentées, la dérive de fréquence introduite est positive. Pour mesurer la durée des impulsions incidentes des lasers à 800 nm et à 400 nm sur l'échantillon, nous avons utilisé deux techniques: l'interférométrie spectrale de phase pour la reconstruction directe par champ électrique (« Spectral phase interferometry for direct electric-field reconstruction » : SPIDER) [119] et auto-corrélation résolue en fréquence (« Frequency-Resolved Optical Gating » : FROG) [120]. À partir de ces mesures, nous avons vérifié que la variation de l'énergie laser (et donc de la puissance) ne modifie pas la durée de l'impulsion. Nous avons utilisé un contrôleur d'intensité variable pour faire varier l'énergie de l'impulsion laser. Ce contrôleur à intensité variable se compose de deux polariseurs en couche mince et d'une lame demi-onde. Il est placé avant le compresseur dans l'amplificateur. Le premier polariseur est utilisé pour définir la polarisation linéaire du faisceau incident, tandis que l'axe de passage du second polariseur est réglé dans la direction de polarisation avec l'efficacité maximale de diffraction des réseaux du compresseur. La demi-lame d'onde, qui est placée

entre ces deux polariseurs, sert à inverser la polarisation du laser incident. En faisant pivoter le plan de polarisation des impulsions laser incidentes d'horizontale à verticale, l'énergie des impulsions femtoseconde comprimées variait du maximum au minimum. Avant chaque expérience, l'énergie des impulsions (E_L) est mesurée après la lentille de focalisation à l'aide d'un détecteur pyroélectrique (J-10MB-LE, Coherent) et d'un compteur d'énergie (LabMax-TOP, Coherent). Lorsque nous parlons d'énergie mesurée, nous considérons l'énergie moyenne du faisceau. Une lentille ($f = 50 \text{ cm}$) est utilisée pour focaliser le faisceau laser dans la zone d'échantillonnage. Le diamètre du faisceau laser qui interagit avec les échantillons est de 1 cm dans toutes les expériences. La combinaison du grand diamètre du faisceau laser avec une haute énergie (20 mJ) résulte en un traitement viral rapide qui peut surmonter le besoin de temps d'irradiation longs et éliminer les contraintes sur la mise en œuvre pratique correspondante.

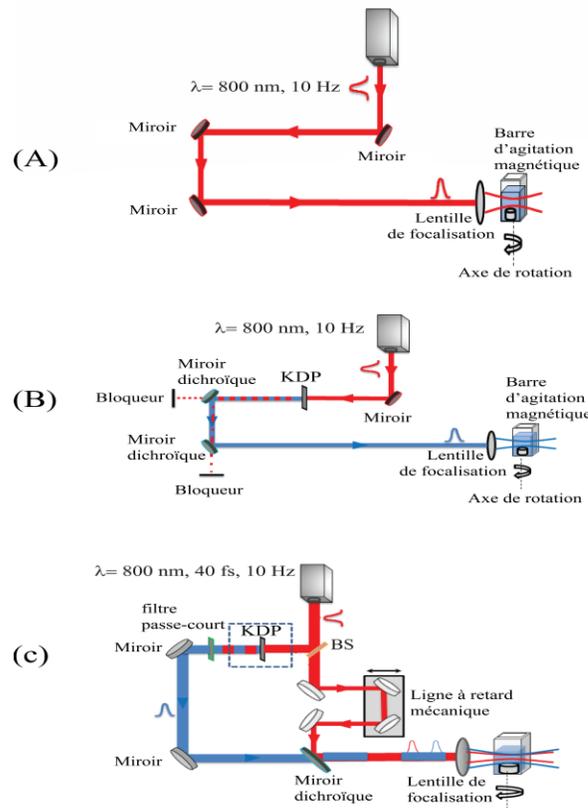


Figure 4.6 Montage expérimental. Les diagrammes A, B et C concernent des expériences avec le laser 10 Hz à différentes longueurs d'onde: (A): 800 nm; (B): 400 nm et (C): 800 nm et 400 nm.

Pour ces expériences, nous avons utilisé le laser avec différentes longueurs d'onde pour le processus d'inactivation du virus. Premièrement, l'impulsion principale à une durée d'impulsion

de l'ordre de 40 fs, une énergie de l'ordre du 20 mJ et une longueur d'onde centrale de 800 nm est focalisée sur l'échantillon au moyen d'une lentille de longueur focale égale à 50 cm (figure 4.6 (A)). Ensuite, la longueur d'onde du laser est convertie en seconde harmonique de 800 nm en utilisant un cristal de potassium-dideuterium phosphate (KDP), produisant de la lumière à une longueur d'onde de 400 nm. A partir d'impulsions polarisées horizontalement à 800 nm, le cristal produit des impulsions polarisées verticalement à 400 nm par génération de seconde harmonique (SHG). Le taux de conversion de ce procédé dépend du carré de l'intensité du laser incident, du carré de l'épaisseur du matériau et du carré de la susceptibilité non-linéaire χ du matériau (le taux de conversion de l'ordre 13.6 % dans notre cas). Nous avons compressé temporellement les impulsions à 400 nm pour que la conversion soit maximale. Dans nos expériences, l'énergie du faisceau doublé est 20 mJ. Les deux miroirs dichroïques (400HR/800HT) que nous avons utilisés permettent de séparer l'excitation infrarouge et le signal de seconde harmonique émis dans le bleu en réfléchissant plus de 90% des longueurs d'onde supérieures à 750 nm et en transmettant à plus de 90% les longueurs d'onde inférieures à 700 nm. Le faisceau laser à longueur d'onde 800 nm est réfléchi à environ 95% et le signal de seconde harmonique émis à la longueur d'onde de 400 nm est transmis à environ 95% (figure 4.6 (B)). L'énergie laser à 400 nm varie en faisant varier l'énergie laser à 800 nm à l'aide du contrôleur d'intensité variable. Enfin, nous avons également réalisé des expériences d'inactivation simultanée en utilisant conjointement les longueurs d'ondes 800 nm et 400 nm (figure 4.6 (C)). Une seule impulsion est scindée en deux à l'aide d'une optique séparatrice (BS: « Beam splitter ») pour former l'impulsion pompe et l'impulsion sonde: le faisceau pompe (30%) et la sonde (70%). Ces deux impulsions parcourent alors deux chemins optiques, dont la différence est ajustable à l'aide d'une ligne à retard mécanique, jusqu'à une optique de recombinaison (OR) où elles sont recombinaison. L'impulsion sonde des deuxièmes harmoniques est générée en utilisant un cristal de *KDP*. Un filtre passe-court (BG39, Schott), centré sur la longueur d'onde de 400 nm, a permis de sélectionner uniquement le signal de seconde harmonique. Les deux impulsions à 800 nm et à 400 nm sont combinées à l'aide d'un miroir dichroïque à transmission élevée à 400 nm et à haute réflectivité à 800 nm, puis sont focalisées de manière colinéaire par une lentille de $f = 50$ cm. Le retard de phase relatif entre les faisceaux fondamental (ω) et le second harmonique (2ω) est:

$$\phi(\lambda) = \frac{2\pi}{\lambda_w} (n_\omega - n_{2\omega}) * L + \phi_0 \quad (4.2)$$

Ici, L est la longueur de propagation et ϕ_0 est la phase relative au point de départ due à la fois à la condition d'adaptation de phase KDP et à la dispersion dans l'air. De plus, n_ω et $n_{2\omega}$ sont les

indices de réfraction aux deux longueurs d'onde optiques. La longueur de déphasage l_d est définie par la formule suivante:

$$l_d = \frac{\lambda}{2(n_{\omega} - n_{2\omega})} \quad (4.3)$$

Pour les conditions expérimentales mentionnées ci-dessus, $l_d \sim 27 \mu\text{m}$. Étant donné que la longueur d'interaction avec l'échantillon est d'environ 1 cm, nous nous attendons à ce que, pour une irradiation simultanée à deux couleurs, les impulsions à 400 nm et à 800 nm subissent un déphasage rapide. Les impulsions de 400 nm et 800 nm avaient des énergies d'impulsion d'environ 7.5 mJ et de 12.5 mJ, respectivement. La tache focale du faisceau est centrée sur la cuvette à mi-chemin entre le ménisque du liquide et le fond de la cuvette. Dans notre configuration, un cylindre d'environ 1 cm de diamètre et 1 cm de long représente le volume actif dans lequel le laser peut interagir efficacement avec les phages. Les bactériophages dans toutes les expériences d'inactivation sont contenus dans une cuvette cylindrique en verre BK7 (dimensions: 22.5 x 12.5 x 12.5 mm) avec une concentration de 8.48×10^7 UFP/mL et 1 mL / cuvette. Une barre d'agitation magnétique (Fisherbrand) est utilisée pour assurer l'homogénéité de la solution de bactériophages (M13 ou MS2) interagissant avec le laser. Ce barreau placé au fond de la cuvette n'a pas perturbé la propagation de faisceau. Cependant, connaissant la taille du barreau et la fréquence de rotation, on peut estimer la vitesse de déplacement du liquide dans la cuvette par le barreau qui tourne et obtenir ainsi une idée de l'homogénéité de l'exposition. Le déplacement de la barre magnétique correspond à un disque d'un volume d'environ 404 mm^3 pendant une rotation complète; le taux de rotation a été estimé à 100 tr / min, ce qui correspond à un volume d'environ 40 mL / min. Cela signifie que le volume total du liquide dans la cuvette est déplacé environ 40 fois par minute par la barre en rotation.

Un thermocouple est utilisé pour mesurer la température de l'échantillon afin de s'assurer que l'inactivation n'est pas due aux effets thermiques. Toutes expériences présentées sont effectuées à $25 \text{ }^\circ\text{C}$ et la température des échantillons dans la cuvette est mesurée avant et après chaque traitement laser.

5 RESULTATS EXPERIMENTAUX ET ANALYSE

L'inactivation des virus peut s'expliquer par divers mécanismes. L'inactivation est la destruction du pouvoir pathogène d'une substance ou d'un microorganisme. Dans le cas des virus, l'inactivation est le résultat d'une altération de la capsid virale. Une capsid altérée signifie que le virus n'est plus infectieux (non quantifiable par la culture bactérienne), mais cela n'implique pas nécessairement une altération de son génome (ADN ou ARN) présent dans la capsid (quantifiable par PCR). La perturbation de la capsid virale peut être étudiée en surveillant la concentration de virus infectieux dans le temps et en le comparant à la concentration virale totale, qui représente tous les virus initialement présents en suspension.

L'utilisation du laser femtoseconde pour inactiver les microbes a récemment suscité l'intérêt de nombreux chercheurs [13, 29, 44-56]. Par conséquent, il existe divers rapports sur l'efficacité et les avantages laser femtoseconde dans l'inactivation microbienne; et aussi la potentialité des systèmes de traitement laser adoptés pour un usage industriel à cet égard [13, 29, 44-56]. L'efficacité de l'inactivation des agents infectieux par le laser femtoseconde dépend de nombreux facteurs (tableau 5.1). Ces facteurs peuvent être divisés en deux groupes: les paramètres de source laser femtoseconde (tels que la durée du traitement, la densité d'énergie, la longueur d'onde, et la durée d'impulsion,...) et les paramètres cibles (la taille biologique, et la composition du génome viral,...). Tous ces facteurs affectent les différentes étapes de l'inactivation des agents infectieux. Certaines études menées jusqu'à présent montrent que l'efficacité de l'inactivation varie en fonction des paramètres du laser femtoseconde [13, 29, 44-58]. La nécessité d'avoir une vue d'ensemble sur ces facteurs d'influence sur l'inactivation permet l'étude de diverses espèces bactériophages qui sont très différents sur le plan biologique. C'est donc naturellement que de nombreux paramètres sont sélectionnés, afin de déterminer le comportement des pathogènes dans les divers environnements de traitement d'inactivation. Il est évident que ces différents facteurs interfèrent entre eux et que leurs effets sont cumulables; cependant, afin de simplifier leur étude, ils sont traités séparément.

Tableau 5.1 Paramètres laser femtoseconde utilisés pour l'inactivation des virus

Source	Cible
Temps d'exposition (min)	Type de phage: Composition du génome viral, Taille
Duration d'impulsion (τ_L)	pH
Densité d'énergie (mJ/cm^2)	Propriété de surface de phage (purifié et non purifié)
Longueurs d'onde d'excitation (nm)	Composition de solution
Chirp	Concentration initiale des phages

Les résultats sont présentées dans ce chapitre qui se scinde en quatre parties distinctes. Dans une première partie, nous améliorons l'inactivation des agents infectieux en optimisant les différents paramètres clefs régissant le procédé d'inactivation par le laser femtoseconde afin de déterminer les phénomènes impliqués dans les mécanismes d'inactivation des bactériophages. À cette fin, les bactériophages M13 sont exposés au rayonnement laser femtoseconde émettant dans le visible et le proche infrarouge. Dans une deuxième partie, nous comparons l'efficacité des traitements laser femtoseconde sur deux différents phages, MS2 et M13. Dans une troisième partie, nous déterminons l'impact de ces propriétés interfaciales sur le comportement des virus lors de l'inactivation. Enfin la dernière partie est consacrée à la détection des radicaux. Nous allons ici nous intéresser à deux types d'expériences complémentaires. Nous pressentons, dans un premier temps, une expérience permettant de considérer qualitativement l'effet de l'oxygène singulet sur l'inactivation par l'utilisation d'un composant chimique antioxydants permettant de capter les radicaux génère. Dans un second temps, nous nous sommes intéressés à des méthodes optiques de détection indirecte de l'oxygène singulet.

5.1 Les paramètres de source laser femtoseconde

5.1.1 Influence de la durée du traitement

Le laser femtoseconde dans le domaine visible ou proche infrarouge s'avère capable d'inactiver sélectivement un large spectre d'agent infectieux de manière dépendante de paramètres laser [13, 29, 44-58]. Le premier objectif de cette étude est d'apporter de nouveaux éléments expérimentaux capables de réduire le temps d'inactivation du virus (plusieurs minutes) en grands volumes (1 cm³) par rapport aux méthodes précédentes qui sollicitent des temps d'inactivation plus longs (1 heure ou plus) pour des volumes plus petits [13, 29, 44-58]. À cette fin, on a irradié 1 mL de suspension de virus avec des impulsions à la fois ultra-courtes et intenses en fonction du temps d'exposition laser allant de 1 min à 15 min pour différentes longueurs d'onde d'excitation (800 nm, 400 nm et 800/400 nm). L'intensité estimée du laser sur la cible est de 0.6 TW cm⁻². La figure 5.1 représente la réduction de charge (échelle log₁₀) des bactériophages M13 ayant été soumis au traitement laser femtoseconde, en fonction du temps d'exposition et ce pour les différentes longueurs d'onde d'excitation. Les conditions opératoires suivantes ont été utilisées: l'énergie d'irradiation constante de 20 mJ par impulsion, le taux de répétition de 10 Hz, la durée d'impulsion (τ_L) de 40 fs et de longueur d'onde d'excitation λ de 800 nm, 400 nm et des deux longueurs d'onde combinées (dont les énergies d'impulsion étaient de 13.5 mJ à 800 nm et de 7.5 mJ à 400 nm). Une concentration de 8.51×10^7 UFP/mL de M13

est utilisée dans ces expériences. Toutes les expériences sont effectuées en triple. Les erreurs sont exprimées en écarts-types (SD). Le temps d'exposition maximal que nous ayons utilisé est de 15 min. La réponse des agents infectieux au laser femtoseconde est calculée en déterminant la concentration en agents infectieux avant et après le traitement laser et en appliquant l'équation:

$$\log \text{Reduction} = \log_{10}(N_0) - \log_{10}(N_t) \quad (5.1)$$

Ici, N_0 est la concentration de l'échantillon non traité et N_t , la concentration des échantillons traités exposés au rayonnement laser. Les échantillons de contrôle décrits sont constitués d'un échantillon sans exposition au laser qui a été conservé sous réfrigération pendant l'expérience. Ces échantillons de contrôle n'ont jamais différencié de manière significative et ont été prélevés pour vérifier la perte de titre dans la suspension traitée.

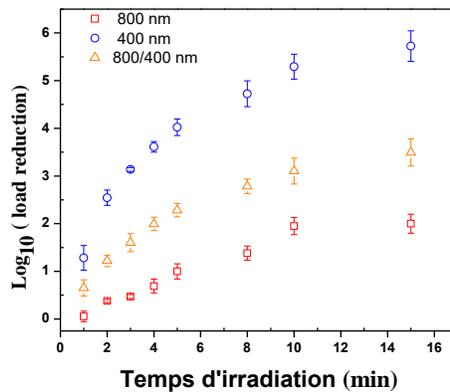


Figure 5.1 Réduction de charge du bactériophage M13 en fonction du temps d'irradiation pour les différentes longueurs d'onde laser. Toutes les données (n = 3) sont exprimées sous forme de moyenne ± écart type.

Les résultats d'inactivation obtenus avec le traitement laser montrent une inactivation significative du bactériophage M13 (ANOVA, $p = 2.05 \times 10^{-4}$). Comme on peut le voir sur la figure 5.1, la réduction de la charge (load reduction) des bactériophages M13 dépend de la durée du traitement laser; l'inactivation des bactériophages M13 testés augmente progressivement avec l'augmentation du temps de traitement. Par exemple, après 5 minutes de traitement laser à impulsions ultra-brèves, on observe une réduction de charge, en échelle \log_{10} , de 0.99 ± 0.01 à 800 nm, de 4.72 ± 0.17 à 400 nm et de 2.3 ± 0.1 pour les deux longueurs d'ondes ensemble. Au bout de 15 minutes, la réduction est de 5.8 ± 0.3 à 400 nm et de 1.9 ± 0.2 pour 800 nm. Lorsque l'échantillon est irradié par des impulsions ultra-courtes avec deux longueurs d'onde combinées, on observe une réponse intermédiaire. Une forte durée d'irradiation conduit à un

fort état d'endommagement de capsid ce qui provoque une forte inactivation pour les virus. L'inactivation des bactériophages M13 par la lumière infrarouge est un processus beaucoup moins efficace que l'inactivation par la lumière visible. En effet, pour une longueur d'onde d'excitation donnée et pour des longues durées de traitement, une inactivation significative des agents infectieux peut être observée. La conclusion tirée est que l'efficacité d'inactivation est influencée non seulement par la durée de traitement, mais aussi par la longueur d'onde d'excitation.

Un thermocouple est utilisé pour mesurer la température de l'échantillon tout au long des expériences de traitement laser afin de s'assurer que les effets thermiques (chauffage) n'affectent pas le processus d'inactivation. Toutes les expériences ont été effectuées à 25 °C et la température des échantillons dans la cuvette est mesurée juste avant et après chaque expérience. On a constaté que l'augmentation de la température des échantillons ne dépasse pas 4 °C (température maximale est de 29 °C) après 15 min d'exposition au traitement laser. Par conséquent, les virus ont été inactivés pas à cause des effets thermiques appelées "macro thermique " puisque ces virus survivent normalement dans la flore intestinale à 37 °C.

La limite supérieure de l'augmentation de la température des échantillons peut être estimée en supposant que la chaleur due à l'absorption laser par l'eau n'est pas dissipée en dehors du volume irradié. Nous utilisons les coefficients d'absorption de l'eau de $1.96 \times 10^{-2} \text{ cm}^{-1}$ et de $5.84 \times 10^{-4} \text{ cm}^{-1}$ à 800 nm et à 400 nm, respectivement, avec le volume cylindrique d'eau irradié de 1cm d'épaisseur et 1cm de diamètre. Dans ce cas, la fraction du laser absorbée par l'échantillon M13 est respectivement de 1.97% et 0.06% pour les lasers à 800 nm et à 400 nm, respectivement. Pour un laser de puissance moyenne de 200 mW irradiant l'échantillon pendant 15 minutes, en utilisant la capacité thermique spécifique de l'eau, nous estimons l'augmentation de température maximale de 1.05 °C et de 0.025 °C pour les échantillons M13 ayant été soumis au traitement laser à 800 et à 400 nm, respectivement. Ces estimations montrent également que le chauffage de l'échantillon par le traitement laser ne devrait pas contribuer à l'inactivation des virus.

5.1.2 Détermination des paramètres cinétiques d'inactivation

Un modèle peut être défini comme « la description d'un système, d'une théorie ou d'un phénomène qui rend compte de ses propriétés connues ou présumées et peut être utilisé pour une étude plus approfondie de ses caractéristiques ». En pratique, un modèle est souvent une petite réplique d'un objet réel. Il constitue donc une description souvent simplifiée des relations

entre les observations du système (réponses) et les facteurs qui sont soupçonnés d'influencer ces dernières. Ainsi une observation peut être exprimée quantitativement grâce à des équations mathématiques. Par conséquent, un modèle mathématique peut simplement décrire des données ou également représenter une hypothèse ou une série d'hypothèses sous-jacentes à propos des relations entre les variables indépendantes qui conduisent aux observations. La première approche est souvent appelée un modèle «empirique», tandis que la seconde est décrite comme «mécaniste». Chacune peut être utilisée pour prédire la réponse du système à des changements dans les variables.

Lors du traitement laser, la charge microbienne diminue progressivement au cours du temps. Ainsi, de nombreuses études se sont penchées sur la modélisation de l'inactivation [110,121, 122].

Les modèles les plus rencontrés sont le modèle linéaire et le modèle de Weibull. Dans le modèle linéaire, il est considéré que l'inactivation microbienne due au traitement laser femtoseconde suit une loi du premier ordre [123-124]:

$$\log\left(\frac{N_t}{N_0}\right) = -\log\left(\frac{N_t}{N_0}\right)_0 + \frac{t}{D_t} = -\log\left(\frac{N_t}{N_0}\right)_0 + k_{max} t \quad (5.2)$$

où $\left(\frac{N_t}{N_0}\right)_0$ est le facteur de réduction initial, N_0 la population microbienne initiale, N_t la population microbienne survivante après une durée de traitement t et k_{max} (min^{-1}) le taux d'inactivation. La valeur k_{max} décrit la sensibilité d'un virus à l'inactivation par des traitement laser [13, 110, 121]. On remarque que, selon la figure 5.1, l'inactivation par le traitement laser à impulsions ultra-courtes est différente selon la longueur d'onde d'excitation et que par conséquent la cinétique d'inactivation sera différente d'une longueur d'onde à une autre. Les résultats de la détermination du taux d'inactivation des phages M13 à la décontamination par le traitement laser femtoseconde sont présentés sur le tableau 5.2. De manière générale, le tableau 5.2 montre que les valeurs k_{max} augmentent avec une diminution de la longueur d'onde d'excitation. Le taux d'inactivation le plus élevé est observé à 400 nm ($0.663 \pm 0.461 \text{ min}^{-1}$) suggérant une sensibilité plus élevée de M13 au traitement laser à 400 nm, tandis qu'à 800 nm la valeur $0.340 \pm 0,02 \text{ min}^{-1}$ reflète une population bactérienne résistante.

L'équation log-linéaire n'est appropriée que pour les courbes d'inactivation linéaires; des recherches ont cependant montré que de nombreuses courbes d'inactivation sont non linéaires. Plusieurs modèles non linéaires sont disponibles pour ajuster des courbes de destruction présentant différentes allures: un épaulement initial, un effet de traîne, une allure sigmoïde

(avec épaulement et traîne), une convexité ou concavité, une allure biphasique (avec 2 portions linéaires présentant des pentes différentes, ou encore avec épaulement). De nombreuses équations [16-19] permettent une modélisation généralement satisfaisante de courbes de destruction d'allures différentes [16-19]. Geeraerd et al. [123] ont proposé un logiciel, GlnaFit, de neuf différents modèles de survie microbienne. Parmi eux, le modèle de Mafart [123, 125-128] prend en compte la diversité de distribution au sein de la population bactérienne, inspirée de la distribution statistique de Weibull [123, 126-128]. Ce modèle simplifié peut s'adapter à des courbes concaves ou convexes (équation 5.3):

$$\log_{10}S(t) = -\left(\frac{t}{\alpha}\right)^{\beta} \quad (5.3)$$

Où $S(t)$ est la fraction des survivants à un moment donné t , $S(t) = \frac{N_t}{N_0}$, α (min) est appelé le temps de la première réduction décimale (correspondant à l'inverse de paramètre k_{\max} du modèle linéaire); plus α est grand, plus la durée de vie des individus est longue. Le paramètre β sans dimension décrit donc la forme de la courbe de survie. Pour $\beta < 1$, la concavité de la courbe de survie est tournée vers le haut, tandis que celle-ci est tournée vers le bas si $\beta > 1$. Pour $\beta = 1$, on retrouve évidemment le cas particulier d'une courbe de survie logarithmique linéaire. Il a été suggéré que $\beta > 1$ indique que les particules virales survivantes à n'importe quel moment de la courbe d'inactivation ont la capacité de s'adapter à la contrainte appliquée, alors que $\beta < 1$ indique que les particules virales restantes sont de plus en plus endommagées [123, 128]. Le tableau 5.2 montre que les valeurs α et β diminuent avec une diminution de la longueur d'onde d'excitation. Les valeurs β sont respectivement de 0.817 ± 0.073 et de 0.433 ± 0.031 pour 800 nm et 400 nm après 15 minutes de traitement laser.

Pour le modèle de Weibull, les résultats révèlent également que l'inactivation du laser à 800 nm est plus proche d'une forme log-linéaire ($\beta = 1$) que celle d'une inactivation à 400 nm. Puisque $\beta < 1$ correspond à une inactivation plus lente à des temps plus longs, l'ajustement montre que le taux d'inactivation voit une diminution plus forte pour l'inactivation à 400 nm à des temps plus longs. En fait, pour des durées d'irradiation supérieures à 10 minutes, nous voyons sur la figure 5.1 que la réduction de charge sature à 800 nm.

Pour les deux modèles, les courbes de survie sont ajustées en utilisant la procédure de régression linéaire et non linéaire de Microsoft Excel GlnaFit [123] pour déterminer les paramètres du modèle linéaire et du modèle Weibull. La qualité de l'ajustement des deux modèles a été évaluée en calculant le coefficient de corrélation (R^2) et l'erreur quadratique moyenne (MSE). Plus la valeur MSE est petite, plus le modèle s'adapte aux données. Plus la

valeur R^2 est élevée, plus le modèle décrit les données [121-123] de manière adéquate. MSE est défini comme:

$$MSE = \frac{\sum(\text{prédites} - \text{mesurées})}{m-p} \quad (5.4)$$

où m est le nombre de données expérimentales et p le nombre de paramètres du modèle. Les données d'inactivation et les paramètres du modèle ont été exprimés en moyenne \pm écart-type. Les paramètres des modèles linéaire et non linéaire sont estimés à l'aide du logiciel Microsoft Excel GinaFit. De plus, une méthode d'analyse de variance ($p = 0.05$, effet de temps) a été appliquée aux données de réduction du logarithme afin de vérifier si les valeurs obtenues pour chaque bactériophage diffèrent de manière significative les uns des autres à un temps d'exposition prescrit.

Les paramètres cinétiques d'inactivation, estimés par le modèle linéaires et Weibull, sont décrits dans le tableau 5.2. Lorsque les modèles linéaire et de Weibull sont comparés, le modèle de Weibull a montré une valeur R^2 nettement plus élevée et une valeur MSE plus faible, indiquant un meilleur ajustement aux courbes d'inactivation. Le modèle Weibull convenait bien à l'inactivation de M13 par le traitement laser avec des valeurs de R^2 comprises entre 0.957 et 0.998, tandis que le modèle de linéaire indiquait des valeurs de R^2 comprises entre 0.823 et 0.899. À 400 nm, les valeurs moyennes de R^2 pour les modèles linéaires et de Weibull sont: 0.823 et 0.957, tandis que les valeurs moyennes de MSE sont: 0.053 et 0.033, respectivement après 15 minutes de traitement.

En conclusion, le modèle de Weibull a fourni des prévisions plus précises de l'inactivation de bactériophage M13 à différents temps de traitement par rapport au modèle linéaire.

Tableau 5. 2 Des paramètres de la cinétique d'inactivation du modèle linéaire et du modèle de Weibull pour les bactériophage M13 en fonction longueurs d'onde d'excitation.

Longueur d'onde (nm)	Modèle linéaire				Modèle non linéaire «Weibull»			
	k (min ⁻¹)	ρ	R^2	MSE	α (min)	β	R^2	MSE
800	0.340 \pm 0.02	-0.113 \pm 0.137	0.823	0.053	5.623 \pm 0.697	0.817 \pm 0.073	0.998	0.030
400	0.663 \pm 0.046	-2.706 \pm 0.370	0.823	0.384	0.206 \pm 0.012	0.433 \pm 0.031	0.957	0.3536
800/400	0.454 \pm 0.027	-0.981 \pm 0.206	0.872	0.119	1.165 \pm 0.085	0.512 \pm 0.043	0.985	0.021

Afin d'évaluer le temps nécessaire pour que chaque longueur d'onde d'excitation atteigne l'élimination souhaitable des phages de M13, soit 1 log₁₀, 2 log₁₀, 3 log₁₀, et 4 log₁₀, les données d'inactivation sont ajustées par les modèles linéaire et de Weibull (tableau 5.3). Le tableau 5.3 résume le temps nécessaire à chaque longueur d'onde d'excitation d'atteindre une réduction de 4 log₁₀, 3 log₁₀, 2 log₁₀ et 1 log₁₀ de bactériophages M13 en suspension dans du PBS selon les deux modèles.

Tableau 5.3 Temps requis par chaque longueur d'onde d'excitation pour obtenir l'élimination de 4 log₁₀, 3 log₁₀ et 2 log₁₀ et 1 log₁₀ des bactériophages M13 selon des modèles linéaire et de Weibull.

Longueur d'onde d'excitation (nm)	Modèle cinétique	Le temps requis à la réduction 4 log ₁₀ (min)	Le temps requis à la réduction 3 log ₁₀ (min)	Le temps requis à la réduction 2 log ₁₀ (min)	Le temps requis à la réduction 1 log ₁₀ (min)
800	linéaire	27.16 ± 3.48 ^(b)	20.37 ± 1.80 ^(b)	13.58 ± 1.05	6.35 ± 0.68
	Weibull	30.68 ± 3.84 ^(b)	21.57 ± 2.67 ^(b)	13.14 ± 1.62	5.623 ± 0.70
400	linéaire	5 ± 0.59	3.30 ± 0.14	0.1	-
	Weibull	5.06 ± 0.30	2.63 ± 0.12	1.02 ± 0.059	0.23
800/400	linéaire	16 ± 1.65 ^(b)	9.56 ± 1.45	4 ± 0.75	0.6
	Weibull	17.46 ± 1.55 ^(b)	9.96 ± 1.25	4.5 ± 0.33	1.16 ± 0.085

^(b) Des temps supérieurs à 15 min ont été obtenus en projetant des données cinétiques.

L'étude cinétique a montré qu'une réduction virale de 4 log₁₀ nécessitait une durée de traitement de 5.06 ± 0.30 min à 400 nm alors que la même réduction est atteinte après 30.68 ± 3.84 min d'exposition selon le modèle de Weibull (27.16 ± 3.48 min selon le modèle linéaire) à 800 nm et 17.46 ± 1.55 min de durée de traitement selon le modèle de Weibull (16 ± 1.65 min selon le modèle linéaire) aux deux longueurs d'onde d'excitation combinées (calculées par extrapolation). Une multitude d'autres exemples aurait pu illustrer ce lien entre l'augmentation du temps d'exposition et l'efficacité du traitement.

5.1.3 Influence du temps d'irradiation sur l'intégrité de l'ADN

Après avoir grandement amélioré l'inactivation du bactériophage M13 induite par le laser femtoseconde, il est nécessaire de rechercher les causes de l'inactivation afin de clarifier le mécanisme par lequel l'inactivation virale se produit. Des recherches antérieures ont montré que la relaxation de l'ADN provoquée par un traitement laser femtoseconde peut induire des lésions génétiques, entraînant l'inactivation du virus de *Salmonella typhimurium* [54]. La relaxation de l'ADN induite par laser femtoseconde et les dommages génétiques ont été rapportés pour la première fois par Kong-Hon Tsen et al. [44, 45, 54, 57]. Ce dommage génétique induit par le laser femtoseconde est supposé être le principal facteur nuisible ayant

entraîné la réduction de la viabilité microbienne. Afin de mieux comprendre les effets génétiques induits par le laser femtoseconde, nous avons étudié le lien possible entre les dommages de l'ADN et la sensibilité du bactériophage M13 à l'irradiation laser femtoseconde, à différents temps d'exposition au traitement. À cette fin, nous avons irradié 1ml de suspension de bactériophage M13 avec des impulsions ultra brèves (40 fs) en fonction du temps d'exposition laser allant de 1 min à 20 min et cela pour différentes longueurs d'onde d'excitation (800 nm et 400 nm). L'intensité estimée du laser sur la cible est de 0.6 TW cm^{-2} . Les expériences sont effectuées avec le nouveau stock de bactériophage M13 purifiés selon un protocole amélioré (précipitation PEG + isoélectrique). Une concentration de 8.51×10^7 UFP/mL de M13 est utilisée dans ces expériences. Nous avons utilisé l'électrophorèse sur gel d'agarose pour déterminer si l'ADN double brin génomique du génome M13 est endommagé de manière covalente lors de l'irradiation par une impulsion laser femtoseconde dans le domaine visible ou proche infrarouge à une puissance moyenne de 200 mW. Pour voir si les dommages de l'ADN étaient la cause de l'inactivation du virus, nous avons quantifié la quantité de dommages causés à l'ADN le long d'une région de 400 paires de bases du brin de M13 après irradiation.

La région de 400 pb (point de base) de bases choisie au hasard est amplifiée par réaction en chaîne par polymérase (PCR) puis quantifiée via 1% d'agarose (80 V, 45 min) et comparée aux échantillons de contrôle. La figure 5.2 représente l'électrophorèse sur gel d'agarose d'ADN génomique extrait du phage M13 exposé à des impulsions laser ultra-courtes. Les paramètres d'exposition étaient de 400 nm, la durée d'impulsion de 40 fs, la fréquence d'impulsion de 10Hz, la tache focale de 1 cm et la concentration de M13 est 10^8 PFU/ mL dans une solution saline tamponnée au phosphate (PBS).

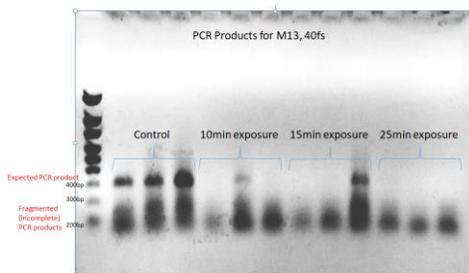


Figure 5.2 Électrophorèse sur gel d'agarose d'ADN génomique extrait du phage M13 exposé à d'impulsions laser ultra-courtes à 400 nm.

La figure 5.3 représente les lésions de l'ADN de bactériophage M13 tel que déterminé par le pourcentage de produits endommagés suite au traitement laser femtoseconde en fonction du temps d'exposition et ce pour les différentes longueurs d'onde d'excitation.

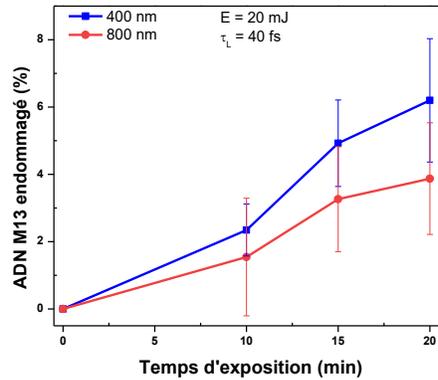


Figure 5.3 Pourcentage d'ADN M13 endommagé après une exposition à des longueurs d'onde laser de 400 nm (bleu) et de 800 nm (rouge). Toutes les données ($n = 3$) sont exprimées sous forme de moyenne \pm écart type.

La quantité d'ADN endommagé dépend de la durée du traitement laser, le dommage à l'ADN de M13 augmentant progressivement avec l'augmentation du temps de traitement. Lors de l'irradiation par une impulsion laser à 800 nm, une augmentation légère mais significative des dommages est évidente après 15 minutes d'exposition ($3.26 \pm 1.55\%$). De même, à une longueur d'onde de 400 nm, des dommages importants surviennent après seulement 15 minutes de traitement, avec $4.92 \pm 1.28\%$ de l'ADN affecté (figure 5.3). Bien que des dommages statistiquement significatifs à l'ADN soient observés, leur ampleur est bien inférieure à l'inactivation virale observée auparavant (figure 5.1) dans ces conditions ($E = 20$ mJ, durée d'impulsion de 40 fs et cadence de 10 Hz).

Nous pouvons en conclure que, bien que les dommages à l'ADN puissent contribuer à l'inactivation virale à $\lambda = 800$ nm et 400 nm, l'inactivation des bactériophages M13 à 800 nm ou 400 nm est causée principalement par un autre mécanisme que l'ISRS. Les résultats de ces travaux suggèrent que l'inactivation avec le laser à impulsions ultra-brèves femtoseconde due à l'ISRS est inévitable. Par conséquent, il doit être pris en compte avec d'autres processus qui se produisent dans des milieux complexes lorsque des impulsions courtes sont utilisées.

Fait intéressant, nos résultats expérimentaux suggèrent que l'inactivation des bactériophages par irradiation laser femtoseconde à haute énergie (20 mJ) est un effet combiné de la réduction

de viabilité (fonctionnalité) des bactériophages M13 et de dommages génétiques entraînant la rupture de la capsid virale induite par le laser femtoseconde. À des énergies plus élevées (20 mJ), l'impulsion laser femtoseconde utilisée pour l'inactivation du bactériophage M13 manque de sélectivité. Comme on peut le voir sur les figures 5.1 et 5.3, le génome viral et les protéines de la capsid virale sont tous les deux affectés pendant l'inactivation du virus, mais la contribution relative du génome et les dommages protéiques à l'inactivation diffèrent selon les paramètres du laser.

Les conditions d'exposition à une source d'inactivation donnée sont évidemment un facteur primordial influençant la survie des agents infectieux. En effet, l'efficacité du traitement dépend de l'énergie reçue par l'échantillon, elle-même dépendante du temps de traitement. Pour renforcer un processus d'inactivation deux cas de figure sont possibles: appliquer une forte dose pendant un temps relativement court (notre cas, 20 mJ, 15 min et 10 Hz) ou, faire l'inverse puisque théoriquement la relation dose-temps est réversible [13, 43-58], c'est-à-dire que l'inactivation des agents infectieux est proportionnelle à la dose appliquée (relation linéaire).

La recherche indique que lorsque les agents infectieux subissent une exposition aux irradiations laser femtoseconde, chaque augmentation successive de la durée d'exposition entraîne l'inactivation d'une portion constante de la population vivante. Ce rapport entre la dose et la réaction quant aux effets germicides montre que l'application d'un rayonnement laser femtoseconde de haute énergie pendant une courte période de temps produit le même effet destructeur qu'un rayonnement laser de moindre énergie pendant une période proportionnellement plus longue. Cela a été démontré avec différents pathogènes viraux notamment M13 [13, 50-58, 126]. Ces auteurs ont testé différentes densités d'énergie sur M13 en jouant également sur le temps d'exposition. Ils ont utilisé un oscillateur laser de très faible énergie (0.5 nJ / impulsion) avec une cadence d'émission plus élevée (80 MHz) pour une puissance moyenne de 0.04 W. Ils ont obtenu la réduction de charge, en échelle \log_{10} , de 3 du titre du M13 après une heure de traitement laser à 405 nm. Par ailleurs, notre travail actuel utilise des impulsions d'énergie supérieure (20 mJ / impulsion) à une cadence inférieure (10 Hz) pour une puissance moyenne de 0.2 W, entraînant une réduction de charge de 3 \log_{10} après 2 minutes de traitement laser. Cette configuration forte énergie et temps réduit semble intéressante pour les applications industrielles.

La comparaison des deux configurations: la configuration avec une forte dose a une cadence plus basse (10 Hz), et la configuration de faible énergie a une cadence plus élevée [44, 54], a également permis d'apprécier l'effet du cadence d'émission sur le processus d'inactivation. Le taux de répétition est un paramètre important qui est associée à l'inactivation des agents

pathogènes par le traitement laser femtoseconde [13]. L'effet d'impulsions laser multiples peut réduire considérablement la densité de puissance laser de seuil requis pour inactiver les agents pathogènes par l'irradiation laser femtoseconde via le processus ISRS [13].

5.1.4 Effet de durée d'impulsion

Le laser femtoseconde par l'intermédiaire d'un processus appelé *ISRS* représente un moyen actif pour exciter simultanément de nombreux états vibrationnels d'une capsidite conduisant ainsi à la destruction des bactéries et des virus [13, 44-58]. L'*ISRS* est basée sur l'excitation cohérente des modes de vibration d'un matériau par une ou plusieurs impulsions lumineuses. Il nécessite donc des impulsions laser plus courtes que la période de mode de vibration de l'échantillon considéré [49, 51, 126, 127]. D'après l'équation (3.8), on constate que l'amplitude de vibration induite Q_0 dépend fortement de la durée des impulsions via le terme exponentiel: la durée des impulsions doit être inférieure à la période du mode excité ($\tau_L \ll 2\pi/\omega_0 = T_0$) pour avoir une excitation efficace. Dans le domaine spectral, ceci correspond au fait que la fréquence du mode excité doit être inférieure à la largeur spectrale des impulsions: la force excitante de laser doit contenir des composantes spectrales proches de ω_0 . Afin de vérifier cette prévision, nous avons effectué des expériences d'inactivation des bactériophages M13 suspendus dans le PBS en fonction de la durée de l'impulsion laser en gardant la densité de puissance et la durée d'exposition constantes et ce pour différentes longueurs d'onde d'excitation. Nous avons varié la durée des impulsions laser de 40 à 1500 fs (pour ce travail, nous avons utilisé des impulsions chirpées positivement) en faisant varier la distance entre les deux réseaux du compresseur. Dans cette expérience, nous avons maintenu la densité de puissance du laser fixée à 17 GW cm⁻² et le temps d'exposition à l'irradiation à 8 min pour le laser à 800 nm, 2 min pour le laser à 400 nm et 2 min pour les deux longueurs d'onde combinées. Pour maintenir la densité de puissance du laser constante, nous avons augmenté l'énergie du laser au fur et à mesure que nous augmentions de τ_L . Par conséquent, pour une densité de puissance laser constante $P_{\text{peak}} = E / \tau_L$ (où E est l'énergie des impulsions), l'énergie des impulsions laser augmente linéairement avec l'augmentation de la durée de l'impulsion. Une concentration de 8.51×10^7 UFP/mL de M13 est utilisée durant ces expériences. La figure 5.4 représente la réduction de charge (échelle log₁₀) des bactériophages M13 ayant été soumis au traitement laser, en fonction de la durée d'impulsion et ce pour les différentes longueurs d'onde d'excitation.

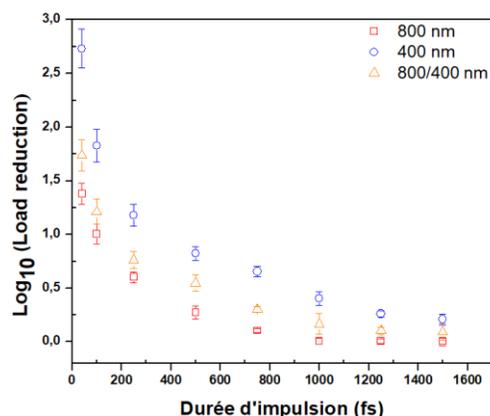


Figure 5.4 Réduction logarithmique de bactériophages M13 en fonction de la durée d'impulsion pour différentes longueurs d'onde d'excitation. Toutes les données ($n = 3$) sont exprimées sous forme de moyenne \pm écart type. La durée d'exposition était de 2 minutes pour 400 nm et 800/400 nm et de 8 minutes pour 800 nm.

Ces résultats indiquent que la réduction logarithmique des bactériophages M13 est une fonction exponentielle décroissante de la durée d'impulsion, mais avec différents taux d'inactivation. L'inactivation observée s'avère maximale lorsque la durée d'impulsion est courte et diminue progressivement à mesure que la durée d'impulsion du laser augmente à une densité de puissance laser et à une longueur d'onde d'excitation constante. Lorsque le phage M13 est exposé à une lumière de 800 nm pendant une période de 8 min, l'inactivation est très limitée ou nulle et elle est observée pour une durée d'impulsion laser > 1000 fs, tandis qu'une inactivation significative (≥ 1 sur l'échelle \log_{10}) est observée pour une durée d'impulsion laser ≤ 750 fs. Par exemple, à 800 nm, la réduction logarithmique de M13, soumis à un traitement laser ayant une durée d'impulsion de 40 fs, est de l'ordre de 1.38 ± 0.14 après 8 minutes d'exposition. Par contre, soumis à un traitement laser ayant une durée d'impulsion de 750 fs durant 8 min de traitement, la réduction logarithmique est de l'ordre de 0.14 ± 0.05 . L'inactivation des bactériophages M13 par la lumière visible est un processus beaucoup plus efficace que l'inactivation par la lumière proche infrarouge. Lorsque le bactériophage M13 est exposé à une lumière de 400 nm, très peu ou pas d'inactivation a été constaté lorsque la durée d'impulsion laser (τ_L) est supérieure à 1000 fs. Cependant avec la même densité de puissance, une inactivation importante a été observée pour $\tau_L \leq 750$ fs. Par exemple la réduction logarithmique de M13, soumis à un traitement laser à 400 nm ayant une durée d'impulsion de 40 fs, est de l'ordre de 2.73 ± 0.14 après 2 min de traitement. Par contre, exposés à un traitement ayant une durée d'impulsion de 750 fs pour une durée de 2 min, la réduction logarithmique est de l'ordre

de 0.41 ± 0.15 . Lorsque l'échantillon est irradié avec deux longueurs d'onde combinées, on observe une réponse intermédiaire.

En conclusion, la durée d'impulsion d'excitation laser est un facteur important. Plus la durée d'impulsion est courte, plus l'élimination des agents infectieux est notable. Ces résultats indiquent une dépendance de l'inactivation du virus de la longueur d'onde d'excitation et il est observé que le second harmonique du laser Ti: saphir est plus favorable pour une désactivation efficace lors de courtes durées d'exposition (2 min).

D'après l'équation (2.8) on constate que si l'intensité du laser I est maintenue constante, l'amplitude de vibration excitée aura un maximum lorsque la durée d'impulsion « τ_L » est ultracourte. Cela signifie que pour une fréquence de vibration donnée, la durée d'impulsion du laser d'excitation doit être choisie de telle sorte que $\tau_L < \frac{T}{4.44}$. Nos résultats expérimentaux ne correspondent pas à l'équation (3.8), qui prédit que l'amplitude de l'ISRS serait maximale lorsque $\tau_L = 0.225 T$, ce qui pour le bactériophage M13 serait d'environ 1 ps. Cependant, la figure 5.4 montre que nos tests expérimentaux utilisant des impulsions de ~ 1 ps entraînent une réduction de charge beaucoup plus faible que pour des impulsions plus courtes (40 fs), ce qui n'est pas compatible avec les prédictions de l'équation (3.8). Une des raisons de cet écart peut être que les durées d'impulsion plus longues accordent aux liaisons dans la molécule suffisamment de temps pour changer d'orientation pendant l'impulsion [95, 97, 129]. Une autre possibilité est que la durée d'impulsion courte d'environ 40 fs utilisée dans l'expérience dépose de l'énergie dans les nombreux modes de haute fréquence, qui ensuite se faufilent en cascade dans des modes de basse fréquence via une harmonicité. Une fois cette énergie est accumulée dans les modes basse fréquence, ils auront alors une amplitude suffisante pour surmonter la barrière potentielle qui maintient l'ensemble formé de la capsid [95, 96, 97, 129, 130].

Dans les études sur un phénomène aussi complexe, Il reste difficile de savoir si l'ISRS est le seul mécanisme (ou même le mécanisme le plus important) impliqué dans l'inactivation de M13 vue dans l'expérience. De plus, quelques procédés peuvent provoquer des effets similaires et il est donc difficile de distinguer lequel des deux est le plus important. Pour étudier comment les ISRS pourraient potentiellement conduire à l'inactivation des virus, une compréhension qualitative initiale de base de la façon dont les modes mécaniques d'un virus sont stimulés par ISRS est nécessaire.

Les sources laser utilisées dans le volet expérimental de cette thèse produisent des impulsions femtosecondes. Les impulsions ultra-brèves ont une durée de l'ordre de plusieurs dizaines de femtosecondes, ce qui implique la propagation avec une puissance et une intensité crête très

élevée. La focalisation des impulsions femtosecondes dans un matériau transparent permet de déposer l'énergie précisément dans la zone focale. De ce fait, une interaction complexe s'établit avec le milieu dans lequel les impulsions se propagent et de nombreux effets non-linéaires affectent la dynamique de propagation. Dans ce contexte, les caractéristiques d'une impulsion intense après s'être propagée à l'intérieur d'un milieu transparent sont fortement modifiées à cause des interactions non-linéaires entre l'impulsion et le milieu [131, 132]. Une manifestation spectaculaire de ces changements est la génération de "lumière blanche" (« supercontinuum » en anglais) [133- 135]. Le terme "lumière blanche" dans cette situation est défini comme une impulsion intense à large bande spectrale. Plusieurs études suggèrent que seuls les UV contenus dans le spectre des lumières blanches sont impliqués dans l'activité microbienne [136-138] puisque les autres longueurs d'ondes émises semblent peu ou pas absorbées par les acides nucléiques, les protéines ou le buffer (PBS) [136-138].

Dans la littérature, de nombreux auteurs ont étudié les effets du rayonnement UV sur les organismes vivants tels que les agents infectieux (bactéries, phages, champignons et moisissures, algues, cyanobactéries), les plantes supérieures et également les cellules humaines. Les effets et dommages observés sur ces différents organismes vont tout d'abord dépendre des caractéristiques des UV utilisés (A, B ou C), des conditions d'exposition aux UV (puissance, durée d'exposition, dose reçue...) mais également du niveau d'organisation biologique observé (organisme entier, cellule, molécule...) ainsi que des paramètres étudiés (croissance, taux de survie, mortalité, activité métabolique, effets directs et indirects...). Le mécanisme d'action des rayons UV sur les agents infectieux est complexe. Il a néanmoins été clairement établi que l'effet des photons envers les agents infectieux, et sur le monde vivant en général, varie selon la longueur d'onde du rayonnement, c'est-à-dire selon son énergie. Ceci est mis en évidence par de nombreux auteurs à travers les spectres d'action, qui représentent les variations de certains paramètres en fonction de la longueur d'onde [139]. Il est bien connu que les rayons UV-C possèdent un effet germicide très puissant, capable d'inactiver un large spectre de agents infectieux [138]. Les rayons UV-C induisent différents types de dommages en agissant directement sur l'ADN et les protéines [136-139]. Ceci est dû au fait que ces deux types de molécules absorbent de façon maximale les longueurs d'ondes correspondant aux UV-C c'est-à-dire 260 nm pour l'ADN et 280 nm pour les protéines. Les UV-C sont utilisés pour leur pouvoir microbiocide. L'action inactivante est due à la perturbation apportée par le rayonnement ultraviolet dans la structure chimique des constituants de la particule vivante et de leur fonctionnement. Les agents infectieux sont vulnérables à l'irradiation à cause de la résonance entre la longueur d'ondes des UV-C et leurs structures moléculaires. La cible de ces rayons est

l'acide désoxyribonucléique (ADN) et, dans une moindre mesure, l'acide ribonucléique (ARN). Ainsi, il est légitime de penser à la génération des photons UV lors de l'interaction simultanée de la lumière visible et les matériaux transparents (cuvettes vide et avec BPS) via les phénomènes optiques non linéaires. La conséquence est que les photons UV peuvent être impliqués dans l'activité microbienne. Nous pensons que les impulsions laser femtosecondes à 400 nm peuvent entraîner l'inactivation des bactériophages M13 par plus de mécanismes d'inactivation:

$$\log \text{ de réduction} = \sum \text{ inactivation par les photons ultraviolets} + \sum \text{ inactivation par le laser femtoseconde}$$

Cependant, cette possibilité peut être écartée. Parce que, si le laser femtoseconde d'excitation à 400 nm avec une durée d'impulsion de 40 fs et une densité de puissance de 17 GW.cm⁻² inactive les bactériophages M13 par les photons ultraviolets générés par des processus non-linéaires, alors pour une durée d'impulsion plus longue (1000 fs par exemple) et même densité de puissance (17 GW cm⁻²) il aurait produit plus des photons ultraviolets et ainsi plus d'inactivation des bactériophages M13. Ceci est en contradiction avec les résultats expérimentaux (figure 5.4). Ainsi, dans nos conditions expérimentales (20 mJ, 40 fs et 400 nm), même si nous avons de bonnes raisons de croire que le procédé d'inactivation par le traitement laser femtoseconde est presque exclusivement indépendant de la génération des photons UV-C par le processus non-linéaire, il vaut mieux s'en assurer en effectuant d'autres expériences avec une autre cuvette que le BK7. L'échantillon est placé dans une cuvette en quartz de 1 cm × 1 cm sur la trajectoire du faisceau laser. Nos données expérimentales indiquent que la réduction de charge, en échelle log₁₀, est de l'ordre de 2.63 ± 0.24 après 2 minutes de traitement laser lorsque l'échantillon M13 contenu dans une cuvette en quartz est irradié par des impulsions à la fois ultra-courtes et intenses à 400 nm. Cependant, avec la cuvette de BK7, on trouve 2.73 ± 0.18 en échelle log₁₀ à la même condition expérimentale et à la même durée de traitement. Nos résultats expérimentaux montrent aussi que la génération d'UV-C qui peut être induite par un processus d'interaction non linéaire entre des impulsions femtoseconde et les matériaux irradiés (cuvette contenant PBS) est peu probable. Plus précisément, nous n'avons pas pu détecter la présence d'UV-C et mesurer l'énergie UV-C qui peut-être générée par des processus non-linéaires. Par conséquent, l'inactivation observée pour M13 ne peut pas être due à des photons générés par UVC via le procédé non linéaire.

5.1.5 Effet de la densité énergétique

Outre les paramètres précédents (le temps d'exposition et la durée d'impulsion), nous avons étudié l'effet de la densité énergétique afin de mieux comprendre le processus d'inactivation par le laser femtoseconde via le processus l'ISRS. À cette fin, on compare l'inactivation virale des bactériophages M13 ayant été soumis au traitement laser femtoseconde en fonction des densités d'énergie d'irradiation variables et cela pour différentes longueurs d'ondes centrales. Les densités d'énergie de traitement laser utilisées dans cette recherche sont comprises entre 0.515 mJ cm^{-2} et 25.5 mJ cm^{-2} . L'influence de l'irradiation laser femtoseconde sur l'inactivation de M13 est illustrée à la figure 5.5. Les expériences sont réalisées avec un nombre initial de bactériophage de 8.51×10^7 UFP/mL de solution microbienne. Les conditions opératoires pour chaque longueur d'onde sont les suivantes:

- ✓ 800 nm, 8 minutes de traitement, 40 fs, 0.4 mJ - 20 mJ;
- ✓ 400 nm, 2 minutes de traitement, 40 fs, 0.4 mJ - 20 mJ;
- ✓ 800 + 400 nm, 2 minutes de traitement, 40 fs, 0.4 mJ - 20 mJ.

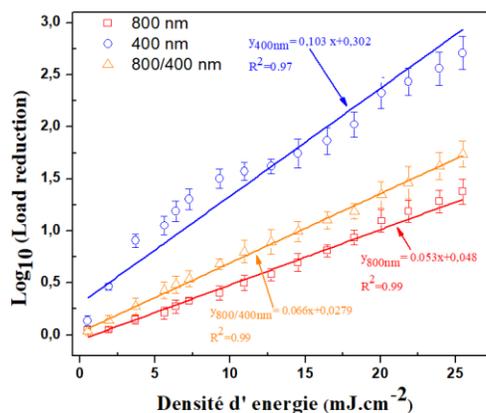


Figure 5.5 Réduction logarithmique de bactériophages M13 après le traitement laser femtoseconde selon les densités d'énergie et les longueurs d'onde d'excitation. Toutes les données ($n = 3$) sont exprimées sous forme de moyenne \pm écart type. La durée d'exposition était de 2 minutes pour 400 nm et 800/400 nm et de 8 minutes pour 800 nm.

La première observation est une relation dose-dépendante a d'abord été constatée entre l'inactivation et la densité l'énergie, évaluée par le test de régression linéaire, l'inactivation du virus augmente avec l'augmentation de la densité énergétique. Si la densité d'énergie laser est trop faible ($\leq 1.84 \text{ mJ cm}^{-2}$), il n'y a aucun effet sur les agents infectieux et aucune inactivation n'est observée (figure 5.5). Lorsque la densité d'énergie augmente ($> 6.37 \text{ mJ cm}^{-2}$), une inactivation est observée. Par exemple, à 400 nm avec une dose de traitement de 0.5 mJ cm^{-2} ,

le taux d'inactivation est négligeable, alors qu'une dose de traitement de 7.2 mJ cm^{-2} , le taux d'inactivation peut atteindre $1.3 \pm 0.1 \log_{10}$ pour une durée de traitement de 2 min. Les niveaux les plus élevés d'inactivation ont été enregistrés, avec une réduction d'environ $5.8 \pm 0.3 \log_{10}$ du nombre de UFP observée après une exposition au traitement laser à 400 nm avec un éclairement énergétique de 25.5 mJ cm^{-2} pendant 15 min. En générale, l'efficacité de l'inactivation augmente avec la valeur de la densité d'énergie.

La deuxième observation porte sur la cinétique d'inactivation de bactériophage M13. Sur la base du modèle de croissance linéaire, le facteur de susceptibilité d'agent infectieux, la valeur k (la constante de vitesse d'inactivation), variait considérablement (figure 5.5). La constante de vitesse d'inactivation la plus élevée ($0.10 \pm 0.017 \text{ cm}^2.\text{mJ}^{-1}$) observée à 400 nm après 2 min du temps d'exposition suggère une sensibilité plus élevée de M13 au traitement laser à la lumière visible, tandis qu'à 800 nm avec une valeur plus faible de k ($0.05 \pm 0.005 \text{ cm}^2.\text{mJ}^{-1}$) pendant 8 min de traitement laser, reflète une population microbienne plus résistante au traitement laser (tableau 5.4). Ces résultats montrent que la densité d'énergie et la longueur d'onde sont des facteurs importants pour l'inactivation du virus M13.

Le taux le plus élevé d'inactivation est enregistré avec une réduction, en échelle \log_{10} , d'environ 2.93 ± 0.15 du nombre de UFP observée suite à une exposition de 2 min à 400 nm avec une densité énergétique de 25.5 mJ.cm^{-2} alors qu'à 800 nm et pour la même dose, on a mesuré une réduction de 1.51 ± 0.07 après 8 min d'exposition. Une réduction logarithmique de 2 unités du M13 soumis au traitement laser à 400 nm peut être obtenue pour des densités l'énergie de l'ordre de 18.27 mJ cm^{-2} pendant 2 min du traitement alors que le même effet nécessitait des densités l'énergie de l'ordre de 25.5 mJ cm^{-2} après 20 min d'exposition à 800 nm. De plus, on a constaté que deux longueurs d'onde combinées, visible et infrarouge, contribuent aussi à l'effet létal sur les agents infectieux. Les résultats obtenus ont montré que différentes longueurs d'onde entraînaient une réduction virale statistiquement significative de M13. Les niveaux d'éradication ont augmenté avec l'augmentation de la dose de lumière, bien que de manière linéaire.

Nos résultats montrent que certaines longueurs d'ondes (400 nm par exemple) ont une efficacité décontaminante plus élevée que d'autres. La capacité d'inactivation à chaque longueur d'onde peut être quantifiée par l'efficacité germicide « η », définie comme la réduction \log_{10} d'une population de bactériophages inactive par unité d'énergie irradiée en mJ par centimètre carré [140-143]:

$$\eta = \frac{\log_{10}\left(\frac{N}{N_0}\right)}{E_{dens}} \quad (5.5)$$

où E_{dens} est la densité d'énergie du laser irradiant (mJ cm^{-2}). Les données numériques relatives aux rendements germicides obtenus avec une exposition à la lumière à 800 nm, 400 nm et les deux longueurs d'onde combinées sont énumérées dans le tableau 5.4.

Tableau 5. 4 La réduction virale et l'efficacité germicide (η) pour l'inactivation des bactériophages M13 soumis à un traitement laser femtoseconde et cela pour différentes longueurs d'onde. La densité d'énergie est de 25.5 mJ cm^{-2} .

longueurs d'onde (nm)	Durée de traitement (min)	\log_{10} réduction	$\eta = \log_{10}(N/N_0)/E_{\text{dens}} (\text{mJ}^{-1} \cdot \text{cm}^2)$
800	8	1.3 ± 0.1	0.051 ± 0.004
800	15	1.9 ± 0.2	0.079 ± 0.008
400	2	2.9 ± 0.15	0.118 ± 0.006
400	15	5.8 ± 0.3	0.228 ± 0.011
800/400	2	1.73 ± 0.12	0.068 ± 0.005
800/400	15	3.9 ± 0.2	0.153 ± 0.009

En général, des énergies d'impulsion laser plus élevées et des longueurs d'onde plus courtes entraînaient une réduction logarithmique plus importante. À la même dose, le niveau d'inactivation et l'efficacité germicide les plus élevés sont observés avec la lumière bleue à 400 nm. Le pic d'efficacité germicide de $0.228 (\log_{10} \text{ mJ}^{-1} \text{ cm}^2)$ est atteint durant 15 minutes de traitement laser avec une longueur d'onde à 400 nm. Cependant, le temps d'exposition de 2 min a également démontré une bonne activité germicide pour les bactériophages M13, avec une valeur de $0.118 (\log_{10} \text{ mJ}^{-1} \text{ cm}^2)$. L'efficacité germicide de la lumière à une longueur d'onde de 800 nm est beaucoup plus faible que celle de 400 nm. Nos résultats actuels mettent en évidence les différents avantages de la lumière visible à 400 nm par rapport à la longueur d'onde fondamentale du laser Ti-Saphire femtoseconde. Toutefois, pour certaines applications, cet inconvénient peut être plus que compensé par la sécurité accrue offerte à 800 nm, où l'absorption de l'hémoglobine est minimale et les effets dommageables potentiels pouvant être minimisés. En conclusion, l'efficacité du traitement dépend de l'énergie reçue par l'échantillon, elle-même dépendante du temps de traitement et de la longueur d'onde d'excitation.

Une excitation vibratoire trop importante peut être entraînée par une excitation des modes propres de la structure pathogène. La source laser femtoseconde génère des vibrations sur un mode propre de vibration de la structure, l'amplitude de la vibration de la structure est alors très supérieure à l'amplitude de l'excitation et peut donc en provoquer le dégât par fatigue. En supposant qu'il s'agisse d'un processus ISRS, l'énergie d'irradiation laser déposée sur la capsid virale des bactériophages M13 est proportionnelle au carré de l'intensité du laser et

inverse de la durée d'impulsion laser. Pour une durée d'impulsion constante (40 fs), si la densité d'énergie laser déposée sur la capsidie protéique ou de l'amplitude du mode de vibration de la capsidie d'une particule virale est assez grande, elle peut briser les faibles liaisons (les liaisons hydrogènes ou des contacts hydrophobes) entre les protéines provoquant des dommages à la capsidie du virus et ainsi l'inactivation virale (figure 5.5). La capsidie d'un virus est une partie intégrante du processus d'infection virale. Tout dommage ou alternance à sa structure telle que la rupture de certaines liaisons hydrogènes ou des contacts hydrophobes peut affecter de manière significative sa capacité d'infection. Une augmentation isolée de l'énergie de vibration augmente l'amplitude des oscillations, ce qui pourrait rendre la molécule plus fragile et par suite plus apte à réagir. À des énergies plus élevées (20 mJ), l'impulsion laser femtoseconde utilisée pour l'inactivation du bactériophage M13 manque de sélectivité comme l'indiquent les dommages causés à la fois à la capsidie virale et à l'ADN génomique viral (figures 5.1 et 5.3). Lorsqu'une macromolécule (comme le virus par exemple) est excitée avec des énergies élevées de manière non sélective, les différents modes de vibrations des liaisons "communiquent" les uns avec les autres, de sorte que l'énergie est répartie statistiquement entre eux. Si la macromolécule reçoit une énergie relativement faible, les liaisons vibrent de manière harmonique (comme un oscillateur harmonique ou un mouvement pendulaire régulier). À mesure que l'énergie augmente, les vibrations deviennent anharmoniques ou irrégulières [14, 144-146]. Le mouvement dans les limites basses et haute énergie peut être visualisé en termes de surface d'énergie potentielle - énergie versus déplacement vibratoire [145-146]. Plus on ajoute d'énergie, plus les liens s'étirent dans les deux sens; plus l'étirement est large et plus la possibilité de mouvement irrégulier ou d'anharmonie est grande. En raison de l'anharmonie, les vibrations des molécules polyatomiques proches peuvent se coupler (communiquer leur énergie). Cela se produit particulièrement aux hautes énergies, où il existe de nombreux états vibratoires ou des combinaisons de nombreuses vibrations. À ces très hautes énergies, les niveaux vibratoires sont si proches en énergie qu'ils forment ce qu'on appelle un quasi-continuum de niveaux. Le quasi-continuum, qui représente une densité de niveaux de vibration ou d'états d'énergie, est si rapproché qu'il est pratiquement impossible de le distinguer et qu'il peut ou non nous aider à atteindre la sélectivité. La sélectivité dépendra de la rapidité avec laquelle l'énergie déposée dans une liaison s'étalera ou sera aléatoire pour toutes les autres liaisons.

Nous aimerions également souligner que la densité de puissance utilisée dans ce travail (0.6 TW cm^{-2}) est encore bien inférieure à la densité de puissance théoriquement prédite requise pour inactiver les bactériophages M13 via ISRS [95, 129]. Cela montre qu'une densité de

puissance extrêmement élevée n'est pas nécessairement requise pour l'inactivation des virus par le laser femtoseconde. Plusieurs autres effets pourraient rendre l'inactivation du laser femtoseconde si efficace. Par exemple, Tsen et al. ont démontré que l'effet Raman de résonance peut réduire considérablement la densité de puissance laser requise pour l'inactivation des virus via le mécanisme ISRS [13]. En effet, l'équation (3.8) indique que la quantité d'énergie déposée sur le bactériophage M13 est proportionnelle à la section efficace de diffusion Raman du laser incident.

En conséquence, un éventuel effet Raman de résonance modifiera radicalement la section efficace de diffusion Raman et par conséquent l'amélioration de l'amplitude de vibration Q_0 , ce qui entraînera une inactivation accrue du bactériophage M13 par le procédé ISRS. Cet effet Raman de résonance conduit à une réduction significative le seuil de la densité d'énergie nécessaire pour inactiver les agents pathogènes.

5.1.6 Effet de la longueur d'onde d'excitation

Il est possible, au moyen de longueurs d'onde choisies, d'affecter différentes parties de certaines molécules. L'activité de différents matériaux biologiques peut également être affectée par une exposition à certaines longueurs d'onde sélectionnées dans des matériaux biologiques. Bien entendu, la réaction finale à l'irradiation continue du matériel biologique doit toujours être la même, c'est-à-dire l'inactivation ou la destruction des agents infectieux. Les effets de l'interaction du rayonnement à différentes longueurs d'onde d'excitation avec les bactériophages M13 ont donc été étudiés. Nous trouvons que l'efficacité de l'inactivation des agents infectieux par le laser femtoseconde dépend de la longueur d'onde d'excitation. L'inactivation des bactériophages M13 par la lumière proche infrarouge est un processus beaucoup moins efficace que l'inactivation par la lumière visible (figures 5.1- 5.5). Par exemple, après 5 minutes de traitement laser, nous observons une réduction de charge, en échelle \log_{10} , de 0.99 ± 0.11 pour le laser à 800 nm, de 4.72 ± 0.17 pour le laser à 400 nm et de 2.3 ± 0.1 pour les deux longueurs d'onde. Le mécanisme d'inactivation du virus induit par laser femtoseconde est fortement dépendant de la longueur d'onde. La dépendance en longueur d'onde de l'inactivation du virus est également démontrée dans des études antérieures [13, 50, 147-151]. Il existe plusieurs études sur l'effet létal de la lumière visible; la plupart d'entre elles affirment que la longueur d'onde dans le domaine visible entre 400-500 nm est responsable de l'inactivation de divers agents pathogènes. Par exemple, Lu et al. [147] ont observé que l'irradiation laser femtoseconde à une longueur d'onde de 425 nm peut inactiver efficacement les bactéries *E. coli*. Ils ont suggéré que l'agrégation de protéines dépendant de la densité induite par

l'irradiation laser ultracourte dans le domaine visible inactive les bactéries *E. coli*. D'autres études ont démontré que le virus Staphylococcus aureus peut être inactivé par l'intermédiaire d'un processus photodynamique en utilisant une lumière visible de 400 à 420 nm, avec une inactivation maximale de la lumière visible à 405 nm [147-152]. En outre, certains auteurs prétendent que les bactéries sont inactivées avec une lumière rouge et proche infrarouge. Par exemple, Nussbaum et al. [38] ont rapporté un effet bactéricide à 630 nm pour *Pseudomonas aeruginosa* et *E. coli*. Ils ont constaté que même une diode laser de haute puissance à 780 nm (100 mW cm^{-2}) ne détruisait pas *Staphylococcus Aureus* [149, 150]. Guffey et al. ont trouvé que la combinaison de lumière bleue et rouge est efficace contre *Staphylococcus aureus* et *Pseudomonas aeruginosa* [150]. Des études récentes [13, 44-58] soulignent que les impulsions laser ultracourtes, émettant directement dans le domaine visible ou proche infrarouge inactivent les agents pathogènes de manière sélective via le processus ISRS [13, 44-58], générant des vibrations moléculaires qui conduisent à un fort état d'endommagement de l'intégrité structurelle des particules virales et potentiellement l'inactivation des virus. L'analyse théorique révèle que pour que l'ISRS soit efficace: i) des intensités laser élevées sont nécessaires [129]. Dans ces conditions, il existe d'autres mécanismes pour initier les transformations structurales et chimiques, notamment l'absorption multiphotonique; ii) pour qu'une excitation significative se produise, la durée d'impulsion doit être courte par rapport à la période du mode vibrationnel. Dans le domaine fréquentiel, cela signifie que le spectre des impulsions contient à la fois les fréquences de pompe et de Stokes nécessaires à la diffusion Raman [13, 95, 129].

À des énergies plus élevées (20 mJ), l'impulsion laser femtoseconde utilisée pour l'inactivation du bactériophage M13 manque de sélectivité comme l'indiquent les dommages causés à la fois à la capsid virale et à l'ADN génomique viral. Bien que des dommages statistiquement significatifs à l'ADN soient observés, leur ampleur est bien inférieure à l'inactivation virale observée auparavant (figure 5.1) dans ces conditions ($E = 20 \text{ mJ}$, largeur d'impulsion de 40 fs et taux de répétition de 10 Hz). En utilisant ce mécanisme, le laser femtoseconde inactive le bactériophage M13 avec des dommages minimaux de l'ADN. ($4 \pm 2\%$ pour 800 nm et $5 \pm 2\%$ pour 400 nm). Quels sont les effets secondaires de traitement avec le laser femtoseconde, le cas échéant ? Pour répondre à cela, nous devons voir si une absorption se produit avec le traitement au laser femtoseconde. L'énergie photonique du laser femtoseconde qui produit des impulsions extrêmement courtes dans la gamme de longueur d'ondes visibles est d'environ 25000 cm^{-1} ce qui est significativement plus élevé que les énergies vibrationnelles typiques des molécules [144-146]. Selon la loi de conservation de l'énergie, l'absorption directe de ces photons par les états vibrationnels d'une molécule ne peut pas se produire. Contrairement aux

rayons gamma ou aux rayons X, le photon généré par le laser femtoseconde émettant à une longueur d'onde de 400 nm, qui a une énergie relativement faible d'environ 3.10 eV, n'a pas suffisamment d'énergie pour déloger l'électron lié à un atome dans un système biologique.

Absorption des photons dans une gamme de longueur d'onde dans le domaine visible par une particule virale
 E : Différence d'énergie entre l'état électronique fondamental et excité

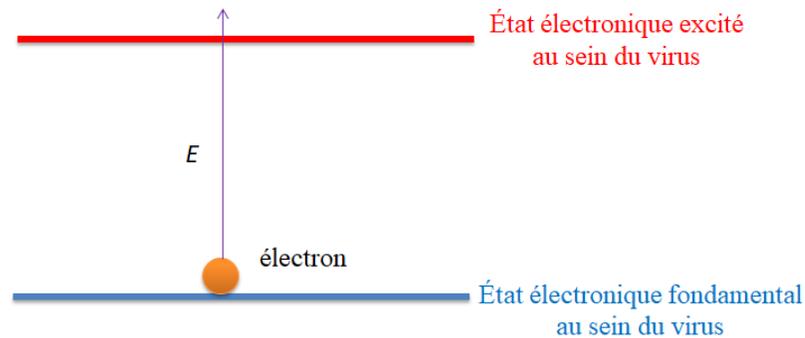


Figure 5.6 Représentation schématique de diagramme énergétique montrant les conditions d'absorption directe d'un photon de lumière visible par un système biologique tel qu'un virus. Pour simplifier, les états vibrationnels ne sont pas représentés.

Pour qu'une absorption directe du photon soit possible, il faut que l'énergie du photon incident E ($E = h\omega_L$, où h est la constante de Planck et ω_L est la fréquence du photon incident) soit égale à la différence d'énergie entre l'état fondamental et ses états excités (figure 5.6). Cependant, il n'y a pas d'absorption de photons lorsque l'énergie des photons E des macromolécules biologiques, est plus grande ou plus petite que E .

Dans le processus d'absorption directe, la molécule passe de son état électronique initial stable à un état excité instable de plus haute énergie. Pour retrouver son état initial plus stable, elle peut libérer cet excès d'énergie sous la forme d'un photon qui sera absorbé par le niveau vibrationnelle. Bien que cette énergie ne soit pas suffisante pour rompre les liaisons covalentes, mais elle peut briser des liaisons beaucoup plus faibles telles que les liaisons hydrogène ou les contacts hydrophobes dont les énergies se situent dans la gamme de 50 meV ou moins [13, 153-155]. Les acides nucléiques et les protéines ont des bandes d'absorption à 260 nm et 280 nm, respectivement; ils n'absorbent pas dans la région de longueur d'onde visible [156-157]. Les photons générés par le laser femtoseconde émettant à une longueur d'onde de 400 nm n'endommageront pas les acides nucléiques ou les protéines par un processus d'absorption directe. Cependant, nous notons que les systèmes biologiques tels que les phages et les bactéries ne sont pas composés simplement d'acides nucléiques et de protéines; en fait, la

composition de ces entités biologiques varie grandement et peut être très complexe [158]. Il est impossible d'exclure la possibilité qu'il y ait quelques molécules dans certains matériaux biologiques qui absorbent les photons de lumière visible. Il est intéressant de noter que la présence de molécules absorbant la lumière visible à proximité du pathogène ou dans le pathogène lui-même peut réellement augmenter l'énergie déposée au sur la capsidie protéique d'une particule virale induite par l'excitation laser femtoseconde via l'effet de diffusion Raman par résonance [13]. Lorsque la molécule est mise en résonance, la vibration possède la caractéristique des oscillateurs et l'effet induit une amplitude de vibration amplifiée dans la capsidie virale. L'effet Raman de résonance apparaît lorsque l'énergie du laser approche de la valeur d'une transition électronique. En effet, l'équation (3.8) indique que l'amplitude de la vibration Q_0 excitée par le laser est proportionnelle à l'amplitude de la section efficace de diffusion Raman, c'est-à-dire l'énergie déposée par le laser, qui est proportionnelle au carré de l'amplitude Q_0 , est proportionnel à la section efficace de diffusion Raman. En conséquence, un éventuel effet Raman de résonance modifiera radicalement la section efficace de diffusion Raman, dans ce cas, la polarisabilité et par conséquent l'amplitude de la vibration augmentent (équation (3.8)). Cet effet Raman de résonance conduit à une réduction significative de la densité de puissance laser nécessaire pour inactiver les agents pathogènes lors du traitement laser via le processus ISRS. Cet effet Raman de résonance induit une amélioration significative de l'amplitude de vibration Q_0 et par conséquent contribuera à une inactivation accrue du bactériophage M13 par le processus ISRS. Dans l'ensemble, l'amplitude de mode de résonance induite par le laser à 400 nm peut être plusieurs fois supérieure à celle excitée par le laser à 800 nm. Cette différence significative dans l'amplitude d'oscillation de résonance pourrait expliquer pourquoi le laser femtoseconde émettant à une longueur d'onde de 800 nm n'est pas capable d'induire des changements de conformation significatifs dans l'ADN et les protéines de la capsidie virale et par conséquent inactiver le bactériophage (figures 5.1- 5.5). Cette observation semble soutenir l'existence d'un tel effet de résonance Raman.

Lorsqu'un système biologique est exposé à deux longueurs d'onde différentes de rayonnement, l'effet observé n'est souvent pas la somme des effets des longueurs d'onde individuelles [152, 159]. Le plus souvent, on observe un effet synergique, c'est-à-dire que l'effet de deux longueurs d'onde de rayonnement données ensemble est supérieur à la somme des deux effets lorsqu'il est administré indépendamment. Parfois, les effets sont antagonistes et souvent, il n'y a aucune interaction. Par conséquent, il est particulièrement important de garder à l'esprit la possibilité d'effets non additifs de différentes longueurs d'onde de lumière lorsque l'on utilise une source de rayonnement polychromatique, ou deux ou plus de deux sources monochromatiques. Dans

cette étude, l'effet des lasers femtosecondes sur les bactériophages M13 est étudié avec des impulsions laser à deux couleurs, c'est-à-dire la longueur d'onde fondamentale de $\lambda_{\omega} = 800$ nm et ses harmoniques secondaires de longueur d'onde centrale de $\lambda_{2\omega} = 400$ nm. Les impulsions bicolores sont irradiées sur l'échantillon avec un délai. Le retard de la phase relative entre le faisceau fondamental (ω) et le second harmonique (2ω) est ajusté à l'environ de $l_d = 27$ μ m. En raison de ce temps de déphasage, l'impulsion de sonde n'amplifiera pas efficacement l'amplitude de la vibration induite par l'impulsion de pompe, mais l'amplitude de la vibration serait simplement la somme des effets des deux longueurs d'onde.

5.1.7 Effet de dérive de fréquence (chirp) sur l'inactivation

Les caractéristiques des impulsions sont fixées par l'oscillateur, e.g Ti-Saphir, mais les applications de telles sources peuvent nécessiter les modifications de paramètres tels que la durée, la puissance de crête ou encore chirp. La technique employée pour créer un faisceau chirpé (de l'anglais chirp qui signifie gazouiller) est de modifier la distance entre les réseaux du compresseur. Ces réseaux de diffraction vont introduire une différence de chemin entre les différentes composantes spectrales de l'impulsion. Certaines « couleurs » parcourront donc plus de distance que d'autres dans le dispositif d'étirement de l'impulsion. La calibration du compresseur a été effectuée à l'aide d'un autocorrélateur pas à pas. On note que la durée minimale d'une impulsion correspond toujours à l'endroit où elle est non chirpée. La position $d = 0$ correspond à la durée minimum de l'impulsion sans chirp. Le système laser à 10 Hz délivre une impulsion de durée nominale 40 fs, et son étirement dans le temps est géré par l'introduction d'une dérive de fréquence contrôlée en dérégulant le compresseur en fin de chaîne laser par rapport à sa position optimale. Lorsque l'on modifie la distance entre les deux réseaux du compresseur, la durée de l'impulsion est allongée en introduisant un chirp en raison de les effets dispersifs et par la même occasion l'intensité laser est diminuée. L'impulsion gardera le même spectre mais sera plus longue. On parlera alors d'introduction d'un « chirp » dans l'impulsion, c'est-à-dire, la phase de l'impulsion sera une fonction du temps, quadratique idéalement. L'augmentation la distance entre les deux réseaux du compresseur a abouti à des impulsions positivement chirpées, et la réduction de la distance entre les réseaux a fourni des impulsions chirpées négativement. Une impulsion chirpée positivement verra donc les composantes rouges arriver avant les bleues et inversement pour une impulsion chirpée négativement. Pour toutes les expériences présentées avant, la dérive de fréquence introduite est positive. Nous avons décidé d'étudier l'effet d'impulsion laser chirpée sur l'inactivation induite par le laser femtoseconde. Nous avons effectué des expériences d'inactivation des

bactériophages M13 suspendus dans le PBS en fonction de la valeur du «chirp» et ce pour différentes longueurs d'onde d'excitation. Des impulsions chirpées positivement et négativement de 100 fs sont utilisées. Dans cette expérience, nous avons maintenu la densité de puissance du laser fixée à 17 GW cm^{-2} et le temps d'exposition à l'irradiation à 8 min pour le laser à 800 nm, 2 min pour le laser à 400 nm et 2 min pour les deux longueurs d'onde combinées. Une concentration de 8.51×10^7 UFP/mL de M13 a été utilisée dans ces expériences. Toutes les expériences sont effectuées en triple. Les erreurs ont été exprimées en écarts-types (SD). La figure 5.7 représente la réduction de charge (échelle \log_{10}) des bactériophages M13 ayant été soumis au traitement laser, en fonction de l'impulsions chirpée positivement et négativement et ce pour les différentes longueurs d'onde d'excitation.

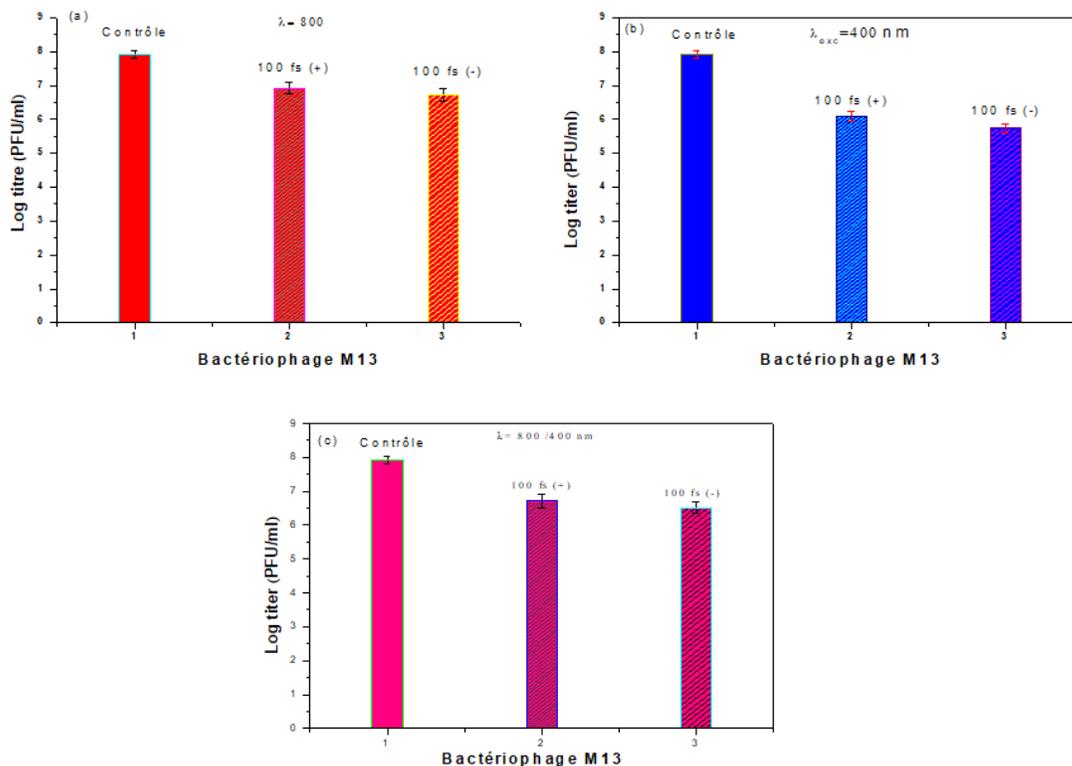


Figure 5. 7 Quantification le taux d'inactivation virale de bactériophage M 13 en fonction de la dérive de fréquence (chirp) pour différentes longueurs d'ondes. Toutes les données (n = 3) sont exprimées sous forme de moyenne \pm écart type.

On remarque qu'un changement dans les paramètres de chirp va sérieusement affecter l'efficacité d'inactivation. Le taux d'inactivation des agents infectieux atteint augmente avec les impulsions chirpées négativement mais avec différents taux selon la longueur d'onde d'excitation. En effet, les impulsions chirpées négativement permettent l'amélioration de

l'inactivation des phages. Par exemple la réduction logarithmique de M13, soumis à un traitement laser à 400 nm ayant une durée d'impulsion chirpées positivement de 100 fs, est de l'ordre de 1.83 ± 0.1 après 2 min de traitement. Par contre, exposés à un traitement ayant à une durée d'impulsion chirpée négativement de 100 fs pour une durée de traitement de 2 min, la réduction logarithmique est de l'ordre de 2.18 ± 0.2 . À 800 nm avec une durée d'impulsion chirpées positivement de 100 fs, le taux d'inactivation est $1 \pm 0.1 \log_{10}$, alors qu'une durée d'impulsion chirpée négativement de 100 fs, le taux d'inactivation peut atteindre $1.14 \pm 0.1 \log_{10}$ pour une durée de traitement de 8 min. En générale ces expériences ont permis de montrer que l'efficacité de l'inactivation progresse en appliquant des impulsions chirpées négativement. Les impulsions chirpées négativement conduisent à l'inactivation plus efficace que les impulsions chirpées positivement.

En raison du contenu spectral large des impulsions femtosecondes, un concept important dans les discussions sur les lasers femtosecondes est le chirp. Une impulsion pulsée est une impulsion dans laquelle les différentes longueurs d'onde ou couleurs ne sont pas réparties uniformément sur l'enveloppe de l'impulsion. Le chirp peut être vu comme une augmentation ou une diminution de la fréquence d'une impulsion lumineuse avec le temps. Lorsque les fréquences plus rouges (basses fréquences) se situent à l'avant de l'impulsion, et les fréquences plus bleues (hautes fréquences) sont à l'arrière, le chirp est alors dit positif. Le chirp négatif est la situation opposée. Une impulsion chirpée négativement induit une diminution de la fréquence de modulation et une durée d'impulsion plus courte. Cette asymétrie explique donc la différence de comportement d'inactivations obtenues selon la longueur d'onde d'excitation, l'inactivation est importante pour les impulsions chirpées négativement de 100 fs que pour les impulsions chirpées positivement positive de 100 fs (figure 5.7). On peut noter que l'efficacité de l'inactivation est meilleure dans le cas des impulsions chirpées négativement, comparée à celle impulsions chirpées positivement (figure. 5.7). En contrôlant le chirp dans une impulsion de sortie, la largeur d'impulsion, la puissance d'impulsion, et donc l'inactivation à partir du laser peuvent être contrôlées. Le chirp peut être utilisé pour personnaliser certaines propriétés d'impulsion afin de maximiser les caractéristiques d'excitation induite par le laser femtoseconde lors de l'inactivation des bactériophages M13.

5.2 Les paramètres cibles

Pour but de mieux comprendre les processus de l'inactivation et de la détérioration des particules virales au cours d'un traitement laser. Nous présentons une étude approfondie sur

l'influence des différents paramètres du traitement au laser femtoseconde sur les différentes fonctions vitales des virus ainsi que sur les mécanismes d'inactivation impliqués. À cette fin, deux bactériophages MS2 et M13 qui présentent des propriétés de surface et biologiques différentes sont exposés à un laser femtoseconde dans le domaine visible et proche infrarouge. Durant ces expériences, on a varié plusieurs paramètres de laser femtoseconde tels que la densité d'énergie, la durée d'impulsion, la longueur d'onde d'excitation et la durée d'exposition de l'échantillon irradié par le laser femtoseconde.

5.2.1 Influence de la durée du traitement

Les résultats concernant l'inactivation d'une sélection d'échantillons bactériophages M13 et MS2, chacun ayant une densité de population initiale de 2.40×10^8 UFP/mL, sont présentés sur la figure 5.8. Les conditions opératoires sont: énergie d'irradiation constante de 20 mJ par impulsion, taux de répétition de 10 Hz, durée d'impulsion (τ_L) de 40 fs et de longueurs d'onde d'excitation λ de 800 nm, 400 nm et des deux longueurs d'onde combinées (les énergies d'impulsion étaient de 13.5 mJ à 800 nm et de 7.5 mJ à 400 nm). Le temps d'exposition maximal que nous ayons utilisé était de 20 min. Toutes les expériences sont effectuées en triple. Les erreurs sont exprimées en écarts-types (SD). La réponse des agents infectieux au laser femtoseconde est calculée en déterminant la concentration en agents infectieux infectieux avant et après le traitement laser et en appliquant l'équation (5.7).

Ces résultats indiquent que la réduction de la charge des bactériophages M13 et MS2 dépend de la durée du traitement. Une augmentation du temps d'exposition semble accroître l'efficacité de l'inactivation des phages. Lorsqu'elles sont exposées à une lumière de 800 nm, les deux bactériophages M13 et MS2 se comportent de manière similaire (Anova, $p= 0.751$). Par exemple, à 800 nm, la réduction logarithmique de M13 s'accroît de manière constante jusqu'à 0.84 ± 0.10 au bout de 4 minutes. Pour les essais effectués avec MS2, la réduction augmente pour atteindre 0.55 ± 0.04 en seulement 4 minutes. Après 20 minutes de traitement laser, on a une réduction logarithmique de 2.45 ± 0.21 pour MS2 et 2.56 ± 0.24 pour M13.

Une inactivation significative des bactériophages M13 et MS2 (figure 5.8) est observée après une exposition à une lumière de 400 nm. Leur taux d'inactivation est très différent l'un de l'autre (Anova, $p= 0.18$), MS2 est fortement inactivé contrairement à M13. Une réduction de $5 \log_{10}$ est obtenue après un traitement laser d'une durée de 4 minutes environ pour MS2 et 2.9 pour M13. Après 20 minutes d'irradiation laser, on observe une réduction de la charge de 6.31 ± 0.24 pour MS2 et 4.95 ± 0.21 pour M13.

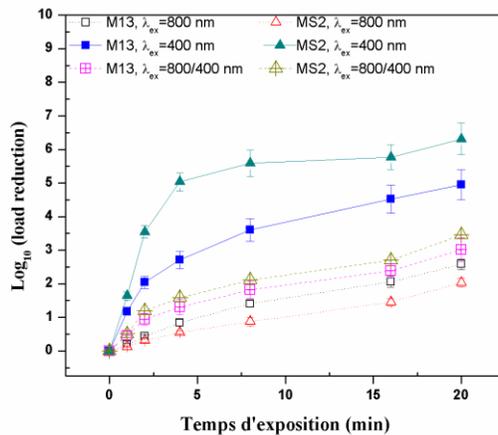


Figure 5.8 Réduction logarithmique du bactériophage M13 et MS2 en fonction du temps d'irradiation pour différentes longueurs d'onde laser. Toutes les données (n = 3) sont exprimées sous forme de moyenne \pm écart type.

En général à 400 nm, pour une réduction de population donnée, les M13 nécessitent des durées d'exposition plus longues que les MS2. A 400 nm, une réduction virale de 5 \log_{10} nécessite une durée de traitement de 4 minutes avec MS2 alors que le même effet nécessite 20 min d'exposition laser pour M13. Pour les deux longueurs d'onde combinées, il n'y avait pas de différence significative dans l'inactivation entre M13 et bactériophage MS2 (Anova, $p=0.70$).

En conclusion, la durée de traitement est un facteur important. Plus le temps d'exposition est long, plus l'élimination des agents infectieux est notable. Cependant, l'effet est plus marqué sur MS2 à 400 nm. L'efficacité de l'inactivation des agents infectieux par le laser femtoseconde est directement liée aux paramètres des agents infectieux (la taille, la forme et la composition du génome viral).

5.2.2 Effets thermiques

Un thermocouple a été utilisé pour mesurer la température de l'échantillon afin de s'assurer que les effets thermiques (chauffage) n'affectent pas le processus d'inactivation. Toutes les expériences ont été effectuées à 25 °C et la température des échantillons dans la cuvette est mesurée juste avant et après chaque expérience. On a constaté que l'augmentation de la température des échantillons ne dépasse pas 4 °C (température maximale est de 29 °C) dans le cas des bactériophages M13 et est inférieure à 6 °C (température maximum de 31 °C) pour MS2, après 20 min d'irradiation au laser dans les deux cas. Par conséquent, les virus ne sont inactivés pas à cause des effets thermiques appelées "macro thermiques" puisque ces virus survivent normalement dans la flore intestinale à 37 °C. Cependant, on note qu'il est possible

que le traitement laser pourrait créer des effets «micro-thermiques» où l'énergie du laser peut être absorbée par la particule virale elle-même et la propager dans tout le volume du virus provoquant ainsi le chauffage de la particule virale et par conséquent l'inactivation des bactériophages. Dans ce scénario de micro-thermique, on s'attendrait à ce que pour une densité de puissance de laser donnée, les virus avec des tailles différentes seraient chauffés à des températures différentes.

On considère un modèle de calcul simple dans lequel la capsid virale est supposée absorber complètement les photons incidents et la thermalisation de l'énergie au sein de la particule virale est nettement plus rapide que celle entre la particule virale et ses environs. L'énergie totale déposée devrait être proportionnelle à la superficie de section efficace du virus.

$$E = I * S = m * c * \Delta T = \rho * V * c * \Delta T \quad (5.6)$$

où S est la section efficace du virus, I est l'intensité du laser, m est la masse de virus, c est la chaleur spécifique du virus, ρ est la densité du virus, V est le volume du virus et ΔT est l'augmentation de la température du virus.

Cette énergie totale déposée sur la capsid virale est diffusée sur tout le volume de virus provoquant l'augmentation de la température du virus. Pour une intensité laser donnée I , si ρ , c sont supposés constant, pour $S \propto r^2$ et $V \propto r^3$, nous avons: $\Delta T \propto \frac{1}{r}$, où r est le rayon de virus. Par conséquent, pour une intensité laser donnée I , l'augmentation de température prévue (ΔT) serait inférieure à un virus de diamètre plus grand (MS2, ~ 27 nm) que pour un virus de petit diamètre (M13, ~ 7 nm). Cela contredit nos résultats expérimentaux, puisque la température a augmenté d'environ de 4 °C pour les petits virus (M13) alors qu'aux mêmes conditions expérimentales, la température augmentera de 6 °C pour MS2.

5.2.3 Modélisation cinétique de l'inactivation des phages M13 et MS2

Depuis de nombreuses années, beaucoup de travaux sont conduits sur l'inactivation des agents infectieux par le procédé thermique. C'est seulement depuis quelques années que les cinétiques d'inactivation sont étudiées et que des avancées remarquables sont faites dans la modélisation de ces cinétiques. L'application de nouvelles technologies d'inactivation des phages telles que les traitements par le laser femtoseconde requiert la construction de modèles mathématiques fiables qui décrivent précisément le taux d'inactivation de la population bactérienne et permettent d'anticiper le comportement de ces phages vis-à-vis de la technologie. Ce modèle doit permettre d'établir les conditions de traitement nécessaires pour atteindre des

niveaux d'inactivation microbienne souhaités et permettre ainsi la production des produits stables et sains [121-123]. Les modèles doivent être simples et basés sur l'inactivation des agents infectieux modèles en fonction des paramètres de traitement tels que la durée d'exposition et la densité d'énergie. La modélisation se fait en deux étapes. La première étape consiste à modéliser la cinétique d'inactivation c'est-à-dire à modéliser les paramètres du modèle primaire, comme par exemple le taux d'inactivation k_{max} , qui décrit la sensibilité d'un virus à l'inactivation par des décontaminants [123-124]. Une fois ces paramètres modélisés, l'étape suivante consiste à modéliser la variation de ces paramètres en fonction de différents facteurs intrinsèques et extrinsèques grâce à des modèles secondaires. Les paramètres et les modèles des cinétiques sont employés pour le développement des processus d'inactivation et pour assurer leur innocuité. Ils fournissent également les outils pour comparer l'impact de différentes technologies de transformation sur la réduction de populations microbiennes. Il est donc indispensable de connaître le type de comportement cinétique qui décrit le mieux l'inactivation par le laser femtoseconde afin d'établir un modèle fiable et de quantifier cette inactivation. Les paramètres décrits plus bas, permettent d'évaluer la résistance des agents infectieux au traitement.

Geeraerd et al. [123] ont proposé un logiciel, GInaFiT, de neuf différents modèles de survie microbienne. La spécificité de ce logiciel est qu'il permet à l'utilisateur de partir des données expérimentales et après modélisation, d'obtenir des paramètres pouvant lui permettre de les interpréter aisément avec les critères d'ajustement correspondants. L'évolution de la population microbienne en fonction du temps avec cet outil se définit à travers trois principaux modèles de log-linéaire, Weibull et biphasique. Ces modèles ont été principalement conçus et appliqués pour les courbes de destruction des agents infectieux.

5.2.3.1 Modélisation des courbes de survie: Modélisation log-Linéaire

Lors du traitement laser, la charge microbienne diminue progressivement au cours du temps. Classiquement, les modèles les plus utilisés sont conçus sur la base de l'hypothèse d'une cinétique de premier ordre. L'évolution du taux de survie en fonction du temps est décrite selon l'équation (5.2). On remarque que, selon la figure 5.8, l'inactivation par le traitement laser femtoseconde est différente selon le type des agents infectieux et la longueur d'onde d'excitation et que par conséquent la cinétique d'inactivation est différente d'un agent infectieux à un autre et d'une longueur d'onde à une autre. Les résultats de la détermination du taux d'inactivation des phages M13 et MS2 à la décontamination par le traitement laser femtoseconde sont présentés sur le tableau 5.5. De manière générale, le tableau 5.5 montre

que les valeurs k_{\max} augmentent avec une diminution de la longueur d'onde d'excitation. Ces résultats montrent que l'inactivation par la lumière visible de MS2 est plus rapide que celle de M13. Le taux d'inactivation le plus élevé est observé à 400 nm ($0.554 \pm 0.189 \text{ min}^{-1}$) suggère une sensibilité plus élevée de MS2 au traitement laser à 400 nm, tandis que M13 avec la valeur $0.485 \pm 0.090 \text{ min}^{-1}$, reflète une population bactérienne résistante à 400 nm. Cependant à 800 nm, les résultats montrent que la constante d'inactivation de M13 (0.284 ± 0.02) est supérieure à celles de MS2 (0.218 ± 0.001).

Tableau 5.5 Les paramètres de la cinétique d'inactivation des phages M13 et MS2, estimés par les modèles: modèle linéaire et Weibull pour différentes longueurs d'onde d'excitation.

λ (nm)	Virus	Modèle linéaire (équation 5.2)				Modèle de Weibull (équation 5.3)			
		$k_{\max}(\text{min}^{-1})$	$\log_{10}(N(0))$	R^2	MSE	α (min)	β	R^2	MSE
800	M13	0.284±0.021	0.173±0.091	0.969	0.029	5.146±0.825	0.700±0.069	0.990	0.008
	MS2	0.218±0.011	0.075±0.051	0.983	0.010	9.528±1.319	0.878±0.128	0.982	0.009
400	M13	0.485±0.090	1.182±0.404	0.822	0.568	2.653±2.802	0.673±0.311	0.86	0.446
	MS2	0.554±0.189	2.231±0.844	0.559	2.486	0.023±0.052	0.281±0.088	0.884	0.652
800/400	M13	0.301±0.038	0.466±0.171	0.910	0.102	2.572±0.789	0,521±0.065	0.982	0.0203
	MS2	0.338±0.049	0.580±0.220	0.885	0.168	1.739±0.791	0.492±0.078	0.970	0.0435

Cette approche log-linéaire permet de calculer de manière rapide l'inactivation subie par les agents infectieux et simplifie les comparaisons entre processus d'inactivation. Cependant, des déviations de ce modèle log-linéaire telles que des « traînées », « queues », « tailing » ... sont observées à de nombreuses reprises. De nombreux modèles non linéaires sont développés pour décrire un ou plusieurs types de courbes de survie [122-125].

5.2.3.2 Modélisation des courbes de survie: Modélisation non linéaire

Dans le cadre de l'inactivation non thermique, le phénomène de non linéarité des courbes de survie est amplifié, et il est ainsi rare de trouver une courbe de survie log-linéaire. L'intensité de traitement, mais aussi l'adaptation des phages, jouent sur l'allure des courbes de survie [122-128]. La non linéarité des courbes de survie s'explique par la différence de résistance et de capacité d'adaptation au stress entre les particules virales. Elle est liée à la variation génétique entre les agents infectieux, l'hétérogénéité de la transcription et composition de la capsid virale [160-162]. Deux théories s'opposent pour expliquer la non linéarité des courbes de survie: la théorie vitaliste et la théorie mécaniste [163- 168]. Selon les deux théories, l'épaule et la traînée qui peuvent être observés sur les courbes de survie, sont dus à une hétérogénéité de la résistance au traitement.

Selon la théorie vitaliste, la résistance au traitement est un caractère intrinsèque à l'agent infectieux et cette résistance est variable selon les agents infectieux. La non linéarité des courbes de survie est donc un phénomène tout à fait normal, lié par exemple à la plus ou moins grande résistance d'une molécule critique. Par contre, selon la théorie mécaniste, l'hétérogénéité est due à des facteurs extrinsèques à la particule virale. Cerf classe les origines de ces facteurs en trois catégories [164]. Premièrement, la traînée est un phénomène normal lié aux mécanismes provoquant l'inactivation. Par exemple, une molécule critique posséderait trois états (sensible, résistant et inactivé). Et le passage d'un état à l'autre expliquerait les courbes de survie et les concaves. Deuxièmement, la traînée est un phénomène lié aux mécanismes de résistance (modification de la résistance pendant le traitement). Et troisièmement, la traînée est un phénomène indépendant des mécanismes d'inactivation. Elle peut être le fruit de l'hétérogénéité génétique, de l'hétérogénéité du traitement, la présence d'agrégats, des méthodes de dénombrement. La construction des modèles peut s'effectuer selon deux approches. L'approche empirique et l'approche mécaniste. Les modèles empiriques décrivent simplement les données sans prendre en compte les phénomènes provoquant la réponse observée. Les modèles mécanistes sont développés à partir de théories, d'hypothèses et permettent d'expliquer la réponse à modéliser par l'action de phénomènes physiques, biologiques et/ou chimiques.

De nombreux modèles ont été employés pour décrire l'inactivation due à un traitement non thermique. Le plus souvent, il s'agit de modèles antérieurement proposés dans le cadre de traitement thermique et dont les applications sont élargies aux autres traitements. Mais certains modèles sont spécialement développés pour l'inactivation non thermique [168-169]. Tous les modèles sont confrontés et critiqués en fonction des théories ou des hypothèses sur lesquelles ils reposent, mais aussi en fonction de leur parcimonie, de leur performance d'ajustement, de l'interprétation physique, chimique ou biologique de leurs paramètres, de leur capacité à décrire les différentes formes de courbes de survie, de leur capacité à être utilisés sous forme dynamique et donc à décrire le comportement microbien en conditions environnementales variables [145, 156-160]. Dans le cadre de cette étude, le propos n'est donc pas de comparer tous les modèles permettant de décrire une courbe de survie non-linéaire, mais, simplement de proposer deux catégories de modèles: le modèle Weibull et le modèle biphasique afin de comparer l'efficacité de traitements laser entre eux et/ou pour différents virus.

A Modèles basés sur la distribution de Weibull

La distribution de Weibull est l'une des distributions les plus répandues pour décrire la cinétique d'inactivation de plusieurs agents infectieux en raison de sa simplicité et de sa flexibilité [123-128]. Le modèle de Weibull prend en compte les variations biologiques au sein d'une culture microbienne et considère les événements mortels comme des possibilités plutôt que comme des facteurs déterministes. C'est un modèle simple mais flexible pour décrire l'inactivation des bactériophages par un traitement [123-128]. L'évolution de la population durant l'application d'un traitement peut être alors décrite selon l'équation :

$$\log \left(\frac{N_t}{N_0} \right) = \log \left(\frac{N_t}{N_0} \right)_0 - (t/\alpha)^\beta \quad (5.7)$$

où $\left(\frac{N_t}{N_0} \right)_0$ est le facteur de réduction initial, α (min) est appelé le temps de la première réduction décimale (correspondant à l'inverse de paramètre k_{\max} de modèle linéaire); plus α est grand, plus la durée de vie des individus est longue. Le paramètre β sans dimension qui décrit donc la forme de la courbe de survie.

En fonction de la valeur de ces paramètres, le modèle de Weibull permet de décrire différentes allures typiques des courbes de survie. Si β est inférieur à 1, la courbe de survie est concave. Si β est supérieur à 1, la courbe de survie est convexe. Si β est égal à 1, la courbe de survie est log linéaire. La valeur β reflète la forme de la courbe de survie et on suppose que sa valeur est dépendante de l'intensité de traitement et de l'état physiologique de la population microbienne. Bien que le modèle de Weibull soit de nature empirique et que la signification physique des paramètres du modèle soit moins évidente par rapport aux modèles biphasique (décrits ci-dessous), un lien avec les effets physiologiques a été proposé par Van Boekel [128]. Il a été suggéré que $\beta > 1$ indique que les particules virales survivantes à n'importe quel moment de la courbe d'inactivation ont la capacité de s'adapter à la contrainte appliquée, alors que $\beta < 1$ indique que les particules virales restantes sont de plus en plus endommagées. Le tableau 5.5 montre que les valeurs α et β diminuent avec une diminution de la longueur d'onde d'excitation pour les deux phages. Cette constatation est plus claire pour MS2. Les valeurs β sont respectivement de 0.673 ± 0.311 et de 0.281 ± 0.088 pour M13 et MS2 après 20 minutes de traitement laser à 400 nm. Par contre à 800 nm, les valeurs de β sont de 0.700 ± 0.069 et 0.878 ± 0.128 pour M13 et MS2 respectivement.

B- Modèles basés sur l'existence de deux sous-populations

Les courbes d'inactivation non linéaire peuvent également être décrites par un modèle biphasique proposé par Cerf [164], fondé sur l'hypothèse de deux populations, une sensible (inactivation rapide) et une résistante (inactivation lente). Ceci conduit à une courbe avec deux segments distincts de populations en diminution linéaire, le second (plus résistant) avec une pente moins négative. Ce modèle peut être formulé comme suit [123, 164].

$$\log\left(\frac{N_t}{N_0}\right) = \log\left(\frac{N_t}{N_0}\right)_0 + \log[f * \exp(-k_{max1} * t) + (1 - f) * \exp(-k_{max2} * t)] \quad (5.8)$$

où f est la fraction de la population initiale dans une sous-population majeure, $(1 - f)$ est la fraction de la population initiale dans une sous-population mineure (plus résistante à la chaleur). Le paramètre f qui représente donc la proportion de la sous-population la plus sensible est un paramètre d'état qui ne dépend pas des conditions environnementales présentes, mais du passé des particules virales. Il reflète donc l'état physiologique de la population bactérienne globale, avec une population d'autant plus fragile que la valeur de f est élevée. Cette valeur pouvant fréquemment être très proche de 0 ou de 1, elle peut être difficile à estimer et elle est peu discriminante. Cette équation (5.8) décrit très bien les formes log-bi-linéaires, avec une première pente nettement plus élevée que la seconde, mais demeure insuffisante pour des formes plus complexes. La proportion de la population la plus sensible décroît à la vitesse k_{max1} . Le taux de mortalité de la population la plus résistante est noté k_{max2} . Bien que ce modèle décrive l'ensemble des allures des courbes de survie, il est segmenté et donc pas différenciable par rapport au temps.

La courbe de survie biphasique est constituée de deux portions de droite, la seconde partie du phénomène correspondant à une cinétique de destruction plus lente que la première. La première portion linéaire est caractérisée par l'inactivation des organismes les moins résistants. La seconde partie correspond à l'inactivation des organismes plus résistants [123, 155, 156] ou à un changement de phase de la matrice qui modifie le transfert d'énergie et qui rend le traitement moins efficace [123, 164, 165]. L'hétérogénéité de la population microbienne à la résistance au traitement pourrait expliquer en partie ce type de courbe [164-168]. Dans une suspension microbienne, il existe des agents infectieux qui sont moins résistants et d'autres, par des facteurs intrinsèques, plus résistants. En général, même dans une culture pure, on retrouve un mélange de plusieurs sous-populations qui ont des résistances différentes au traitement [165, 170]. La cinétique de survie expérimentale a montré une cinétique bipolaire d'inactivation typique pour les deux phages, avec une réduction rapide et presque linéaire du titre au cours des 4 premières minutes de traitement et une diminution plus lente jusqu'à la fin

du traitement. Cette constatation est plus claire pour la phase 1 (tableau 5.6) que pour la phase 2.

Tableau 5. 6 Les paramètres de la cinétique d'inactivation de phages M13 et MS2, estimés par le modèle biphasique pour différentes longueurs d'onde d'excitation.

λ (nm)	Phages	Modèle non linéaire biphasique (Eq. 5.8)				
		$k_{\max 1}$ (min ⁻¹)	$k_{\max 2}$ (min ⁻¹)	f	R ²	MSE
800	M13	0.676 ± 0.171	0.213 ± 0.028	0.801 ± 0.089	0.994	0.0051
	MS2	0.975 ± 1.503	0.205 ± 0.023	0.328 ± 0.258	0.981	0.010
400	M13	2,524 ± 0.322	0.310 ± 0.029	0.994 ± 0.002	0.992	0.025
	MS2	4.083 ± 0.292	0.157 ± 0.032	1.000 ± 0.00001	0.997	0.031
800/400	M13	1.381 ± 0.339	0.223 ± 0.023	0.898 ± 0.039	0.988	0.013
	MS2	1.642 ± 0.434	0.243 ± 0.032	0.943 ± 0.030	0.982	0.026

Les valeurs $k_{\max 1}$ de la 1^{ère} phase sont toujours supérieures à la valeur $k_{\max 2}$ correspondante de la 2^{ème} phase. Les valeurs de la phase 2 calculées avec un intervalle de temps plus grand sont toujours plus inférieures que celles calculées avec un intervalle de temps plus court. Cette observation est plus visible pour le phage MS2. Par exemple, pour le MS2, une diminution rapide du titre d'infectivité par un taux d'inactivation de $4.083 \pm 0.292 \text{ min}^{-1}$ au cours des 4 premières minutes à 400 nm, suivie d'un taux d'inactivation plus lent de l'ordre de $0.157 \pm 0.032 \text{ min}^{-1}$ dans les 16 dernières minutes. L'inactivation des bactériophages, M13 et MS2, par la lumière visible est un processus beaucoup plus efficace que l'inactivation par la lumière proche infrarouge ou par les deux longueurs d'ondes combinées (800 nm et 400 nm). L'observation de tableau 5.7 confirme bien ces observations émises ci-dessus. Par exemple, pour les essais effectués avec MS2 à 800 nm, $k_{\max 1} (\text{min}^{-1}) = 0.975 \pm 1.503$ soit environ 4.18 fois inférieur au $k_{\max 1} (\text{min}^{-1})$ à 400 nm (4.083 min^{-1}). Les mêmes observations sont faites aux M13 irradiées à 400 nm qui donnent pour $k_{\max 1}$ la valeur de $2.524 \pm 0.322 \text{ min}^{-1}$ soit environ deux à 3.73 fois supérieure à $k_{\max 1}$ à $0.676 \pm 0.17 \text{ min}^{-1}$ à 800 nm.

Nous observons sur la figure 5.8, pour les deux phages, que la courbe résultante se trouve composée de deux segments de droite, de différentes inclinaisons, d'où la qualification biphasique attachée à ce type de courbe de survie [123, 164-168]. En nous référant à la littérature scientifique [123, 164-168], nous constatons que la majorité des auteurs ayant travaillé avec des procédés d'inactivation athermique, s'entendent aujourd'hui pour dire que la première phase d'inactivation est décrite par une équation du premier ordre qui est en grande partie due à l'inactivation par le traitement laser. La seconde phase est cependant sujette à diverses interprétations. Pour certains [164-170], la seconde phase, plus lente, est le résultat de spores enfouies dans un empilement, dans des débris de cadavres cellulaires ou bien dans des

cavités, plus difficiles d'accès pour la lumière visible/proche infrarouge. Pour d'autres, la deuxième phase est un phénomène naturel associé aux mécanismes de premier ordre d'inactivation et de réparation de la spore. D'autres encore, pensent que les individus d'une population bactérienne ne sont pas identiques, présentant chacun une résistance différente aux traitements d'inactivation [123, 164-165].

La résistance de l'agent infectieux inactivé est déterminée par la comparaison du coefficient de partage entre ces deux fractions de la population microbienne f . L'inactivation des bactériophages, M13 et MS2, par la lumière visible est un processus beaucoup plus efficace que l'inactivation par la lumière proche infrarouge ou par les deux longueurs d'ondes combinées (800 nm et 400 nm). A 400 nm, leur proportion de la sous-population la plus sensible (f) est très différente l'un de l'autre, MS2 est fortement inactivé contrairement à M13. Pour les MS2, la proportion de la sous-population plus sensible f la plus élevée est enregistrée, avec une valeur de 1.00. Cependant, l'exposition des M13 à la même condition et à la durée de traitement a entraîné une proportion f de l'ordre de 0.984 ± 0.002 . La valeur f la plus élevée observée pour MS2 suggère une sensibilité plus élevée de MS2 au traitement laser à 400 nm, tandis qu'à 800 nm la valeur la plus faible (0.328 ± 0.258) reflète une population bactérienne plus résistante. Il est important de noter, suivant les tableaux 5.5 et 5.6, que l'inactivation par le traitement laser femtoseconde est différente selon le type de agent infectieux et par conséquent la cinétique d'inactivation sera différente d'un agent infectieux à un autre. Plusieurs hypothèses peuvent être avancées pour expliquer cette différence de la sensibilité des bactériophages, M13 et MS2 vis-à-vis des paramètres d'irradiation. Quatre hypothèses de travail sont émises et testées; i) l'altération de la capsid lors du traitement; ii) l'agrégation des virus; iii) la présence de sous populations de virus résistants; iv) les changements des propriétés virales au cours de l'irradiation.

La résistance varie non seulement entre les espèces microbiennes mais aussi entre les membres d'une même espèce [123,171]. Les différences de comportements d'inactivation des phages MS2 et M13 par le laser femtoseconde résultent de la nature des compositions structurales de la taille de ces deux agents infectieux et de mécanismes d'inactivation. Le phage MS-2, qui est un bactériophage à ARN rond, a un diamètre de 25 nm à 28 nm. Il a une capsid de symétrie cubique et il est supposé être la capsid d'un icosaèdre avec 180 molécules d'une protéine de la capsid virale [111-112]. D'autre part, M13 est un filament à longue tige d'environ 880 nm de long et 6.6 nm de diamètre. La capsid virale est composée de 2700 copies de protéine de la capsid virale majeure, pVIII, et de 5 à 7 copies des protéines de

la capsid virale mineures : pIII, pVI, pIX et pVII, situées à l'une de ses extrémités [103-104]. Les propriétés de capsid peuvent se modifier au cours de l'inactivation virale. La modification de ce milieu engendre un changement au niveau de l'interface des virus qui peut entraîner différents comportements dont le rapprochement particule-particule (agrégation). La diminution des UFP lors du traitement laser est vraisemblablement due à l'inactivation qui peut être liée à une dégradation de la capsid protéique ou également peut être expliquée par l'agrégation de protéines de la capsid virale qui se traduit par une perte du pouvoir infectieux des bactériophages. Le traitement par le laser femtoseconde à une longueur d'onde spécifique entraîne une destruction/dépliement partiel des protéines de la capsid virale en perturbant les liaisons hydrogène et / ou les interactions hydrophobes dans les protéines virales.

C Estimation des paramètres

Pour les modèles (linéaire et non linéaire), les courbes de survie sont ajustées en utilisant la procédure de régression linéaire et non linéaire de Microsoft Excel GinaFit [123] pour déterminer les paramètres des modèles Weibull et biphasique et la procédure de régression du modèle linéaire. La qualité de l'ajustement des modèles a été évaluée en calculant le coefficient de corrélation (R^2) et l'erreur quadratique moyenne (MSE). MSE est défini selon l'équation (5.4). Le tableau 5.7 illustre les résultats des analyses de la qualité de l'ajustement utilisant les valeurs MSE et R^2 produites en confrontant les modèles linéaire, de Weibull et biphasique.

La capacité des modèles biphasique et de Weibull à décrire l'inactivation par le traitement laser femtoseconde a été comparée. En confrontant les valeurs individuelles de tableaux 5.7, on peut conclure que le modèle de Weibull correspond bien aux données de survie à 800 nm et 800/400 nm, mais il est moins précis dans la description de l'effet de traînée à 400 nm par rapport au modèle biphasique qui présente des performances supérieures

Tableau 5.7 Comparaison des modèles log-linéaires, de la distribution de Weibull et biphasiques pour un meilleur ajustement aux courbes de survie de M13 et MS2 à 800, 400 et 800/400 nm.

λ (nm)	Phages	Modèle Linéaire		Modèle Weibull		Modèle Biphasique	
		R^2	MSE	R^2	MSE	R^2	MSE
800	M13	0.969	0.029	0.990	0.008	0.994	0.0051
	MS2	0.983	0.010	0.982	0.009	0.981	0.010
400	M13	0.822	0.568	0.86	0.446	0.994	0.0051
	MS2	0.559	2.486	0.884	0.652	0.981	0.010
800/400	M13	0.910	0.102	0.982	0.0203	0.994	0.0051
	MS2	0.885	0.168	0.970	0.0435	0.981	0.010

Le modèle biphasique correspond bien aux données expérimentales, comme l'indiquent les valeurs systématiquement supérieures de MSE et les valeurs de R^2 les plus faibles. À 400 nm, les valeurs moyennes de R^2 pour les modèles Weibull et biphasique sont: $R^2_{M13} = 0.867$, $R^2_{MS2} = 0.884$ et $R^2_{M13} = 0.994$, $R^2_{MS2} \sim 0.981$, tandis que les valeurs moyennes de MSE sont: $MSE_{M13} = 0.446$, $MSE_{MS2} = 0.652$ et $MSE_{M13} = 0.005$, $MSE_{MS2} \sim 0.010$, respectivement après 20 minutes de traitement (tableau 5.7). Il est important de rappeler que l'inactivation par le traitement laser femtoseconde est différente selon le type de agent infectieux et la longueur d'onde d'excitation et que par conséquent la cinétique d'inactivation sera différente d'un agent infectieux à un autre et d'une longueur d'onde à une autre.

Afin d'évaluer le temps nécessaire pour que chaque longueur d'onde d'excitation atteigne l'élimination souhaitable des phages de M13 et MS2, les données d'inactivation sont ajustées selon les modèles linéaire, Weibull et biphasique (tableau 5.8).

Tableau 5.8 Temps requis pour chaque longueur d'onde d'excitation pour réduire le nombre de agent infectieux de 4 \log_{10} , 3 \log_{10} et 2 \log_{10} et 1 \log_{10} selon des modèles de Weibull et de biphasique.

Longueur d'onde d'excitation (nm)	Phage	Modèle	Le temps requis à la réduction 4 \log_{10} (min)	Le temps requis à la réduction 3 \log_{10} (min)	Le temps requis à la réduction 2 \log_{10} (min)	Le temps requis à la réduction 1 \log_{10} (min)
800	M13	Expe	-	-	15.41	5.22
		Biphasique	36^(a)	25^(a)	14	8
		Weibull	34 ^(a)	24.5 ^(a)	15.75	7.5
	MS2	Expe	-	-	19.71	10.24
		Biphasique	42^(a)	31^(a)	20	9
		Weibull	38 ^(a)	27.75 ^(a)	17.75	8.5
400	M13	Expe	11.96	5.43	1.96	0.76
		Biphasique	13	5.05	2	1
		Weibull	10	5.25	2.25	0.5
	MS2	Expe	2.63	1.84	1.2	0.63
		Biphasique	2.3	1.7	0.6	-
		Weibull	3.25	1.75	0.75	0.15
800/400	M13	Expe	-	19.85	11.02	2.34
		Biphasique	32^(a)	22	11	2.3
		Weibull	28.5 ^(a)	16.65	7.75	2.1
	MS2	Expe	23.5 ^(a)	17	7.872	1.706
		Biphasique	26.5^(a)	14.65	8	1.8
		Weibull	30.5 ^(a)	17.75	8.25	2.15

^(a)Des temps supérieurs à 20 min ont été obtenus en projetant des données cinétiques (calculées par xtrapolation).

Le tableau 5.8 résume le temps nécessaire pour chaque longueur d'onde d'excitation d'atteindre 4 \log_{10} , 3 \log_{10} , 2 \log_{10} et 1 \log_{10} de bactériophages M13 et MS2. Pour MS2, l'étude cinétique a montré une réduction de 4 \log_{10} des particules infectieuses après seulement 2.63

min à 400 nm alors que la même réduction est atteinte après 42 min selon le modèle biphasique (38 min selon le modèle de Weibull) à 800 nm est à 26.5 min selon le modèle biphasique (30.5 min selon le modèle de Weibull) aux deux longueurs d'excitation d'onde combinées (tableau 5.8). Cependant pour M13, une réduction virale de $4 \log_{10}$ nécessite une durée de traitement de 11.96 min à 400 nm, 36 min selon le modèle biphasique (34 min selon le modèle de Weibull) à 800 nm et est à 32 min selon le modèle biphasique (28.5 min selon le modèle de Weibull) avec les deux longueurs d'onde combinées (calculées par extrapolation). Plusieurs d'autres exemples auraient pu illustrer ce lien entre les augmentations de temps d'exposition et l'efficacité du traitement. Nonobstant, d'autres facteurs d'efficacité interviennent comme le type de pathogène.

5.2.4 Effet de durée d'impulsion

D'après l'équation (3.7) on constate que si l'intensité du laser I est maintenue constante, l'amplitude de vibration excitée aura un maximum lorsque la durée d'impulsion « τ_L » est ultracourte. Cela signifie que pour une fréquence de vibration donnée, la durée d'impulsion du laser d'excitation doit être choisie de telle sorte que $\tau_L < \frac{T}{4.44}$. Pour vérifier cette prévision, nous avons comparé les résultats d'expériences sur l'inactivation des bactériophages M13 et MS2 suspendus dans le PBS en fonction de la durée d'impulsion en gardant la densité de puissance et la durée d'exposition constantes et ce pour différentes longueurs d'onde. Nous avons fait varier la durée des impulsions laser τ_L de 40 à 1500 fs, en augmentant l'énergie totale de l'impulsion laser au fur et à mesure que nous augmentons τ_L pour maintenir l'intensité maximale du laser constante ($P_{\text{peak}} = E / \tau_L$, E est l'énergie des impulsions, τ_L la durée des impulsions). Les données expérimentales de cette série sont donc ajustées pour une densité de puissance laser de 17 GW.cm^{-2} et 20 min de temps d'exposition. Une concentration de 2.40×10^8 UFP/mL de M13 et MS2 est utilisée durant ces expériences. Les résultats expérimentaux sont résumés sur la figure 5.9.

Ces résultats indiquent que la réduction logarithmique des bactériophages M13 et MS2 est une fonction exponentielle décroissante de la durée d'impulsion, mais avec différents taux d'inactivation. L'inactivation observée s'avère maximale lorsque la durée d'impulsion est courte et diminue progressivement au fur et à mesure que la durée d'impulsion du laser augmente à une densité d'énergie laser et à une longueur d'onde constante. Lorsque les deux phages sont exposés à une lumière de 800 nm pendant une période de 20 min, les deux bactériophages M13 et MS2 se comportent de manière similaire (Anova, $p = 0.626$)

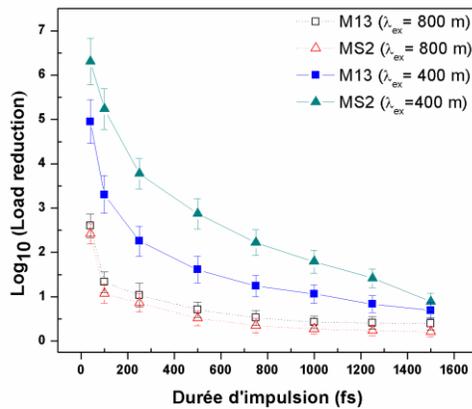


Figure 5.9 Réduction logarithmique de bactériophages M13 et MS2 en fonction de la durée d'impulsion laser d'excitation pour différentes longueurs d'onde. Toutes les données (n = 3) sont exprimées sous forme de moyenne ± écart type.

L'inactivation est très limitée et elle est observée pour une durée d'impulsion laser > 750 fs, tandis qu'une inactivation significative est observée pour une durée d'impulsion laser ≤ 500 fs. Par exemple, à 800 nm, la réduction logarithmique de M13, soumis à un traitement laser ayant une durée d'impulsion de 40 fs, est de l'ordre de 2.59 ± 0.26 . Pour les essais effectués avec MS2 soumises à la même condition, la réduction logarithmique est de l'ordre de 2.42 ± 0.23 . Par contre, soumises à un traitement laser ayant une durée d'impulsion de 750 fs, la réduction logarithmique est de l'ordre de 0.52 ± 0.17 pour M13 et 0.35 ± 0.15 pour MS2. L'inactivation des bactériophages, M13 et MS2, par la lumière visible est un processus beaucoup plus efficace que l'inactivation par la lumière proche infrarouge. A 400 nm durant 20 min, l'exposition des MS2 a un traitement laser ayant une durée d'impulsion de 40 fs diminue de $6.31 \pm 0.52 \log_{10}$ la charge microbienne alors qu'un traitement de même condition, mais à une durée d'impulsion de 1500 fs, la diminue de $0,89 \pm 0.18 \log_{10}$. Pour M13, une réduction logarithmique d'environ 4.95 ± 0.49 est observée suite à une exposition de 20 min à 400 nm de lumière ayant une durée d'impulsion de 40 fs, alors qu'à 1500 fs, la réduction logarithmique est de l'ordre de $0.69 \pm 0,18$. Lorsque l'échantillon est irradié avec deux longueurs d'onde combinées, on observe une réponse intermédiaire (pas présente ici). Dans l'ensemble, la durée d'impulsion d'excitation laser est un facteur important. Plus la durée d'impulsion est courte, plus l'élimination des agents infectieux est notable. Cependant, l'effet est plus marqué sur les deux phages, M13 et MS2 à 400 nm mais avec différents taux d'inactivation (Anova, $p= 0.2297$).

D'après l'équation (3.8), si l'intensité maximale du laser reste constante dans le temps, alors le moyen le plus efficace d'inactiver le pathogène est d'utiliser un laser avec des impulsions très

courtes qui ont une durée d'impulsion d'environ un quart de la période $\tau_L = \frac{T}{4.44}$, ce qui correspond à 1 ps pour le bactériophage M13 et 3.75 ps pour le phage MS2. Cependant, les résultats expérimentaux (figure 5.9) ne sont pas compatibles avec les prédictions de l'équation (3.8): les impulsions plus longues (1 ps pour M13 et 3.75 pour MS2) entraînent une réduction de charge beaucoup plus faible que pour des impulsions ultra brèves (40 fs).

5.2.5 Effet de la densité énergie

Nous avons comparé l'inactivation virale des bactériophages M13 et MS2 ayant été soumis au traitement laser femtoseconde en fonction des densités d'énergie d'irradiation variables et cela pour différentes longueurs d'onde centrales. Les densités d'énergie de traitement laser utilisées dans cette recherche sont comprises entre 0 et 25.5 mJ·cm⁻². Les conditions opératoires sont: cadence de 10 Hz, durée d'impulsion (τ_L) de 40 fs et de longueurs d'onde d'excitation λ de 800 nm et 400 nm. Toutes les expériences sont effectuées en triple. Les erreurs sont exprimées en écarts-types (SD). De manière significative, nous avons maintenu le temps d'exposition maximal de l'échantillon à 20 min. L'influence de l'irradiation laser femtoseconde sur l'inactivation de M13 et MS2 est illustrée à la figure 5.10. La courbe d'inactivation est construite en traçant la réduction logarithmique ($\log(N_t/N_0)$) en fonction de la densité d'énergie (mJ·cm⁻²). L'inactivation est une fonction croissante avec la densité énergétique: l'efficacité de l'inactivation augmente avec la valeur de la densité énergétique d'irradiation pour les deux bactériophages, M13 et MS2, mais avec différents taux d'inactivation.

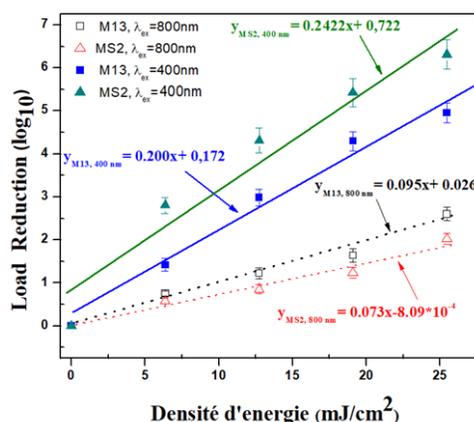


Figure 5.10 Réduction logarithmique de bactériophages M13 et MS2 après le traitement laser femtoseconde selon les densités d'énergie et les longueurs d'onde d'excitation. Toutes les données (n = 3) sont exprimées sous forme de moyenne ± écart type.

À 400 nm, l'exposition des MS2 a un traitement d'une dose 6.36 mJ.cm^{-2} diminue de $2.80 \pm 0.18 \log_{10}$ la charge microbienne alors qu'un traitement de même durée, mais à 25.48 mJ.cm^{-2} , la diminue de $6.31 \pm 0.34 \log_{10}$. Pour M13, une réduction logarithmique d'environ 1.41 ± 0.15 est observée suite à une exposition de 20 min à 400 nm de lumière avec une densité énergétique de 6.36 mJ.cm^{-2} , alors qu'à 25.48 mJ.cm^{-2} , la réduction logarithmique est de l'ordre de 4.95 ± 0.23 . Lorsque les deux phages, M13 et MS2, sont exposés à une lumière de 800 nm durant 20 min, les deux bactériophages se comportent de manière similaire au traitement laser ($p=0.598$).

Afin de comparer l'efficacité de différents traitements d'inactivation entre eux et/ou pour différents virus, le modèle cinétique de premier ordre est fréquemment utilisé. Il permet la détermination de constantes de vitesse d'inactivation de virus en fonction de la dose laser. Le facteur de susceptibilité des agent infectieux, la valeur $K(\text{cm}^2.\text{mJ}^{-1})$, varie considérablement (tableau 5.9). Ces résultats de la constante d'inactivation montrent que l'inactivation par traitement laser à 400 nm de MS2 ($0.25 \pm 0.02 \text{ cm}^2.\text{mJ}^{-1}$) est plus rapide que celle de M13 ($0.20 \pm 0.015 \text{ cm}^2.\text{mJ}^{-1}$). Ces résultats indiquent que MS2 a une sensibilité plus élevée au traitement laser à 400 nm que M13. Les résultats montrent que certaines longueurs d'ondes (400 nm par exemple) ont une efficacité décontaminante plus élevée que d'autres. La capacité d'inactivation à chaque longueur d'onde peut être quantifiée comme l'efficacité germicide « η », définie comme la réduction \log_{10} d'une population de bactériophages inactive par unité d'énergie irradiée en mJ par centimètre carré (équation (5.5)).

Tableau 5. 9 La réduction virale et l'efficacité germicide (η) pour l'inactivation des bactériophages M13 et MS2 soumis à un traitement laser femtoseconde et cela pour différentes longueurs d'onde. La densité d'énergie est de 25.5 mJ cm^{-2} .

Longueur d'onde d'excitation (nm)	Phages	Dose (J.cm^{-2})	K ($\text{cm}^2.\text{mJ}^{-1}$)	\log_{10} réduction	$\eta = \log_{10}(N/N_0)/(\text{mJ}^{-1}.\text{cm}^{-2})$
800	M13	25.478	0.095 ± 0.008	2.599	0.102
	MS2	25.478	0.074 ± 0.007	2.427	0.095
400	M13	25.478	0.200 ± 0.015	4.952	0.194
	MS2	25.478	0.250 ± 0.025	6.313	0.247
800/400	M13	25.478	0.123 ± 0.013	3.478	0.136
	MS2	25.478	0.119 ± 0.010	3.287	0.129

Le tableau 5.9 décrit en détail les paramètres d'inactivation, y compris l'efficacité germicide, pour les deux bactériophages examinés à la suite d'une exposition au traitement laser à différentes longueurs d'ondes pendant 20 min. À la même densité d'énergie de traitement, le niveau d'inactivation le plus élevé et l'efficacité germicide la plus élevée sont observées avec la lumière bleue sur MS2. L'efficacité germicide de la lumière à une longueur d'onde de 800 nm est beaucoup plus faible que celle de 400 nm. M13 et MS2, deux agents infectieux très différents sur le plan biologique montrent des comportements différents lors de traitement laser à 400 nm. Par exemple pour MS2, une dose d'environ 13.89 mJ.cm^{-2} est suffisante pour une réduction de $4 \log_{10}$, après 20 min d'exposition, M13 nécessite une dose d'environ 19.31 mJ.cm^{-2} pour le même effet et la durée de traitement. En général, L'efficacité des traitements par le laser femtoseconde peut varier d'une espèce à l'autre et les longueurs d'onde plus grandes contribuent également peu à l'inactivation.

L'efficacité de traitement laser femtoseconde dépend de la sensibilité d'agent infectieux ciblé. M13 et MS2 ont montré des agissements d'inactivation très différents au traitement laser à 400 nm. De nombreuses études ont confirmé que les virus ont de très grandes différences de sensibilité aux traitements inactivants mais aucune explication à ces phénomènes n'est pour l'heure énoncée. Il manque, en particulier, des connaissances sur les mécanismes au niveau moléculaire favorisant l'inactivation par ces différents traitements. Cette variation de réponse aux traitements laser peut être liée au mécanisme d'inactivation. L'inactivation par le traitement laser est le résultat d'une succession complexe de mécanismes d'interaction entre l'impulsion laser et le matériau biologique. Ces derniers sont très variés, et dépendent d'un nombre important de paramètres [13, 44 - 58]. Si les caractéristiques du matériau sont nombreuses à influencer ces mécanismes (structure, taille), ceux du rayonnement laser le sont tout autant (longueur d'onde, durée d'impulsion, temps d'exposition, densité d'énergie, ...). Les propriétés de surface peuvent se modifier au cours de l'inactivation virale et constituent un élément de distinction entre des particules infectieuses et non infectieuses. Ceci implique que la capsidie protéique est le siège de nombreux processus d'inactivation. Des études récentes [13, 44 - 58] soulignent que l'inactivation virale observée lors d'un traitement par des impulsions ultracourtes est liée à des modifications au niveau de la capsidie des virus. C'est pourquoi nous avons étudié l'inactivation et l'évaluation des propriétés de surface de nos deux virus modèles au cours de ces traitements (la section suivante).

5.3 Étude des propriétés interfaciales des bactériophages MS2 et M13

Les caractéristiques structurales et chimiques des particules virales leur confèrent des propriétés interfaciales spécifiques qui évoluent en fonction des paramètres physicochimiques du milieu. La modification du milieu engendre un changement au niveau de l'interface des virus qui peut entraîner différents comportements dont le rapprochement particule-particule (agrégation). La surface de la capsid est ainsi le siège de réactions physico-chimiques liées au milieu qui peuvent altérer le caractère infectieux et en particulier la capacité du virus à reconnaître sa cellule hôte. Malgré le rôle clé des propriétés de surface des virus, les études centrées sur cet aspect sont encore rares. Il est ainsi très délicat de comprendre les mécanismes d'inactivation des virus dans divers environnements, tout comme les différents comportements de virus comparables du point de vue de leur structure. De plus, des différences de processus d'inactivation virale existent en fonction du facteur inactivant. Très peu d'informations sur la charge électrostatique ou l'hydrophobie des virus entériques sont accessibles. L'évolution de ces paramètres, au cours d'un processus d'inactivation virale définie comme étant la perte du caractère infectieux du virus, est encore peu décrite dans la littérature. Cette section a donc pour objectif de suivre l'évolution des caractéristiques physicochimiques de virus entériques au cours du processus d'inactivation et de dégradation des particules virales. À cette fin, deux bactériophages MS2 et M13 qui présentent des propriétés de surface et biologique différentes ont été ainsi choisis comme modèles des virus entériques pathogènes.

5.3.1 Impact de la nature de l'interface des bactériophage MS2 et M13 sur les mécanismes d'inactivation.

Dans les milieux aqueux contenant des virus, la diminution de la charge microbienne (la diminution des UFP) lors de traitement laser est vraisemblablement due à l'inactivation qui peut être liée à une dégradation de la capsid protéique ou également être expliquées par l'agrégation de protéines de la capsid virale qui se traduit par une perte du pouvoir infectieux des bactériophages [13, 44 - 58]. Les propriétés de surface (capsid virale) peuvent se modifier au cours de l'inactivation virale et constituent un élément de distinction entre des particules infectieuses et non infectieuses. Les caractéristiques structurales et chimiques des particules virales leur confèrent des propriétés interfaciales spécifiques qui évoluent en fonction des paramètres physicochimiques du milieu. La notion d'interface ici est définie, non pas comme une limite nette entre le virus et son environnement, souvent assimilé à la surface virale, mais plutôt comme l'espace (de plusieurs nanomètres d'épaisseur) incluant l'ensemble des

structures virales qui peuvent interagir avec le milieu environnant. La modification du milieu engendre un changement au niveau de l'interface des virus qui peut entraîner différents comportements dont le rapprochement particule-particule (agrégation). L'étude des modifications physico-chimiques nous a permis d'approcher les mécanismes d'inactivation en identifiant de manière non exhaustive les phénomènes impliqués.

L'agrégation virale peut avoir un effet significatif sur la charge microbienne (UFP), il nous a paru intéressant de tenter de discriminer les effets liés à l'agrégation de ceux liés à l'inactivation. Pour cela, nous avons sélectionné les paramètres ayant un impact sur les propriétés interfaciales des virus en phase aqueuse ainsi que la baisse des UFP. Six paramètres sont testés: type de virus, la concentration en virus, le pH, les propriétés de la surface (purifiée et non purifiée), le temps d'exposition et la composition de la solution dans laquelle ils sont stockés: la concentration de sel (force ionique du milieu). La comparaison des propriétés interfaciales permet d'approcher les mécanismes d'inactivation et d'identifier, de manière non exhaustive, les phénomènes impliqués.

5.3.1.1 Effet du pH

Parmi les principaux facteurs environnementaux susceptibles d'influencer l'agrégation des particules virales dans un milieu aqueux, on peut distinguer le pH [172-175]. Le pH est le seul paramètre qui peut expliquer la baisse de la charge microbienne par une agrégation [172-175]. On a effectué des expériences similaires avec des bactériophages M13 et MS2 en faisant varier la durée d'irradiation pour différents pH afin d'évaluer l'impact du pH sur l'inactivation des deux bactériophages par le traitement laser femtoseconde. Les bactériophages MS2 et M13 utilisés dans ces expériences sont propagés dans des milieux sans indicateurs et partiellement purifiés. Le pH de la solution est réajusté (avec HCl et NaOH). Les conditions opératoires sont: l'énergie d'irradiation constante de 10 mJ par impulsion, la cadence de 10 Hz, la durée d'impulsion (τ_L) de 40 fs et la longueur d'onde d'excitation λ de 400 nm. L'effet du pH sur l'inactivation des phages M13 et MS2 par le traitement au laser à 400 nm est résumé dans la figure 5.11. On peut remarquer que le pH a un effet significatif sur l'inactivation des bactériophages MS2 par le traitement laser femtoseconde à 400 nm. En effet, la diminution du niveau du pH permet l'amélioration de l'inactivation des phages. La quantité de virus infectieux diminue lorsque le pH diminue. Par exemple, à pH7, une réduction de $4.21 \pm 0.34 \log_{10}$ est obtenue après un traitement au laser d'une durée de 20 minutes, alors qu'à pH 4, elle peut atteindre $7.2 \pm 0.45 \log_{10}$.

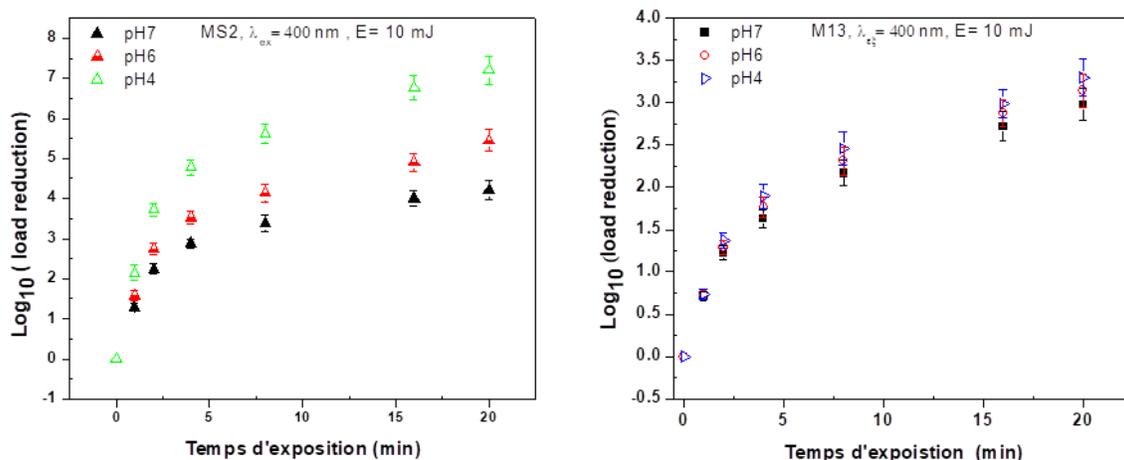


Figure 5.11 Réduction logarithmique de bactériophages MS2 et M13 en fonction du temps d'irradiation pour différentes valeurs du pH. L'énergie de rayonnement est d'environ 10 mJ par impulsion, avec un taux de répétition de 10 Hz et la durée d'impulsion est de 40 fs.

En effet, un faible pH du milieu peut augmenter l'efficacité du traitement. Contrairement à MS2, pour M13, aucun effet du pH dans l'inactivation des bactériophages n'a été observé (voir figure 5.11). Le pH environnemental ne semble pas donc avoir un rôle dans l'inactivation des bactériophages M13.

Les différentes analyses ont démontré que le traitement par des impulsions laser ultracourtes entraînait des changements structuraux sur les propriétés de surface des particules virales (capside virale). Les caractéristiques structurales et chimiques des particules virales leur confèrent des propriétés interfaciales spécifiques qui évoluent en fonction des paramètres physicochimiques du milieu. Par ailleurs, la mesure des propriétés interfaciales a été effectuée en milieu aqueux dans des conditions physicochimiques contrôlées (pH, force ionique, nature des ions). La modification du milieu engendre un changement au niveau de l'interface des virus qui peut entraîner différents comportements dont le rapprochement particule-particule (agrégation).

L'agrégation est un phénomène bien connu décrit dans la science des colloïdes. L'agrégation virale dépend des propriétés de surface et de la concentration du virus [177-183], ainsi que de la composition de la solution dans laquelle ils sont stockés. Peu d'études ont été spécifiquement consacrées à l'agrégation virale, examinant systématiquement la relation entre l'état d'agrégation des particules virales et les unités infectieuses. L'agrégation virale des virus est régie principalement par les interactions électrostatiques, les interactions de van der Waals et

les interactions hydrophobes. Les molécules biologiques sont capables de s'auto associer les unes aux autres grâce à plusieurs types de liaisons chimiques faibles, dont les forces électrostatiques, les forces de Van der Waals, et les interactions hydrophobes. Étant faibles, ces liaisons chimiques nécessitent un rapprochement des molécules les unes des autres. Les interactions entre particules virales sont un phénomène complexe dépendant de nombreux paramètres tels que les propriétés physico-chimiques des virus et du milieu considéré. Plusieurs études ont montré que les régions de la séquence d'une protéine favorisant l'agrégation sont particulièrement riches en résidus hydrophobes. Le phage MS2 est connu pour être l'un des phages les plus hydrophobes [180-183] et est donc un bon candidat pour l'agrégation. Pour s'agréger, les forces électrostatiques répulsives entre les virus chargés négativement doivent être suffisamment réduites ou protégées pour que les particules virales puissent se rapprocher étroitement, ce qui permet de dominer les interactions attractives (par exemple les forces de van der Waals, les interactions hydrophobes).

L'inactivation par le traitement laser est le résultat d'une succession complexe de mécanismes d'interaction entre l'impulsion laser et le matériau biologique. Les vibrations induites par le traitement laser femtoseconde provoquent une perturbation transitoire des liaisons relativement faibles à l'intérieur d'une capsid virale. Cela conduit par conséquent à un dépliement partiel des protéines virales en perturbant les liaisons hydrogène et / ou les interactions hydrophobes, conduisant à l'agrégation de protéines virales. Le phénomène de repliement des protéines est un processus spontané réversible. La forme native de la protéine correspond donc à la conformation de minimum d'énergie que peut adopter cette molécule. En conséquence, les structures secondaire et tertiaire de la protéine ainsi que la manière dont ces structures sont formées dépendent uniquement des interactions entre les différents atomes de la protéine et avec le solvant [177-183]. Le repliement des protéines est le processus physique par lequel les chaînes polypeptidiques acquièrent leurs structures tridimensionnelles. Les protéines sont synthétisées par le ribosome à partir de l'ARN messager. Elles doivent alors se replier dans leur conformation biologiquement active. Cette conformation est appelée état natif de la protéine [177-183]. Cependant, si les protéines sont étroitement serrées dans une configuration à haute densité, comme dans une capsid virale, les protéines dépliées ont la possibilité de reformer ces liaisons avec des protéines voisines ('coller' à leurs voisins) plutôt que de se replier sur leur conformation native, conduisant à l'agrégation de protéines. La capsid virale agrégée est ainsi endommagée et incapable de fonctionner correctement, ce qui empêche le virus d'infecter des cellules.

Le comportement des particules virales, en termes d'agrégation, est directement lié à leur structure et aux caractéristiques physico-chimiques de leur interface [173-183]. La variation du pH influe sur les interactions entre protéines en solution, en modifiant la charge nette des molécules, et donc les répulsions coulombiennes [172-177]. Lorsque le pH du milieu est égal au pI (point isoélectrique (pI) de MS2 est 3.9) des virus [172-173], ce sont alors les interactions hydrophobes et de van der Waals qui deviennent prédominantes par rapport aux interactions électrostatiques, ce qui a pour effet d'augmenter l'attraction entre les particules virales et donc l'agrégation. Ainsi pour MS2, plus le pH est proche du pI, plus la particule virale est propice à l'agrégation.

Nos résultats expérimentaux, visant à déterminer les modifications physico-chimiques, nous ont permis d'approcher les mécanismes d'inactivation en identifiant, de manière non exhaustive, les phénomènes impliqués. Nos mesures expérimentales montrent une grande variabilité des résultats en fonction du virus considéré et des conditions physicochimiques, suggérant des propriétés interraciales différentes d'un virus à l'autre. Ces différences de comportement suggèrent donc qu'il est possible de préciser les mécanismes responsables de la baisse des UFP. Cela indique que le mécanisme d'inactivation du virus M13 est radicalement différent de celui d'un virus MS2. Ces résultats démontrent que l'altération de la structure de la protéine de la capsid virale due à l'agrégation des protéines est la cause d'inactivation de MS2 traitées au laser. La diminution de la charge microbienne de MS2 lors de traitement laser est vraisemblablement due à l'inactivation qui est liée à l'agrégation de protéines de la capsid virale qui se traduit par une perte du pouvoir infectieux des bactériophages. Ce résultat concorde avec de nombreux autres travaux qui montrent que l'augmentation du pH affecte l'efficacité d'inactivation [177-183]. Langlet et al. [180-183] ont récemment démontré que l'agrégation du phage MS2 entraîne une forte diminution du nombre de UFP. Le traitement par le laser femtoseconde à une longueur d'onde spécifique (400 nm dans notre cas) induit un dépliement partiel des protéines virales en perturbant les liaisons hydrogène et / ou les interactions hydrophobes, conduisant à l'agrégation de protéines virales étroitement associées et à l'inactivation du virus. D'autre part, pour les bactériophages M13, des travaux antérieurs ont examiné les mécanismes d'inactivation du phage par le laser femtoseconde [13, 44-58]. Ils ont démontré que l'inactivation des M13 est liée à la détérioration de leur capsid virale due à l'irradiation d'un laser à 400 nm. Globalement, les mécanismes d'inactivation peuvent donc varier d'un virus à l'autre mais également en fonction de la forme.

5.3.1.2 Influence des caractéristiques du milieu

La composition chimique du milieu intervient aussi bien dans les processus d'agrégation. La composition et la concentration en ions d'un milieu influencent les interactions électrostatiques et hydrophobes [173, 180-187]. D'une part, l'intensité des interactions électrostatique peut être influencée par la force ionique du milieu. La force ionique tient compte de la concentration molaire et de la valence des ions en solutions. Afin d'évaluer l'impact de la composition chimique du milieu sur l'inactivation, une série d'expériences est réalisée afin de déterminer l'effet de la concentration de phosphate disodique et chlorure de sodium sur le taux d'inactivation pour les deux phages ainsi que sur le processus d'agrégation.

5.3.1.2.1 Effet de la concentration de phosphate disodique.

Pour évaluer l'effet du pH sur l'inactivation, des expériences de contrôle à fortes concentrations en phosphate disodique, $\text{HNa}_2\text{O}_4\text{P}$, sont réalisées pour éviter l'agrégation et pour permettre une comparaison directe entre des échantillons de virus dispersés. Les concentrations élevées de phosphate empêchent l'agrégation du virus, même à pH bas. Ainsi, différentes suspensions de phages MS2 et M13 sont effectuées à une concentration de 2.48×10^8 UFP/mL dans du tampon PBS contenant 15mM, 50 mM et 150 mM de $\text{HNa}_2\text{O}_4\text{P}$ et de NaCl 137 mM a pH4. Les conditions opératoires sont: pH4, l'énergie d'irradiation constante de 10 mJ par impulsion, la cadence de 10 Hz, la largeur d'impulsion (τ_L) de 40 fs et la longueur d'onde d'excitation λ de 400 nm. L'effet de la concentration en phosphate sur l'inactivation des phages par le traitement au laser est présenté dans la figure 5.12. En effet, nous observons une diminution progressive du taux d'inactivation du MS2 corrélée à l'augmentation de la molarité de phosphate. Par exemple, à 15 mM, la réduction des MS2 peut atteindre $7.51 \pm 0.65 \log_{10}$, alors qu'à 150mM, elle est de l'ordre $3.24 \pm 0.35 \log_{10}$ après 20 min de traitement. En revanche, la variation de la concentration en phosphate a un effet modéré sur l'inactivation des M13 par traitement au laser après 20 minutes d'exposition. On observe une réduction de $3.05 \pm 0.25 \log_{10}$ à 15 mM et $2.68 \pm 0.19 \log_{10}$ à 150 mM. Le phage MS2 est plus sensible que le phage M13 à de fortes concentrations en phosphate et cette perte d'infectiosité est liée à une inactivation du phage.

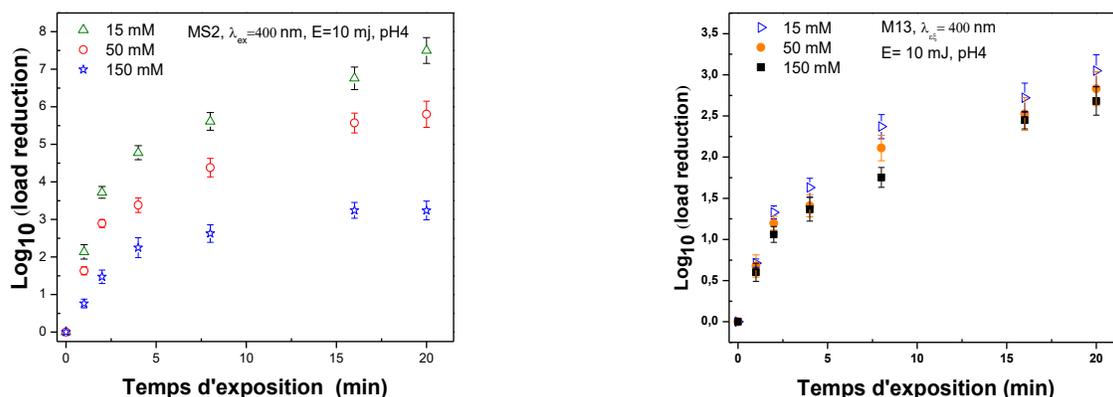


Figure 5. 12 Réduction logarithmique de bactériophages MS2 et M13 dans du tampon PBS contenant 15, 50 et 150 mM de HNa_2PO_4 à pH4 en fonction du temps d'irradiation. Toutes les données ($n = 3$) sont exprimées sous forme de moyenne \pm écart type.

L'effet du pH est étudié à des concentrations élevées de phosphate (150 mM de HNa_2PO_4) pour éviter l'agrégation et pour permettre une comparaison directe entre des échantillons de virus dispersés à pH4. Cela nous a permis de déterminer l'effet du pH sans effets perturbateurs de l'agrégation. L'inactivation par le traitement au laser n'est donc pas complètement indépendante aux valeurs de pH étudiées. Les concentrations élevées en phosphate diminuent encore le taux d'inactivation même à un faible pH du milieu.

Nous n'avons en outre constaté que l'agrégation faible, comme avec les virus M13, n'induit pas d'effet agrégation sur le taux d'inactivation. Dans des conditions environnementales favorisant l'agrégation, certains types de virus ont une agrégation plus forte que d'autres, bien qu'il soit difficile de comprendre pourquoi. Nous pouvons supposer que la forme ou d'autres conditions spécifiques du virus sont la raison de cette différence.

5.3.1.2.2 Effet de Chlorure de sodium (NaCl)

Une série d'expériences sont réalisées afin de déterminer l'effet de la concentration de NaCl sur le taux d'inactivation pour les deux phages purifiés. Ainsi, le phage MS2 et M13 sont mis en suspension à une concentration de 2.48×10^8 UFP/mL dans du tampon PBS à 20, 137, 257 et 300 mM de NaCl à pH7. Les différentes suspensions des phages sont soumises au traitement laser femtoseconde comme décontaminant. Dans cette expérience, nous avons maintenu la densité de puissance du laser fixée à 0.6 TW cm^{-2} ($\tau_L = 40$ fs $E=20$ mJ) et le temps d'exposition à l'irradiation à 20 min pour le laser à 400 nm. Les résultats obtenus sont présentés dans la figure 5.13. En effet, pour MS2, nous observons une élévation progressive de l'inactivation

corrélée à l'augmentation de la molarité de NaCl, la présence de sels conduit à une diminution rapide de la concentration en particules infectieuses. Cette diminution est d'autant plus importante que la concentration en sels augmente. Par exemple, après 20 minutes de traitement laser, on observe une réduction de charge, en échelle \log_{10} , de 4.208 ± 0.393 à 20 mM de NaCl, de 6.312 ± 0.473 à 137 mM de NaCl et de 7.747 ± 0.651 pour 300 mM de NaCl. En revanche pour M13, aucune inhibition n'est observée lorsqu'on augmente la concentration en NaCl.

L'effet de la présence de sels sur la perte de virus infectieux est observé (figures 5.12 et 5.13). Ainsi, lorsqu'une suspension de phages MS2 est soumise au traitement laser, la présence de sels conduit à une diminution rapide de la concentration en particules infectieuses (figures 5.12 et 5.13). Cette diminution est d'autant plus importante que la concentration en sels augmente. En revanche, la présence de sels n'a aucun impact sur le phage M13 quelle que soit sa concentration. Ces résultats concordent avec de nombreux autres travaux portant sur l'impact de la force ionique en sels sur des virus [177, 178, 185, 186, 188, 189]. Ils ont observé que l'agrégation des virus ou des protéines de capsid virale isolée peut être induite avec une force ionique faible en électrolyte indifférent (NaCl < 150 mM). Par contre, pour des électrolytes avec une valence supérieure à un, plusieurs auteurs ont montré que l'agrégation est liée à une augmentation de la concentration saline.

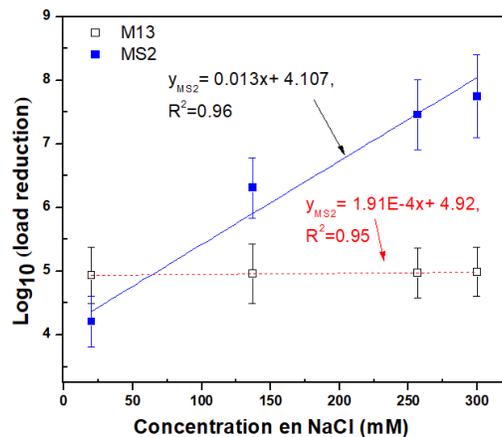


Figure 5.23 Évolution des concentrations en particules MS2 et M13 infectieux après 20 min de traitement laser à 400 nm dans du tampon PBS contenant différentes concentrations de NaCl: 20, 137, 257 et 300 mM à pH7.

Par exemple, Orlov *et al.* ont montré que les protéines de capsid du virus de la mosaïque du tabac (VMT) s'agrègent de manière significative avec l'augmentation de la concentration saline

en PBS [190]. Lee et al. ont observé également l'apparition de particules agrégées exclusivement pour des concentrations en CuCl_2 supérieures à 0,5 mM [187]. Nedoluzhko et Douglas ont observé également une augmentation de l'agrégation du VMT avec l'augmentation de l'ion considéré (Cd^{2+} , Zn^{2+} , Pb^{2+} , Cu^{2+} et Ni^{2+}) mais qu'une concentration critique spécifique à l'ion est nécessaire pour observer ce phénomène [191]. Paradoxalement, ils n'ont constaté aucun effet des ions Mg^{2+} ou Ca^{2+} sur le VMT quelle que soit leur concentration. Tang et al., ont montré aussi que l'agrégation des phages fd et M13 dépend du cation divalent utilisé et de sa concentration [94]. Par exemple, l'agrégation du phage fd est induite par les cations Ca^{2+} , Mg^{2+} , Ba^{2+} et Sr^{2+} mais pour des concentrations différentes (entre 40 et 120 mM). En revanche, l'agrégation du phage M13 n'est provoquée que par Ca^{2+} à 50 mM, les autres cations n'ayant aucun effet, quelle que soit leur concentration.

L'influence des sels sur l'état particulier des virus dans le milieu hydrique est abondamment relatée au travers de nombreuses études, aussi bien pour les processus d'agrégation [177-186]. L'étude de l'influence des ions sur le comportement du virus est complexe car elle dépend de la nature des ions et des contre-ions impliqués dans les phénomènes de double couche électrique, de la valence et de la concentration. De plus les co-ions peuvent jouer un rôle non négligeable sur ces interactions.

La nature de l'ion influence les forces d'interactions. Hofmeister, 1888 a classé les ions en fonction de leur capacité à précipiter de petites protéines: les euglobulines La série de Hofmeister décrit l'effet relatif de quelques anions et cations qui précipitent de petites protéines par agrégation [175-176]. La figure 5.14 présente l'ordre non-exhaustif de la série de Hofmeister.

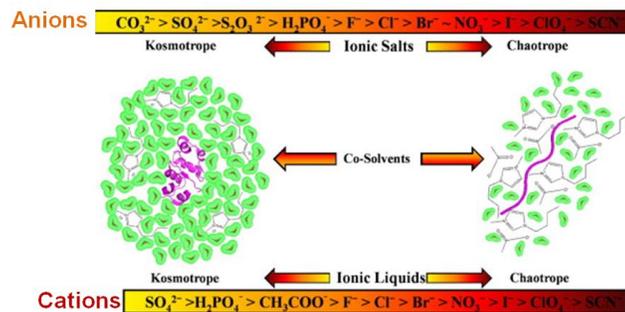


Figure 5. 14 Série de Hofmeister [170-171].

Les ions Kosmotropes, favorisant la précipitation (« salting-out ») des protéines, se distinguent des ions chaotropes solubilisants (« salting-in »). Les ions Kosmotropes ou antichaotropes, également nommés en anglais «structure-maker», possèdent une forte affinité pour l'eau. Ils

augmentent la tension de surface de l'eau et engendrent ainsi une exclusion des groupements hydrophobes, ce qui favorise leur regroupement. Ils s'opposent aux ions chaotropes ou « structure- breaker» qui sont peu hydratés. Ceux-ci diminuent la tension de surface de l'eau en déstabilisant sa structure moléculaire. Ceci a pour effet de diminuer le rapprochement des groupements hydrophobes.

Un des aspects particulièrement étudiés concernant le processus d'agrégation est la concentration des sels présents dans le milieu [178, 185-189]. La force ionique est exprimée en fonction de la concentration du sel dans la solution en tenant compte aussi de la valence des ions selon la formule suivante:

$$I = \frac{1}{2} \sum (c_i * z_i^2) \quad (5.9)$$

avec z_i : la valence de l'espèce i et c_i sa concentration.

Lorsque la force ionique de la solution augmente (par l'augmentation de la concentration de sels), les multicouches, couches électrostatiques, entourant le colloïde sont alors comprimées, de telle sorte que la densité de charge effective des particules diminue, favorisant ainsi leur rapprochement [177, 184, 192, 193]. Un écrantage des charges s'opère donc, en diminuant les interactions électrostatiques et en permettant la mise en évidence des interactions hydrophobes. Cette diminution de la densité de charge est responsable de l'agrégation des particules par un rapprochement facile [177-183].

Un pH de 7 associé à une force ionique de 300 mM semble avoir un impact sur la diminution des UFP. Ceci peut s'expliquer par le fait que l'augmentation de la force ionique entraîne une diminution de la perméabilité probablement liée à la modification de la conformation de la capsid. Cette modification de la conformation de la capsid pour des forces ioniques élevées peut entraîner une diminution de l'infectiosité du phage MS2. L'augmentation de la force ionique, de 20 à 300 mM, permet l'amélioration de l'inactivation par le processus d'agrégation du phage MS2 (figure 5.13). Ces résultats confirment l'influence du NaCl sur l'agrégation du phage MS2. En revanche pour M13, la variation de la force ionique a un effet modéré sur l'inactivation. La diminution des UFP est vraisemblablement due à de l'inactivation qui peut être liée à une dégradation de la capsid virale. Le phage MS2 est plus sensible que le phage M13 à de fortes concentrations en NaCl ou de HNa_2PO_4 et cette perte d'infectiosité est liée à une modification des propriétés de surface au niveau de la capsid virale. Ces modifications diminuent la résistance du virus. Nous démontrons un effet synergique de chlorure de sodium/ phosphate disodique et l'irradiation laser sur le bactériophage MS2. Le pH et la force ionique de la solution peuvent affecter de manière significative le taux d'agrégation des protéines en

modifiant le type et la répartition des charges de surface des protéines, qui non seulement affectent les interactions intramoléculaires et le déploiement d'énergie libre, mais aussi les interactions intermoléculaires entre protéines. Cependant, ces effets peuvent se faire concurrence. Ainsi, l'agrégation du virus dépend non seulement du type de virus considéré mais également de la force ionique et de la nature du contre ion.

5.4 Effet de concentration initiale de phages

Outre les paramètres précédents, on a étudié l'effet de la dilution des suspensions de deux phages sur le taux d'inactivation. Nous voulons voir si une suspension contenant une concentration un peu plus élevée de phages peut être aussi efficace. L'impact potentiel de la concentration initiale des bactériophages MS2 et M13 sur ce procédé d'inactivation par le laser femtoseconde est évalué. Des expériences sont réalisées avec trois concentrations différentes de bactériophages: 2.40×10^8 , 5.69×10^9 et 2.69×10^{10} UFP/ mL. Ces bactériophages purifiés sont suspendus dans du PBS (137 mM NaCl, pH 7) et exposés à une lumière à 400 nm avec un éclairement énergétique de 0.6 TW cm^{-2} pendant 20 min d'exposition. Le taux d'inactivation en fonction de la concentration pour les deux suspensions, à la suite d'une exposition à une lumière, est présenté à la figure. 5.15. Sur cette figure, les densités de population mesurées sont tracées de manière logarithmique. Il faut noter que la valeur moyenne de la concentration de virus (avec la barre d'erreur) de chaque point est calculée sur la base de 3 expériences indépendantes et dans les mêmes conditions expérimentales.

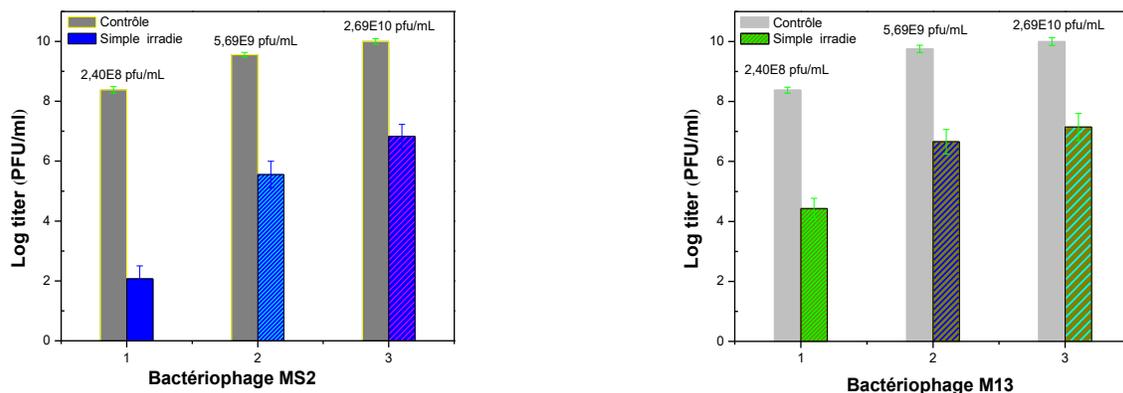


Figure 5. 15 Quantification du taux d'inactivation virale de MS2 et M13 après 20 min de traitement laser à 400 nm dans du tampon PBS en fonction de la concentration initiale pour les deux suspensions.

On remarque comme exposé à la figure 5.15 que le niveau d'inactivation atteint augmente avec la diminution de la concentration initiale des agents infectieux: la réduction de la charge de bactériophage MS2 et M13 diminue avec l'augmentation de la concentration initiale mais avec différents taux selon le phage.

Nous pouvons remarquer que la densité de population initiale a un effet significatif dans l'inactivation des MS2 et M13 mais avec différents taux selon le phage. En effet, la diminution de la concentration initiale des bactériophages permet l'amélioration de l'inactivation des phages. Par exemple, à 2.40×10^8 UFP/ mL, la réduction de la charge, à l'échelle \log_{10} , de MS2 peut atteindre 6.34 ± 0.57 , alors qu'à 2.69×10^{10} UFP / mL, elle est de l'ordre de 3.35 ± 0.39 . Cependant, l'exposition des M13 à la même condition et même durée de traitement a entraîné une réduction de la charge de l'ordre de 4.43 ± 0.33 pour 2.40×10^8 et 3.097 ± 0.47 pour 2.69×10^{10} UFP / mL.

Une différence d'inactivation, en fonction de la concentration initiale, entre ces bactériophages est observée. De plus, au cours de l'inactivation des particules en suspension par traitement laser, des différences de taux d'inactivation de ces particules selon le bactériophage sont constatées. Ces bactériophages sont de tailles différentes. Lors de traitements par le laser femtoseconde, un effet de traîne (en anglais, « tailing effect») est observé sur les virus entériques pathogènes MS2 ou le M13. Plusieurs études démontrent qu'il n'y a pas de relation linéaire entre la concentration et l'inactivation, l'augmentation de la concentration n'entraîne pas une hausse de l'inactivation [194-195]. Quatre hypothèses sont émises pour le bactériophage MS2 dans le cas du traitement inactivant: (i) un changement de réactivité de la solution, (ii) une agrégation des virus, (iii) la présence d'une sous-population virale résistante et (iv) un changement dans les propriétés du virus [194]. Les trois premières sont réfutées par leurs différentes expériences [96], seule une modification des propriétés des virus est alors la cause de cet effet de traîne. Ces variations d'inactivation à différentes concentrations (effet de traîne) peuvent être attribuées à un effet d'encombrement (crowding) dû à la forte concentration des molécules en solution [196-198]. Le phénomène d'encombrement macromoléculaire modifie les propriétés des molécules d'une solution lorsque de fortes concentrations de macromolécules telles que des protéines sont présentes. L'encombrement moléculaire décrit le fait que la concentration totale des macromolécules dans la cellule est si élevée qu'une portion significative du volume est occupé physiquement et est indisponible pour d'autres molécules. La figure 5.16 représente une vue trop simplifiée des effets d'encombrement macromoléculaires sur le comportement des protéines en milieu surpeuplé. Le mécanisme majeur par lequel

l'encombrement macromoléculaire doit affecter les protéines est lié à la minimisation du volume exclu [196-197,199-201]. Le volume exclu peut être minimisé soit par des changements dans le volume hydrodynamique d'une protéine, soit par des changements dans son état d'oligomérisation / association. Les modifications du volume hydrodynamique sont favorisées par la modulation des équilibres chimiques qui affectent le repliement, la structure, la forme, le compactage, la conformation des protéines, la stabilité et l'équilibre conformationnel. Les changements d'état d'association sont contrôlés par modulation des réactions d'association et produit des effets sur les interactions protéine-protéine, les interactions protéine-acide nucléique, l'oligomérisation des protéines, l'agrégation pathologique et les séparations de phases.

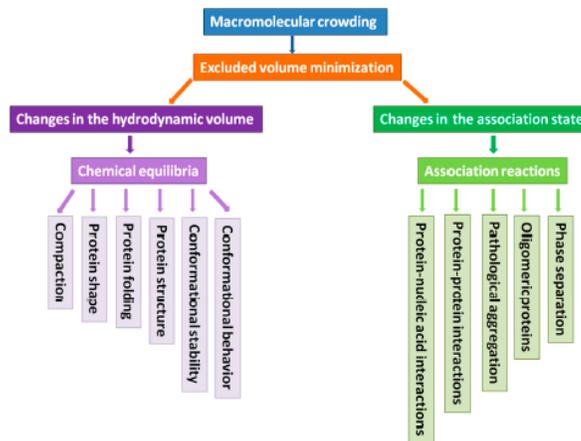


Figure 5. 16 Représentation schématique des effets potentiels du volume exclu sur le comportement des protéines en milieu surpeuplé [192].

Dans une molécule biologique, on distingue un continuum d'interactions entre les macromolécules comprenant des interactions spécifiques qui sont propres à chaque protéine et dépendent de la structure des protéines et des interactions non spécifiques qui dépendent des propriétés globales (charge nette ou forme globale) des molécules et des acides aminés exposés. L'encombrement moléculaire induit des interactions stériques non-spécifiques et répulsives entre les macromolécules. L'encombrement va ainsi modifier les équilibres des réactions telles que le repliement des protéines ou la dimérisation. Cela conduit ainsi à une augmentation des associations entre protéines [102] et des monomères entre eux [101, 105] provoquant ainsi une augmentation de leur résistance vis-à-vis d'un traitement inactivant (figure 5.15). Les premières études théoriques semi-quantitatives afin de quantifier les effets de l'encombrement cytoplasmique sont réalisées dans les années 1980 par Minton [199, 203]. Il a suggéré que l'encombrement peut avoir un impact important sur la stabilité des protéines, les

interactions ou encore le repliement des protéines principalement à cause de l'effet de volume exclu. Le volume exclu est une interaction non spécifique et représente le volume inaccessible à une molécule dû à la présence d'autres macromolécules. L'effet de l'encombrement sur la vitesse de repliement va dépendre du degré d'encombrement. Les interactions non spécifiques entre les macromolécules contribuent de façon significative à l'énergie libre totale. Il a démontré que de hautes concentrations de macromolécules qui ne participent pas directement aux réactions induisent des changements d'un ordre de grandeur ou plus sur les vitesses et les équilibres des réactions et notamment sur le repliement des protéines [199-204]. La modification des chaînes latérales des acides aminés est à l'origine de changements de charge et d'un encombrement stérique plus important, qui se répercutent sur la structure tridimensionnelle des protéines. Le taux de modifications d'une protéine dépend du nombre de groupements, de leur nature, de leur accessibilité et de leur environnement moléculaire proche (encombrement stérique).

5.5 Purification des particules virales

De nombreux paramètres peuvent influencer les interactions entre les particules virales: aussi bien leurs propriétés physico-chimiques que le milieu dans lequel les virus se trouvent. La purification (purification par précipitation au polyéthylène glycol, voir chapitre 3) nous permet de nous affranchir au maximum des interactions liées au milieu et ainsi d'observer les effets de différents paramètres (pH, force ionique) sur les virus seuls. Afin de vérifier l'influence de la purification des particules virales sur le taux d'inactivation par le traitement laser femtoseconde, des expériences sont réalisées en préparant deux suspensions, l'une purifiée et l'autre non-purifiée, de phages MS2 et M13 dans le PBS (137 mM de NaCl, 15 mM de HNa_2PO_4 , pH7). Les conditions opératoires sont: l'énergie d'irradiation constante de 20 mJ par impulsion, la cadence de 10 Hz, la largeur d'impulsion (τ_L) de 40 fs et la longueur d'onde d'excitation λ de 400 nm. L'effet de la purification sur l'inactivation des phages M13 et MS2 par le traitement laser est présenté sur la figure 5.17. On remarque que le niveau d'inactivation atteint augmente avec la purification des agents infectieux mais avec différents taux selon le phage. En effet, la purification des bactériophages permet l'amélioration de l'inactivation des phages. Par exemple, pour MS2 purifié, la réduction de la charge, à l'échelle \log_{10} , peut atteindre 6.34 ± 0.57 , alors que pour MS2 non purifiée, elle est de l'ordre de 4.95 ± 0.35 . Cependant, l'exposition des M13 à la même condition et même durée de traitement a entraîné une réduction de la charge de l'ordre de 4.93 ± 0.42 pour le phage purifié et 4.58 ± 0.47 pour le phage non purifié.

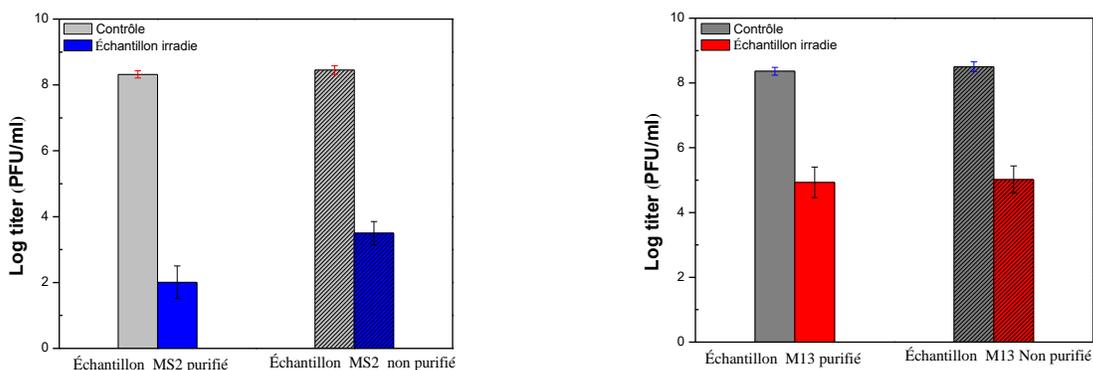


Figure 5. 17 Quantification du taux d'inactivation virale de MS2 et M13 purifié et non-purifié après 20 min de traitement laser à 400 nm dans du tampon PBS.

Les stocks de virus et les échantillons sont souvent propagés dans des milieux de culture tissulaire complexes qui contiennent des constituants potentiellement chromogènes tels que le colorant indicateur rouge neutre, les acides aminés, les protéines cellulaires et les acides nucléiques. Ces matières organiques, majoritairement chargées, interagissent avec les particules virales MS2 ou M13 de l'environnement via les interactions électrostatiques et hydrophobes [195]. Celles-ci peuvent donc entrer en compétition avec les virus pour l'agrégation ou la destruction de la capsid virale. De nombreuses publications [204-207] ont démontré une diminution de l'agrégation virale suite à l'addition de matière organique. Ce sont principalement les interactions électrostatiques qui sont impactées suite à l'apport de matière organique dans un système [208].

La purification est un point crucial pour l'étude des propriétés de surface [209 - 210], mais aussi pour favoriser au maximum la présence de virus infectieux au détriment de génome libre ou de particule virale sans génome. La méthode de purification des particules virales a été décrite comme impactant les propriétés de surface en termes de charge et d'hydrophobie par Dika et al. [209 - 210]. Ces auteurs ont comparé, sur le bactériophage MS2 et ses VLPs, trois méthodes distinctes de purification : la dialyse seule, le gradient de densité et la précipitation au PEG en termes d'effets sur l'agrégation et l'électrocinétique du phage MS2 natif et de VLPs de MS2. Ils ont constaté que l'hydrophobie évaluée via le phénomène d'agrégation diffère selon la méthode utilisée. La charge électrostatique, estimée par la mobilité électrophorétique, est également modifiée. Les profils de mobilités sont similaires entre la dialyse et le gradient de densité, mais au contraire de ceux observés avec la précipitation au PEG. D'après leurs

résultats, la méthode de purification la plus appropriée pour l'étude des propriétés de surface serait la dialyse suivi de gradient de densité afin de sélectionner toutes les particules virales de même densité et d'éliminer les protéines contaminants. D'un point de vue de pratique, il serait judicieux avant tout de confirmer les effets de la méthode de purification des particules virales sur l'inactivation par le traitement laser. Ensuite, des essais d'inactivation avec ces deux bactériophages seraient à réaliser en parallèle avec l'étude des propriétés de surface.

En conclusion, dans les milieux aqueux contenant des virus, deux phénomènes peuvent entraîner une diminution du nombre de PFU lors de traitement laser: inactivation qui peut être liée à une dégradation de la capsid protéique ou l'agrégation de protéines de la capsid virale qui se traduit par une perte du pouvoir infectieux des bactériophages. L'inactivation des phages MS2 et M13 dans l'environnement est gouvernée par les propriétés de surface des particules virales (charge électrostatique et balance hydrophile/hydrophobe). Les propriétés de surface peuvent se modifier au cours de l'inactivation virale et elles constituent un élément de distinction entre des particules infectieuses et non infectieuses. Les caractéristiques structurales et chimiques des particules virales leur confèrent des propriétés interfaciales spécifiques qui évoluent en fonction des paramètres physicochimiques du milieu. La modification du milieu engendre un changement au niveau de l'interface des virus qui peut entraîner différents comportements dont le rapprochement particule-particule (agrégation). Afin d'évaluer l'impact de l'agrégation sur l'inactivation, il faut définir deux configurations expérimentales: une dans laquelle les virus sont regroupés et l'autre dans laquelle ils sont dispersés (à fortes concentrations en phosphate). L'agrégation virale dépend des propriétés de surface et de la concentration du virus, et aussi de la composition de la solution dans laquelle ils sont stockés. L'étude des propriétés de surface nécessite également de travailler avec des particules purifiées.

5.6 Effets des espèces réactives de l'oxygène

L'oxygène singulet (1O_2), une espèce réactive de l'oxygène, est principalement produit dans le vivant suite à une exposition à des rayons lumineux. Cet état excité de l'oxygène est le résultat de l'absorption de ces rayons par des chromophores endogènes ou exogènes (photochimie). Après avoir été excités, ces chromophores réagissent suivant deux types de réaction. Les réactions impliquent un transfert d'électron ou une perte d'hydrogène du chromophore excité vers le solvant créant ainsi des espèces radicalaires. Dans une cellule vivante, ce composé peut être très toxique et causer des dommages à certaines molécules essentielles comme

l'ADN et les protéines. On parle alors de dommage ou stress oxydatif. L'oxygène singulet est à l'origine de la majorité des dégâts infligés aux capsides virales et à l'ADN par exposition aux rayons lumineux [211-212]. En effet, les constantes de réaction de l'oxygène singulet avec les chaînes latérales des protéines sont plus élevées qu'avec la plupart des autres cibles cellulaires [213]. De plus, les protéines sont présentes dans la plupart des systèmes biologiques et à des concentrations particulièrement élevées ce qui en fait des cibles privilégiées de l'oxygène singulet [214 - 216]. La plupart des interactions de l'oxygène singulet avec les protéines de capsid virale impliquent des modifications chimiques: rupture de certaines liaisons hydrogènes ou des contacts hydrophobes qui peuvent affecter de manière significative la capacité d'infection de phages et par conséquent son inactivation. Cependant, nous notons que les systèmes biologiques tels que les bactériophages ne sont pas simplement composés d'acides nucléiques et de protéines. En effet, la composition de ces entités de bactériophages varie considérablement et peut être très complexe [217 - 220]. Il est impossible d'exclure la possibilité que quelques matériaux biologiques absorbant des photons avec l'énergie du laser femtoseconde dans le domaine visible ou infrarouge proche soient présents dans certains matériaux biologiques. Les molécules de chromophore ou de porphyrine [214-218], par exemple, peuvent produire des radicaux libres tels que ROS (oxygène singulet $^1\text{O}_2$ ou radical hydroxyle OH) après absorption de la lumière, ce qui pourrait endommager les acides nucléiques à proximité [214 - 218]. Les radicaux libres générés peuvent rompre les liens faibles entre les protéines de la capsid virale, entraînant sa dégradation. En conséquence, les dommages causés à la capsid conduisent à l'inactivation du virus. Pour vérifier la génération de radicaux libres dans nos échantillons durant le traitement laser femtoseconde à 400 nm, nous avons effectué deux expériences différentes avec les bactériophages M13. Nous allons ici nous intéresser à deux types d'expériences complémentaires. Nous présentons, dans un premier temps, une expérience permettant de considérer qualitativement l'effet de l'oxygène singulet sur l'inactivation par l'utilisation d'un composant chimique antioxydants permettant de capter les radicaux générés. Dans un second temps, nous nous sommes intéressés à des méthodes optiques de détection indirecte de l'oxygène singulet. Cette technique, chimiluminescence, consiste en l'utilisation d'une molécule présentant une forte interaction avec l'oxygène singulet.

5.6.1 Bactériophage M13 + tempol

Les chromophores présents dans la solution d'échantillon peuvent produire les espèces réactives de l'oxygène lors de l'absorption d'un photon fourni par un laser émettant dans le

visible (400 nm), ce qui conduit à l'inactivation des particules virales. À cette fin, nous avons effectué des expériences d'inactivation des bactériophages M13 suspendus dans le PBS en utilisant un puissant piègeur d'oxygène singulet (le tempol) et ce pour différentes longueurs d'onde centrales d'excitation. Notre motivation principale de l'utilisation de tempol est sa capacité d'écarter efficacement les espèces réactives de l'oxygène qui peuvent être générées par l'absorption d'un photon. Dans cette expérience, nous avons maintenu l'énergie d'irradiation constante de 20 mJ par impulsion et le temps d'exposition à l'irradiation à 8 min pour le laser à 800 nm, 2 min pour le laser à 400 nm et pour les deux longueurs d'onde combinées. Une concentration de 8.51×10^7 UFP/mL de M13 est utilisée durant ces expériences. Toutes les expériences sont effectuées en triple. Les erreurs sont exprimées en écarts-types (SD). La figure 5.18 représente Le taux d'inactivation (échelle \log_{10}) des bactériophages M13 ayant été soumis au traitement laser, avec (5 mM) du tempol et sans tempol et ce pour les différentes longueurs d'onde d'excitation. L'efficacité du tempol est vérifiée par la méthode de chimiluminescence (voir détection indirecte de l'oxygène singulet).

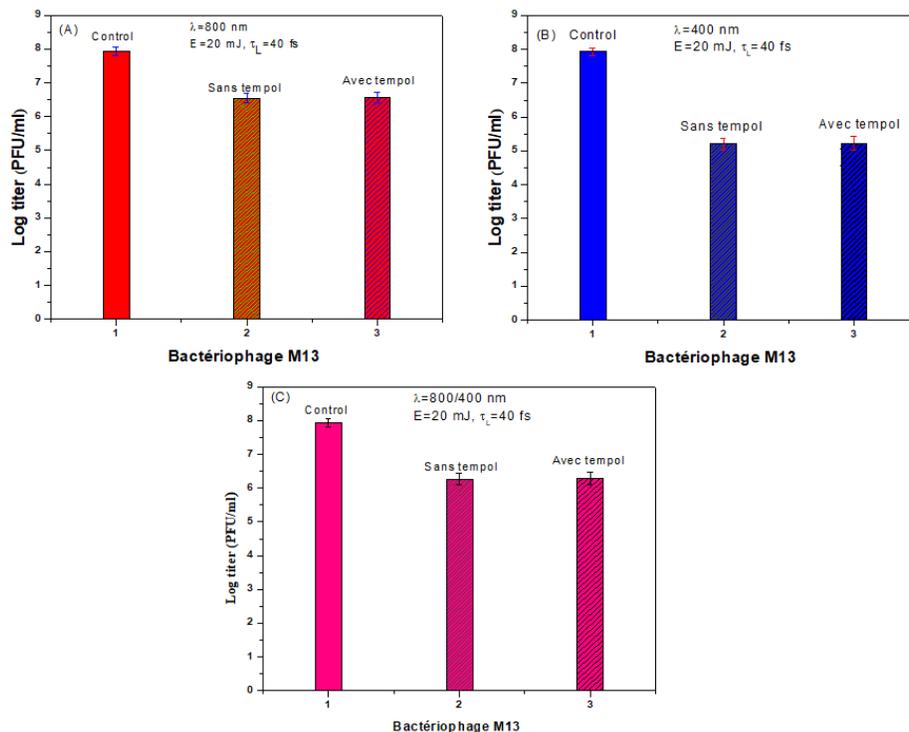


Figure 5. 18 Quantification le taux d'inactivation virale de de bactériophage avec et sans tempol pour différentes longueurs d'ondes. Toutes les données (n = 3) sont exprimées sous forme de moyenne \pm écart type. La durée d'exposition était de 2 minutes pour 400 nm et 800/400 nm et de 8 minutes pour 800 nm.

Nous avons constaté comme exposé à la figure 5.18 que même en présence d'un antioxydant (5 mM du Tempol), l'efficacité de l'inactivation des bactériophages M13 n'est pas réduite. La désoxygénation de la suspension de M13 n'a également aucun effet sur l'inactivation, ce qui indique que $^1\text{O}_2$ n'a pas participé à l'inactivation de M13 dans nos conditions expérimentales. Par exemple, à 800 nm, la réduction logarithmique de M13 sans tempol, soumis à un traitement laser ayant une durée d'impulsion de 40 fs, est de l'ordre de 1.37 ± 0.02 après 8 minutes d'exposition alors que pour M13 avec tempol, elle est de l'ordre de 1.34 ± 0.04 . La réduction logarithmique de M13 sans tempol, soumis à un traitement laser à 400 nm ayant une durée d'impulsion de 40 fs, est de l'ordre de 2.73 ± 0.06 après 2 min de traitement. Cependant, l'exposition des M13 avec tempol à la même condition et même durée de traitement a entraîné une réduction de la charge de l'ordre de 2.68 ± 0.07 .

Les effets indirects de l'irradiation laser femtoseconde, tels que la production de $^1\text{O}_2$ suivie de dommages oxydatifs sur les acides nucléiques et les protéines, auraient peut-être contribué moins, voire pas du tout, à l'inactivation de M13 par rapport à l'effet direct du laser femtoseconde. Néanmoins, l'ISRS constituera un mécanisme dominant d'inactivation des agents pathogènes dans le cas où des processus à la fois d'ISRS et de radicaux libres se produiraient, car la durée de vie naturelle des radicaux libres est généralement très courte (de l'ordre de $3.5 \mu\text{s}$ [219 - 220]). Le processus de diffusion Raman est presque instantané, il se produit beaucoup plus rapidement sur une échelle de temps d'environ 1fs [221 - 222].

5.6.2 Détection de l'oxygène singulet

La détection de l'oxygène singulet est délicate du fait de sa courte durée de vie et de sa haute réactivité. Afin d'y parvenir, deux approches sont couramment exploitées pour la détection de l'oxygène singulet. La 1^{ère} approche consiste à détecter directement les espèces réactives formées dans le milieu suite à l'irradiation. Dans cette approche, la méthode la plus utilisée est une méthode physique reposant sur l'observation de la luminescence de l'oxygène singulet. La 2^{ème} approche repose sur l'étude des réactions biologiques ou biochimiques se produisant suite à l'ajout d'espèces réactives dans le milieu.

5.6.2.1 Détection directe de de l'oxygène singulet

En effet, cette méthode est non invasive et offre un résultat instantané et pratiquement dépourvu d'artefact. La désexcitation de l'oxygène singulet vers son état fondamental peut s'accompagner de production de la lumière. Cette transition, qui consiste à faire passer une

molécule d'un état singulet à un état triplet, émet un photon de phosphorescence. On parle alors de luminescence, de chimiluminescence, ou de phosphorescence de l'oxygène singulet. L'oxygène singulet peut être observé par sa luminescence caractéristique à 1270 nm, qui correspond à sa relaxation : $^1\Delta_g \rightarrow ^1\Sigma_g^-$ [111-114]. En raison de son faible temps de vie, d'environ 3.3 μ s dans l'eau et 67 μ s dans l'eau deutérée (D₂O), la détection de la luminescence l'oxygène singulet a longtemps été impossible [211 - 216]. L'intensité du signal de luminescence dépend de la quantité de molécules d'oxygène présentes.

5.6.2.2 Détection indirecte de l'oxygène singulet

Les mesures indirectes de l'oxygène singulet sont basées sur l'utilisation de molécules « relais » dont les propriétés photophysiques vont changer après action chimique de 1O_2 $^1\Delta_g$ sur la molécule. Ces molécules sont appelées des sondes chimiques. Notons toutefois que peu de ces sondes sont exclusivement sensibles à l'oxygène singulet, un artéfact courant est la transformation de ces molécules par les espèces réactives de l'oxygène.

La mesure de l' 1O_2 basée sur la chimiluminescence est une autre méthode plus quantitative que les méthodes basées sur la fluorescence [223 - 228]. La chimiluminescence est un phénomène d'émission de lumière lors d'une réaction chimique. Il résulte du principe physique de désexcitation des atomes par émission de rayonnement. Le terme de chimiluminescence regroupe l'ensemble des réactions chimiques ou enzymatiques ayant entre autres comme produit de réaction une molécule dans un état excité, dont le retour à un état fondamental s'accompagne de l'émission de photons. En général, les réactions de chimiluminescence sont des processus d'oxydation et se déroulent en trois phases: réaction chimique, transfert d'énergie (excitation) puis émission [223 - 227]. La chimiluminescence est devenue l'une des méthodes les plus sensibles de détection de l'oxygène singulet. Elle ne nécessite pas de lumière d'excitation et ainsi les interférences dues à la fluorescence intrinsèque de l'échantillon et la réflexion de la lumière sont éliminées et permises une meilleure détection. Un grand nombre de sondes chimiluminescentes a été développées ces dernières années, incluant le 2-methyl-6-phenyl-3,7-dihydroimidazo[1,2a] pyran-3-one (CLA) et ses dérivés MCLA et FCLA. Ces composés émettent spontanément de la lumière en présence d'oxygène singulet.

Une étude récente [223 -225] a montré que les concentrations apparentes en 1O_2 , mesurées en utilisant des molécules-sondes hydrophobes chimiluminescentes, augmentaient avec l'hydrophobicité de la sonde et atteignaient des valeurs jusqu'à 100 fois supérieures à celles qui étaient mesurées par une sonde hydrophile conventionnelle comme l'alcool furfurylique (FFA). Les auteurs concluent que 1O_2 se forme principalement au centre de la microzone hydrophobe où il se retrouve alors en concentration plus élevée que dans la zone hydrophile. Sa diffusion

vers l'extérieur de la sphère s'accompagne d'une désactivation physique et d'une baisse progressive de sa concentration tout le long du trajet.

Dans ce travail, nous avons utilisé un agent de chimiluminescence (CL), FCLA, qui peut réagir efficacement avec $^1\text{O}_2$ ou anion super oxyde [223 - 228]. Si les caractéristiques spectrales de la sonde «FCLA» sont modifiées par réaction avec l'oxygène singulet, celle-ci permet d'observer optiquement la création de l'oxygène singulet. Nous commencerons donc par préciser les moyens envisageables pour produire l'oxygène et procéder à la détection de chimiluminescence. Nous présentons, dans un premier temps, le montage expérimental permettant l'étude et la détection de l'émission de la chimiluminescence observée au cours d'une réaction chimique entre $^1\text{O}_2$ et la sonde chimiluminescente (FCLA). Puis, nous avons réalisé une étude préliminaire afin d'effectuer la calibration du dispositif avec une solution saturée en oxygène.

A Dispositif expérimental

Le dispositif expérimental effectivement destiné à la détection de la chimiluminescence à 450 nm de FCLA dans des solutions macroscopiques est présenté sur la figure 5.19. Il s'agit d'une version adaptée d'une approche existante [223 - 228]. La source d'excitation utilisée dans cette expérience est un laser titane saphir (Ti-Sa) avec la longueur d'onde centrée autour de 400 nm et une cadence de 10 Hz. Le faisceau est émis en géométrie colimatée avec un diamètre initial de 3 cm. Une lentille ($f = 50$ cm) est utilisée pour focaliser le faisceau laser dans la zone d'échantillonnage. Le diamètre du faisceau laser qui interagit avec les échantillons est de 1 cm dans toutes les expériences. Le temps d'exposition maximal que nous ayons utilisé était de 15 min.

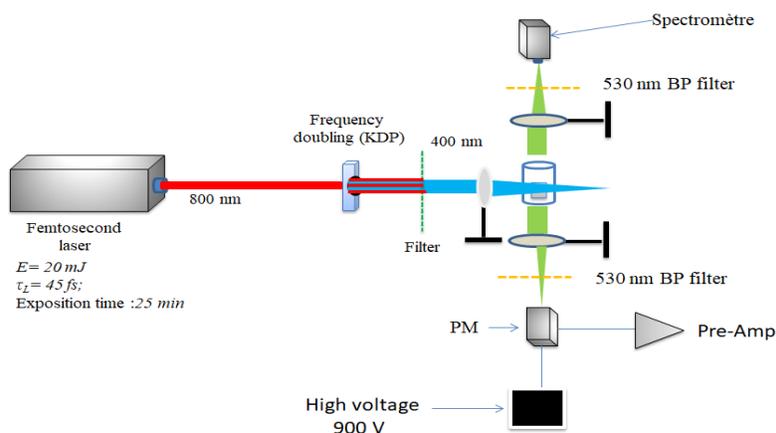


Figure 5. 19 Schéma du dispositif expérimental pour la détection optique indirecte de l'oxygène singulet

Pour ces expériences, des impulsions de 40 fs et d'énergie maximale de 20 mJ par impulsion ont été utilisées. Les deux miroirs dichroïques (400HR/800HT) que nous avons utilisés permettent de séparer l'excitation infrarouge et le signal de seconde harmonique émis dans le bleu en réfléchissant plus de 90 % des longueurs d'onde supérieures à 750 nm et transmettant à passer plus de 90 % les longueurs d'onde inférieures à 700 nm. L'échantillon est placé dans une cuvette en quartz de 1 cm × 1 cm sur la trajectoire du faisceau laser. La solution est homogénéisée à l'aide d'un agitateur magnétique. Ce barreau placé au fond de la cuvette n'a pas perturbé la propagation de faisceau. La lumière émise par l'échantillon est récoltée et est focalisée d'un côté à l'entrée du détecteur de spectromètre (Ocean Optics HR4000 High Resolution Spectrometer) et de l'autre côté à l'entrée de tube à photomultiplicateur (PMT, CR-129, Hamamatsu, Beijing) dont la sortie est reliée à un oscilloscope digital (Tektronix DPO 7254). Le courant produit par le photomultiplicateur est converti en tension (par une boîte de résistances) qui elle est mesurée à l'aide d'un amplificateur synchrone. Des filtres interférentiels passe-bande de largeur à mi-hauteur de 10 nm permettent la suppression de la lumière d'excitation et la transmission de la lumière à 524 nm collectée et projetée sur le PM et spectromètre. Les expériences sont réalisées dans le noir. Des caches opaques sont disposés à côtés des deux dispositifs de mesure afin d'éviter le photoblanchiment.

B Detection En solution: Calibration et limite de détection du dispositif

Pour vérifier le bon fonctionnement de notre dispositif expérimental (figure 5.18) nous avons réalisé l'alignement et la calibration de détection.

a) Alignement du système (Lens + spectrometer)

Les colorants de rhodamine sont fluorescents et sont donc facilement et économiquement décelables par spectromètre. Les colorants de rhodamine sont largement utilisés dans des applications biotechnologiques telles que la microscopie à fluorescence, la cytométrie en flux, la spectroscopie de corrélation de fluorescence, ELISA. La rhodamine B émet à 564 nm lorsqu'elle est utilisée dans un laser à colorant. Son rendement quantique de luminescence est de 0.65 dans l'éthanol basique; 0.49 dans l'éthanol; 1.0 ou 0.687 dans 94 % d'éthanol). Nous avons choisi la rhodamine B diluées dans l'éthanol pour l'alignement du système. L'émission du solvant Rhodamine B + Éthanol est forte à 554 nm (Figure 5.20).

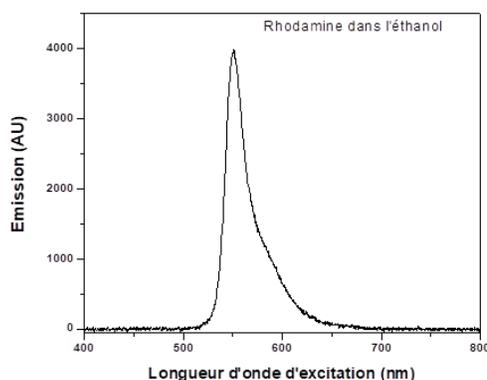


Figure 5.20 Spectre de fluorescence de Rhodamine avec éthanol. La longueur d'onde d'excitation était de 400 nm.

b) Calibration de détection d'oxygène singulet

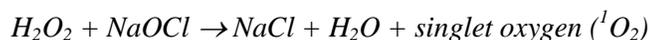
La chimiluminescence est utilisée pour la détection des radicaux libres. Elle est basée sur l'excitation des radicaux libres par une sonde chimiluminescence qui forme un produit à l'état excité et qui émet une onde lumineuse en retombant à l'état fondamental. Cette technique a été utilisée pour la détection des anions superoxyde. Le FCLA est utilisé pour mesurer les espèces à oxygène actif par la méthode de chimiluminescence. Il peut se réduire et le produit de cette réduction interagit avec le $^1\text{O}_2$. Cette interaction conduit à la génération de la chimiluminescence [224 - 228]. FCLA (Fluoresceinyl cypridina luciferin analog) est une sonde de chimiluminescence très sensible à la détection du $^1\text{O}_2$ et du superoxyde. La FCLA est une sonde CL pouvant interagir spécifiquement avec l'oxygène singulet et le superoxyde; il a donc un mécanisme moins compliqué comparé aux autres sondes CL avec une sélectivité plus faible [223 - 228].

Pour vérifier le bon fonctionnement de notre dispositif expérimental (figure 5.19), nous avons réalisé l'étalonnage de la détection sur un signal de chimiluminescence issue de la réaction d'une sonde FCLA avec $^1\text{O}_2$ issu d'une solution saturée en oxygène par des réactions chimiques. Parmi les diverses méthodes d'obtention de l'oxygène moléculaire, il est connu donc que la réaction de l'eau oxygénée (H_2O_2) avec l'hypochlorite de sodium (NaOCl) peut générer $^1\text{O}_2$ de manière efficace. Pour cette raison, la réaction de H_2O_2 avec NaOCl à pH 7.0 est utilisée pour calibrer la concentration de $^1\text{O}_2$ car le rendement en $^1\text{O}_2$ est proche de 100% dans ces conditions [212-227]. La production et la détection de $^1\text{O}_2$ sont réalisées sur la base des procédures précédemment rapportées [223-228]. Du peroxyde d'hydrogène et de l'hypochlorite de sodium ont été préparés en dissolvant 228 μL de peroxyde d'hydrogène (30%) et 6.77 mL

d'hypochlorite de sodium dans 100 mL d'eau doublement distillée. FCLA (acide libre [3,7-dihydro-6-[4-[2-[N9-(5-fluorescéinyl) thiouréido] éthoxy] phényl]-2-méthylimidazo [1,2-a] pyrazin-3-one] a été dissous dans de l'eau distillée à une concentration de 100 $\mu\text{mol L}^{-1}$ et conservé à -80°C jusqu'à utilisation.

Dans notre système de réaction chimique, le peroxyde d'hydrogène réagit avec l'hypochlorite de sodium et génère du $^1\text{O}_2$. Lorsque la molécule sonde FCLA réagit avec $^1\text{O}_2$, les caractéristiques spectrales de la sonde sont modifiées par réaction et ces changements permettent d'observer optiquement la création de $^1\text{O}_2$. Toutes les mesures CL ont été faites à la température ambiante. Le phénomène de CL peut être décomposé en deux étapes:

1 Nous allons d'abord mélanger le H_2O_2 et le NaOCl . La réaction chimique sera:



2 L'ajout de FCLA au mélange $\text{H}_2\text{O}_2 / \text{NaClO}$ a entraîné une émission d'une onde lumineuse. On parle de chimiluminescence lorsque cette excitation résulte.



Une molécule sonde FCLA réagit avec $^1\text{O}_2$ et, après une série de réactions qui entraînent la libération d'énergie chimique supplémentaire, il y a émissions des photons. Les photons sont typiquement dans la gamme de longueur d'onde visible et sont facilement mesurables avec des détecteurs optiques conventionnels tels qu'un spectromètre ou un photomultiplicateur (PMT). Des mesures de la chimiluminescence, en solution, en fonction de la longueur d'onde sont donc réalisées. Le spectre chimiluminescence de FCLA lors d'une réaction avec $^1\text{O}_2$ est illustré à la figure 5.21; on peut conclure que le CL généré à partir de la réaction de FCLA et de $^1\text{O}_2$. Il s'agit d'un processus irréversible dans lequel la structure chimique de FCLA est modifiée. Le spectre est cohérent avec celui de $\text{FCLA-}^1\text{O}_2$ signalé précédemment [223-228]. L'interaction entre H_2O_2 et FCLA ainsi que NaClO et FCLA est étudiée et aucune CL n'est observée ce qui confirme donc que l'émission de CL à 524 nm est générée à partir de la réaction de sonde FCLA et $^1\text{O}_2$. Ainsi, la chimiluminescence est principalement le résultat d'une réaction d'une sonde avec $^1\text{O}_2$. Par ailleurs, il est observé que l'intensité de chimiluminescence dépendait également de la concentration en FCLA. En effet, le temps de demi-vie de l'espèce électroniquement excitée étant très court, le transfert est d'autant plus efficace que la concentration en FCLA est saturante dans le milieu d'étude.

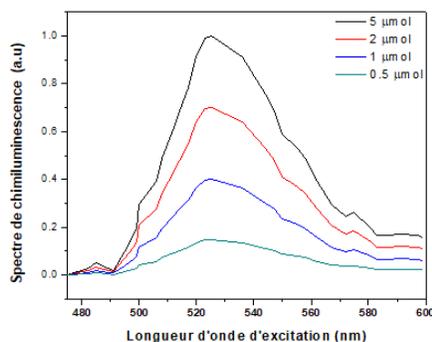


Figure 5. 21 Spectre de chimiluminescence de la sonde FCLA mesurée en solution de H₂O₂/NaClO lors d'une réaction avec ¹O₂ à différentes concentrations de la sonde.

c) Détection de ¹O₂ avec un tube photomultiplicateur (PMT).

Lors de l'interaction de la sonde FCLA avec ¹O₂, ses caractéristiques spectrales sont modifiées. La sonde FCLA interagit avec ¹O₂ et, après une série de réactions qui entraînent la libération d'énergie chimique supplémentaire, il y aura émission des photons. La lumière émise est mesurée avec un photomultiplicateur de haute sensibilité et faible bruit sélectionné. Sa sensibilité spectrale couvre une plage de 390 à 620 nm. La quantité de Relative Light Units (RLU, unités lumineuses relatives) lue sur le photomultiplicateur est directement proportionnelle à la quantité de ROS (Espèces réactives de l'oxygène (Reactive oxygen species)) présentes dans le milieu, étant donné que le FCLA est en excès. Les photons émis entrent dans le tube du photomultiplicateur par son verre cathodique et frappent une photocathode ce qui lui arrache des électrons. Ces électrons sont multipliés par une chaîne de dynodes puis transférés à l'anode, qui va mesurer le signal amplifié. Les impulsions sont ensuite comptabilisées sur un certain temps de mesure. Chaque réaction chimiluminescence présente une cinétique caractéristique d'émission de lumière qui dépend d'une part de la nature des molécules sonde et d'autre part du milieu réactionnel. Quelle que soit la réaction considérée, le signal augmente rapidement pour atteindre sa valeur maximale (I_{max}), puis soit se stabilise, soit décroît rapidement de manière exponentielle, c'est le type "flash lumineux" [214 - 219]. Il est plus approprié de mesurer des signaux luminescents dits persistants afin de réaliser des détections sûres. En effet, cela permet de fixer le temps de mesure de façon à collecter un maximum de signal. La figure 5.22 décrit l'intensité CL de la sonde initiée par la réaction avec ¹O₂. Comme le montre la figure 5.22, le taux de CL du système actuel H₂O₂ / NaOCl est rapide et la CL est mesurée en tant que l'intégrale de l'intensité de la CL en RLU sur la période de réaction totale

(généralement 5 s). Chacune des données est exprimée comme la moyenne de trois déterminations avec une erreur relative ne dépassant pas $\pm 8\%$. Le résultat obtenu est cohérent avec celui de FCLA- $^1\text{O}_2$ signalé précédemment [223-228]. La quantité de photons émise est quantifiée avec un photomultiplicateur et est proportionnelle à la quantité de FCLA oxydée. L'intensité de la CL augmentait avec la concentration de la sonde. Une concentration de $5\ \mu\text{Mol}$ de la sonde produisant suffisamment de CL.

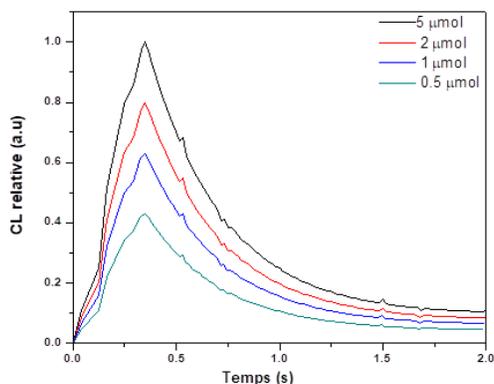


Figure 5. 22 Signal de chimiluminescence de la sonde FCLA mesures en solution de $\text{H}_2\text{O}_2/\text{NaClO}$ lors d'une réaction avec $^1\text{O}_2$ à différentes concentration de la sonde.

5.6.2.3 Détection de la génération de $^1\text{O}_2$ lors de l'inactivation de M13

Les systèmes biologiques tels que les virus, les bactéries et les cellules ne sont pas simplement composés d'acides nucléiques et de protéines; en fait, la composition de ces entités biologiques varie grandement et peut être très complexe. Il est impossible d'exclure la possibilité qu'il y ait quelques molécules dans certains matériaux biologiques qui absorbent les photons fournis par un faisceau laser femtoseconde dans le visible. Par conséquent, supposons que certaines molécules des pathogènes absorbent la lumière dans la gamme visible. Certaines de ces molécules, telles que les molécules de porphyrine, peuvent produire des radicaux libres tels que les ROS après absorption de la lumière, ce qui pourrait endommager les acides nucléiques ou les protéines à proximité entraînant ainsi l'inactivation des particules virales. Dans nos expériences d'irradiation laser à 400 nm, l'inactivation de M13 peut provenir de dommages par $^1\text{O}_2$. Nous présentons une expérience permettant de considérer qualitativement le rôle de $^1\text{O}_2$ pouvant être créés lors de l'inactivation par le laser femtoseconde. Nous combinons notre échantillon M13 avec la sonde chimiluminescence pour vérifier la présence d'oxygène singulet durant le traitement de des bactériophages M13 par le laser femtoseconde à 400 nm. Lorsque

la molécule sonde réagit avec l'oxygène singlet, on observe un changement des caractéristiques spectrales de la sonde. Notre but principal de l'utilisation de FCLA est sa capacité d'interagir efficacement avec les molécules $^1\text{O}_2$ qui peuvent être générées par l'absorption à un photon lors du traitement d'inactivation par le laser femtoseconde à 400 nm. Dans cette expérience, nous avons maintenu l'énergie d'impulsion et la largeur d'impulsion (τ_L) fixées à 20 mJ et 40 fs, respectivement. Le temps d'exposition à l'irradiation est fixe à 2 min. Une concentration de 8.51×10^7 UFP/mL de M13 a été utilisée dans ces expériences. Toutes les expériences sont effectuées en triple. Les erreurs ont été exprimées en écarts-types (SD). La figure 5.23 illustre le spectre chimiluminescence des bactériophages M13 avec FCLA ayant été soumises au traitement laser à 400 nm.

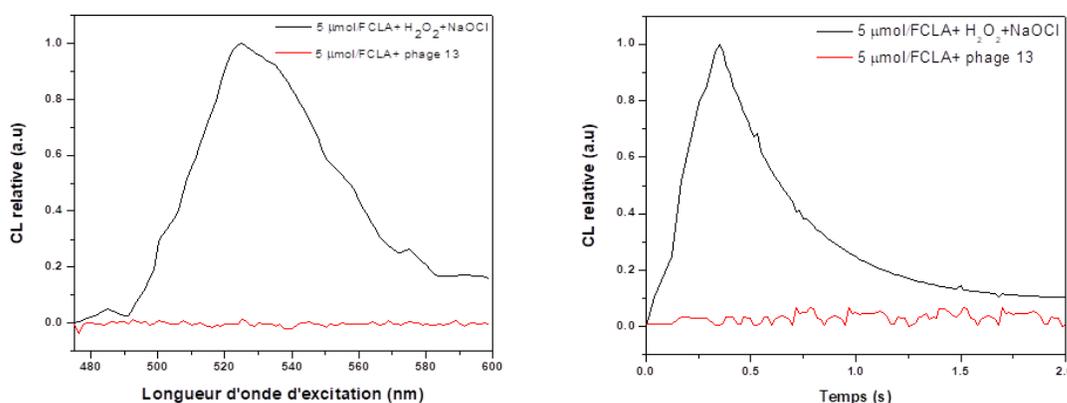


Figure 5. 23 Spectre et signal de chimiluminescence représentatifs de FCLA- $^1\text{O}_2$ mesurés en solution de $\text{H}_2\text{O}_2/\text{NaClO}$ (ligne noire) et de M13+FCLA (ligne rouge).

Comme on peut le voir sur la figure 5.22, les caractéristiques spectrales de FCLA ne sont pas modifiées lors de la combinaison de la sonde avec M13, ce qui confirme l'absence de molécule $^1\text{O}_2$ et par conséquent confirme que $^1\text{O}_2$ n'est pas impliqué dans l'inactivation de M13.

Les résultats de cette étude montrent que les espèces réactives de l'oxygène ne contribuent pas à l'inactivation de M13 par le laser femtoseconde. Nos données expérimentales indiquent que la production de niveaux significatifs de radicaux libres tels que les $^1\text{O}_2$ par le traitement laser femtoseconde est peu probable. Plus précisément, nous avons constaté que l'efficacité de l'inactivation des pathogènes par traitement laser n'est pas réduite même en présence d'antioxydants (tempol), qui empêchent les dommages induits par les radicaux libres. Cependant, dans le cas où des processus ISRS et des radicaux libres se produisent, l'ISRS sera le mécanisme dominant de l'inactivation des agents pathogènes. Des études antérieures

sur le norovirus murin, qui est un virus non enveloppé, a démontré que les espèces d'oxygène réactif jouaient un rôle négligeable ($\leq 0.3\%$) dans la réduction de la charge globale lors de l'inactivation de phages par l'irradiation laser avec des impulsions ultra-courtes [229].

6 CONCLUSION

Notre thèse s'inscrit dans le cadre de la compréhension des mécanismes d'inactivation des agents infectieux, principalement des bactériophages M13 et MS2, suite à un traitement au laser femtoseconde. Le projet proposé découle d'une découverte selon laquelle des impulsions laser relativement faibles émises par un oscillateur laser femtoseconde pourraient inactiver efficacement les virus, avec des dommages minimaux pour les tissus environnants. Nous avons étendu les travaux menés sur l'inactivation des virus par le traitement laser au moyen d'un système laser femtoseconde à technologie titane: saphir. Nous avons mis en place une stratégie expérimentale dans le but d'améliorer de l'inactivation des agents infectieux en optimisant les différents paramètres clefs régissant le procédé d'inactivation par le laser femtoseconde et de déterminer les phénomènes impliqués dans les mécanismes d'inactivation des bactériophages. Les expérimentations sont réalisées avec le bactériophage MS2, qui fait partie des bactériophages ARN F-spécifiques, et les bactériophages M13 ou phages filamenteux qui font partie de la famille de virus non lytiques avec un génome circulaire d'ADN. Ces deux virus, qui sont utilisés comme modèles des virus entériques pathogènes, ont été exposés à un laser femtoseconde dans le visible et le proche infrarouge. Dans un premier temps, nous avons accéléré l'inactivation des bactériophages par le laser femtoseconde rapportée (> 1 heure) à 15 min au maximum en grands volumes (1cm^3). Pour raccourcir le temps d'exposition requis pour l'inactivation, nous utilisons des lasers femtoseconde à haute énergie (20 mJ) avec un taux de répétition de 10 Hz et des durées d'impulsion de 40 fs. L'intensité laser estimée sur la cible est de 0.6 TW cm^{-2} . Avec ces paramètres, le temps d'exposition maximum requis pour l'échantillon est de 15 minutes, ce qui est considérablement plus court que celui utilisé dans les précédentes études d'inactivation des virus au laser. L'efficacité de l'inactivation des agents infectieux par le traitement laser femtoseconde est améliorée en optimisant les différents paramètres du laser tels que la durée d'impulsion, l'énergie d'irradiation, longueur d'onde d'excitation et la durée d'exposition. Nous avons observé que les durées d'impulsions laser plus courtes sont favorables pour une inactivation efficace du virus. Plus la durée d'impulsion est courte, plus l'élimination des agents infectieux est notable. La fonctionnalité des bactériophages M13 et MS2 a été montrée être dépendante de l'énergie d'irradiation du laser d'excitation ainsi que du temps d'exposition. La diminution de l'énergie d'irradiation semble réduire l'efficacité de l'inactivation des virus. L'augmentation du temps d'exposition induit une destruction progressive des particules virales. En outre, l'efficacité de l'inactivation des agents infectieux par le laser femtoseconde s'est avérée dépendre de la

longueur d'onde d'excitation. L'inactivation des bactériophages M13 par la lumière proche infrarouge est un processus beaucoup moins efficace que l'inactivation par la lumière visible. Pour des temps d'exposition courts, les deuxièmes harmoniques de Ti: saphir ont montré une efficacité d'inactivation plus élevée que les longueurs d'onde fondamentales. De plus, il apparaît que les deux longueurs d'onde combinées, visible et proche infrarouge, contribuent aussi à l'effet létal sur les agents infectieux.

Nos résultats expérimentaux suggèrent que l'inactivation des bactériophages par irradiation laser femtoseconde à haute énergie (20 mJ) est un effet combiné de la réduction de viabilité (fonctionnalité) des bactériophages M13 et de dommages génétiques entraînant la rupture de la capsid virale induite par laser. La quantité d'ADN endommagé dépend de la durée du traitement laser ainsi que la longueur d'onde d'excitation. Lors du traitement laser, la charge microbienne diminue progressivement au cours du temps. Afin de comparer l'efficacité de différents traitements d'inactivation entre eux et/ ou pour différents phages, les modèles linéaire et non linéaire (Weibull et biphasique) sont fréquemment utilisés. Ils permettent la détermination de constantes de vitesse d'inactivation de virus en fonction de temps d'exposition au traitement. Il s'agit donc d'établir une loi cinétique permettant de décrire le fonctionnement du procédé dans des conditions contrôlées et enfin valider cette loi dans des conditions de fonctionnement dites 'réelles'. Les résultats de cette étude ont montré que le modèle biphasique a fourni des prévisions plus précises de l'inactivation de bactériophages M13 et MS2 à différents temps de traitement par rapport au modèle linéaire et au modèle de Weibull.

L'efficacité de ce traitement laser dépend également de la sensibilité de l'agent infectieux ciblé. M13 et MS2 ont montré des comportements d'inactivation très différents au traitement laser à 400 nm. Ces différences ne peuvent être rationalisées que si les mécanismes moléculaires induisant l'inactivation sont compris. Nous avons par conséquent déterminé comment des différences dans la composition du génome et des protéines virales peuvent avoir un impact sur les mécanismes d'inactivation des bactériophages par le traitement laser. L'étude des modifications physico-chimiques au cours de l'inactivation virale nous a permis d'approcher les mécanismes d'inactivation en identifiant, de manière non exhaustive, les phénomènes impliqués. Les caractéristiques structurales et chimiques des particules virales leur confèrent des propriétés interfaciales spécifiques qui évoluent en fonction des paramètres physicochimiques du milieu. La modification du milieu engendre un changement au niveau de l'interface des virus qui peut entraîner différents comportements dont le rapprochement particule-particule (agrégation). L'étude des propriétés interfaciales des particules virales est

complexe. Elle dépend de nombreux paramètres dont le virus et le milieu en particulier. Les conditions expérimentales (pH, force ionique...) et la purification des particules virales sont primordiales pour une bonne estimation des propriétés de surface de nos virus modèles. Nous avons sélectionné les paramètres ayant un impact sur les propriétés interfaciales des virus en phase aqueuse ainsi que la baisse des UFP. Six paramètres ont été testés: type de virus, le pH, la concentration en virus, propriétés de surface (purifié et non purifié), temps d'exposition et la composition de la solution dans laquelle ils sont stockés: la concentration de sel (force ionique du milieu). Dans un premier temps, les propriétés interfaciales des virus, en termes de charge et d'hydrophobie, seront déterminées au travers de mesures d'inactivation en fonction de pH. Le seul paramètre pour lequel la baisse des UFP pourrait être expliquée par une agrégation est le pH. Nous avons ainsi mesuré la baisse des UFP pour le phage MS2 et M13 en suspension en fonction du pH. Pour MS2, la diminution du niveau du pH permet l'amélioration de l'inactivation des phages. Par contre, pour M13, aucun effet du pH dans l'inactivation des bactériophages n'a été observé. Afin d'évaluer l'impact de l'agrégation sur l'inactivation, nous avons également effectué des expériences avec des concentrations élevées de phosphate (150 mM de $\text{HNa}_2\text{O}_4\text{P}$) pour éviter l'agrégation et permettre une comparaison directe entre des échantillons de virus dispersés à pH 4. Cela nous a permis de déterminer l'effet du pH sans effets perturbateurs de l'agrégation. L'inactivation par le traitement laser n'était donc pas complètement indépendante des valeurs de pH étudiées. Les concentrations élevées en phosphate diminuent encore le taux d'inactivation de MS2 même à un faible pH du milieu. En revanche, la variation de la concentration en phosphate a un effet modéré sur l'inactivation des M13. La composition chimique du milieu intervient aussi bien dans les processus d'agrégation. La composition et la concentration en ions d'un milieu influencent les interactions électrostatiques et hydrophobes. D'une part, l'intensité des interactions électrostatique peut être influencée par la force ionique du milieu. La force ionique tient compte de la concentration molaire et de la valence des ions en solutions. Afin d'évaluer l'impact de la composition chimique du milieu sur l'inactivation, une série d'expériences est réalisée afin de déterminer l'effet de la concentration de chlorure de sodium sur le taux d'inactivation pour les deux phages ainsi que sur le processus d'agrégation. Lorsqu'une suspension de phages MS2 est soumise au traitement laser, la présence de sels conduit à une diminution rapide de la concentration en particules infectieuses. Cette diminution est d'autant plus importante que la concentration en sels augmente. En revanche, la présence de sels n'a aucun impact sur le phage M13 quelle que soit sa concentration. Ces différences de comportement de l'agent infectieux ciblé suggèrent donc qu'il est possible de préciser les mécanismes responsables de la baisse des

UFP. Cela indique que le mécanisme d'inactivation du virus M13 est radicalement différent de celui d'un virus MS2. Ces résultats démontrent que l'altération de la structure de la protéine de la capsid virale due à l'agrégation des protéines est la cause d'inactivation de MS2 traitées au laser. La diminution de la charge microbienne de MS2 lors de traitement laser est vraisemblablement due à l'inactivation qui est liée à l'agrégation de protéines de la capsid virale qui se traduit par une perte du pouvoir infectieux des bactériophages. D'autre part, pour les bactériophages M13, des travaux antérieurs ont examiné les mécanismes d'inactivation du phage par le laser femtoseconde. Ils ont démontré que l'inactivation des M13 est liée à la détérioration de leur capsid virale due à l'irradiation d'un laser à 400 nm. Globalement, les mécanismes d'inactivation peuvent donc varier d'un virus à l'autre mais également en fonction de la forme.

L'étude de nombreux facteurs d'influence sur l'inactivation de M13 et MS2 par le traitement laser a révélé que des éléments environnementaux, comme une forte concentration initiale de phages ou la purification peuvent affecter encore le taux d'inactivation des virus de façon significative. La purification et la diminution de la concentration initiale des bactériophages permettent l'amélioration de l'inactivation des phages. La réduction de la charge de bactériophage MS2 et M13 diminue avec l'augmentation de la concentration initiale mais avec différents taux selon le phage. La purification améliore influencer le taux d'inactivation.

En conclusion, le laser femtoseconde dans le domaine visible ou proche infrarouge s'avère capable d'inactiver sélectivement un large spectre des agents infectieux de manière dépendante de paramètres laser. L'inactivation est le résultat d'une succession complexe de mécanismes d'interaction athermique entre l'impulsion laser et les organismes microbiens (notamment les pathogènes). Ces derniers sont très variés, et dépendent d'un nombre important de paramètres. Si les caractéristiques des bio-échantillons sont nombreuses à influencer ces mécanismes (structure de capsid, taille biologique, la composition du génome viral, impuretés, concentration initiale de phage, ...), ceux du rayonnement laser le sont tout autant (longueur d'onde, durée d'impulsion, densité d'énergie, durée totale d'irradiation, ...). Malgré ces succès très tôt, il reste difficile de savoir si l'ISRS est le seul mécanisme (ou même le mécanisme le plus important) impliqués dans l'inactivation de M13 ou MS2 vu dans les expériences. Pour étudier comment les ISRS pourraient potentiellement conduire à l'inactivation des virus, une compréhension qualitative initiale de base de la façon dont les modes mécaniques d'un virus sont stimulés par l'ISRS est nécessaire.

Références

- [1]- R. M. Eisberg. *Fundamentals of Modern Physics*. New York: Wiley, 1961.
- [2]- W. Hayes, Rodney Loudon. *Scattering of Light by Crystals*. New York: Wiley, 1978.
- [3]- T. Koutchma, L. J. Forney, C. I. Moraru. *Ultraviolet Light in Food Technology*. Editors. CRC Press: Boca Raton. Chapter 1 Principles and applications of UV technology 2009, 1-31.
- [4]- T. Koutchma. Advances in ultraviolet light technology for non-thermal processing of liquid foods. *Food Bioprocess Technology* 2009; 2(2),138–155.
- [5]- R. G. Qualls, M. H. Dorfman. J. D. Johnson. Evaluation of the efficiency of ultraviolet disinfection systems. *Water Research* 1989, 23, 317–325.
- [6]- H. J. Alter. Pathogen reduction: a precautionary principle paradigm. *Transfusion Medicine Reviews* 2008, 22, 97-102.
- [7]- J. P. AuBuchon. Update on the status of pathogen inactivation methods. *ISBT Sci. Series* 2011, 6, 181–188.
- [8]- D. R. Bangsberg, A. R. Moss and S. G. Deeks. Paradoxes of adherence and drug resistance to HIV antiretroviral therapy. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 2004, 53 (5), 696–699.
- [9]- M. A. Wainberg & G. Friedland. Public health implications of antiretroviral therapy and HIV drug resistance. *Journal of the American Medical Association* 1998, 279, 1977–1983.
- [10]- A. D. Harries, D. S. Nyangulu, N. J. Hargreaves and al.. Preventing antiretroviral anarchy in sub-Saharan Africa. *The Lancet* 2001, 358, 410 –414.
- [11]- J. H. Arnsten, P. A. Demas, H. Farzadegan. Antiretroviral therapy adherence and viral suppression in HIV-infected drug users: comparison of self-report and electronic monitoring. *Clinical Infectious Diseases* 2001, 33, 1417–1423.
- [12]- M. D. Fayer. *Ultrafast Infrared Vibrational Spectroscopy*, CRC Press 2013.
- [13]- S.-W. D. Tsen, K.-T. Tsen. *Selective Photonic Disinfection: A Ray of Hope in the War Against Pathogens*. IOP Concise Physics Morgan & Claypool Publishers 2016, pp. 3-35.
- [14]- P. Gaspard, I. Burghardt. *Chemical Reactions and Their Control on the Femtosecond Time Scale*. 20th. *Advances in Chemical Physics Volume 101*, Wiley-Interscience, New York 1997, pp. 96.
- [15]- A. Michnik, K. Michalik and Z. Drzazga. Effect of UVC radiation on conformational restructuring of human serum albumin. *Journal Photochem. Photobiol. B* 2008, 90, 170–178.
- [16]- J. C. Mallett, L. E. Beghian, T. G. Metcalf and J. D. Kaylor. Potential of irradiation technology for improved shellfish sanitation. *Journal of Food Safety* 1991, 11(4), 231-245.
- [17]- A. Mendonca. *Control of Foodborne Microorganisms*, Juneja VK and Sofos JN, Editors. Marcel Dekker: USA. Chapter 4 Inactivation by irradiation 2002, 75-104.
- [18]- K. Feng, E. Divers, Y. Ma, J. Li. Inactivation of a human norovirus surrogate, human norovirus virus-like particles, and vesicular stomatitis virus by gamma irradiation. *Applied and Environmental Microbiology* 2011, 77(10), 3507-3517.
- [19]- R. Sommer, W. Pribil, S. Appelt, P. Gehringer, H. Eschweiler, L. H. Hermann, A. Cabaj, and T. Haider. Inactivation of bacteriophages in water by means of non-ionizing (UV-253.7nm) and ionizing (gamma) radiation: a comparative approach. *Water Research*.2001, 35(13) 3109-3116.

- [20]- S. Nuanualsuwan, T. Mariam, S. Himathongkham and D. O. Cliver. Ultraviolet inactivation of feline calicivirus, human enteric viruses and coliphages. *Photochemistry and Photobiology* 2002, 76(4), 406-410.
- [21]- G. M. Catunescu, M. Tofana. Effects of Ionizing Radiation on Microbiological Contaminants of Foods. *Journal of Food Science* 2009, 74 (3), 109-13.
- [22]- J. Cadet, E. Sage and T. Douki. Ultraviolet radiation-mediated damage to cellular DNA. *Mutation Research* 2005, 57 (1), 3–17.
- [23]- B. R. Yaun, S. S. Sumner, J. D. Eifert, J. E. Marcy. Response of Salmonella and Escherichia coli O157: H7 to UV energy. *Journal of Food Protection* 2003, 66, 1071-1073.
- [24]- A. J. Ridley, J. R. Whiteside, T. J. McMillan & S. L. Allinson. Cellular and sub-cellular response to UVA in relation to carcinogenesis. *Int. J. Radiat. Biol.* 2009, 85, 177-95.
- [25]- T. P. Coohill, J. Luis Sagripant. Overview of the inactivation by 254 nm ultraviolet radiation of bacteria with particular relevance to biodefense. *Photochemistry and Photobiology* 2008, 84, 1084-1090.
- [26]- C. Cielo Dolores, M. Elisavet, G. Sandra, A. S. Maris. Use of high-intensity ultrasound and UV-C light to inactivate some microorganisms in fruit juices. *Food Bioprocess Technol.* 2010, 3(6), 797–803.
- [27]- J. M. C. Robertson, P. K. J. Robertson et L. A. Lawton. A comparison of the effectiveness of TiO₂ photocatalysis and UVA photolysis for the destruction of three pathogenic microorganisms. *Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry* 2005, 175, 51-56.
- [28]- L. Ford. Estimate of the vibrational frequencies of spherical virus particles. *Physical Review E* 2003, 67, 051924-1.
- [29]- K.-T. Tsen, E. C Dykeman, O. F Sankey, K. H. Lin, S.-W. D. Tsen, J. G. Kiang. Probing the low-frequency vibrational modes of viruses with Raman scattering – bacteriophage M13 in water. *Journal Biomed Opt* 2007, 12 (2), 024009.
- [30]- C. Daniells, I. Duce, D. W P Thomas, P. Sewell. Transgenic nematodes as biomonitors of microwave induced stress. *Mutation Research* 1998, 399, 55-64.
- [31]- W. Ross, W. ADEY. Tissue interactions with non-ionizing electromagnetic fields. *Physiological Review* 1981, 61, 435- 514.
- [32]- D. J. Segelstein. The complex refractive index of water MS thesis University of Missouri-Kansas City 1981 (for a review, see <http://omlc.org/spectra/water/>).
- [33]- K. S. Suslick. The chemical effects of ultrasound. *Scientific American* 1989, 80-86.
- [34]- A. Henglein, D. Herburger, and Maritza Gutierrez. Sonochemistry: some factors that determine the ability of a liquid to cavitate in an ultrasonic field. *Journal Phys. Chem.*, 1992, 96; 1126-1130.
- [35]- B.-K. Kang, M.-S. Kim, J.-G. Park. Effect of dissolved gases in water on acoustic cavitation and bubble growth rate in 0.83 MHz megasonic of interest to wafer cleaning. *Ultrasonics Sonochemistry* 2014, 21 (4), 1496-1503.
- [36]- R. J. Einhorn, C. Einhorn, J. L. Luche. Ultrasound in organic synthesis. Selective oxymercuration via sonochemically in situ generated mercury salts. *Journal Org. Chem.* 1989, 54 (19), 4479-4481.
- [37]- N. E. Harvey and A. L. Loomis. The destruction of luminous bacteria by high frequency sound waves. *Journal bacteriol.* 1929, 17, 373–376.
- [38]- M. Gholami, R. Mirzaei; R. Mohammadi, Z. Zarghampour; A. Afshari. Destruction of Escherichia coli and Enterococcus faecalis using Low Frequency Ultrasound Technology: A Response Surface Methodology. *Health Scope.* 2014, 3(1), e14213.
- [39]- I. Hua, and M. R. Hoffmann. Optimization of ultrasonic irradiation as an advanced oxidation technology. *Environmental Science and Technology* 1997, 31, 2237–2243.

- [40]- L. Stricker, D. Lohse. Radical production inside an acoustically driven microbubble. *Ultrasonics Sonochemistry* 2014, 21, 336–345.
- [41]- M. Furuta, M. Yamaguchi, T. Tsukamoto, B. Yim, C. Stavarache, Y. Maeda. Inactivation of *Escherichia coli* by ultrasonic irradiation. *Ultrasonics Sonochemistry* 2004, 11, 57–60.
- [42]- M. A. Ainslie and J. G. McColm. Simplified formula for viscous and chemical absorption in sea water. *Journal Acoust. Soc. Am.*, 1998, 103 (3) 1671–1673.
- [43]- K.-T. Tsen, E. C. Dykeman, O. F. Sankey., S.-W. D. Tsen, K. H. Lin., and J. G. Kiang. Raman scattering studies of the low-frequency vibrational modes of bacteriophage M13 in water-observation of an axial torsion mode. *Nanotechnology* 2006, 17, 5474.
- [44]- K.-T. Tsen, S.-W. D. Tsen, C.-L. Chang, C.-L. Hung, T. C. Wu, and J. G. Kiang. Selective inactivation of micro-organisms with nearinfrared femtosecond laser pulses. *Journal of Physics: Condensed Matter* 2007, 19, 1-7.
- [45]- S.-W. D. Tsen, T. C. Wu, J. G. Kiang et K.-T. Tsen. Prospects for a novel ultrashort pulsed laser technology for pathogen inactivation. *Journal of Biomedical Science* 2012, 19, 62.
- [46]- K.-T. Tsen, E. C Dykeman, O. F Sankey, K. H. Lin, S.-W. D. Tsen, J. G. Kiang. Probing the low-frequency vibrational modes of viruses with Raman scattering – bacteriophage M13 in water. *Journal of Biomedical Optics* 2007, 12, 024009.
- [47]- K.-T. Tsen, E. C Dykeman, O. F Sankey, K. H. Lin, S.-W. D. Tsen, J. G. Kiang. Observation of the low frequency vibrational modes of bacteriophage M13 in water by Raman spectroscopy. *Journal of Virology* 2006, 3, 79.
- [48]- S.-W. D. Tsen, K.-T. Tsen. An Updated Report of the Ultrashort Pulsed Laser Technology and its Perspectives in Biomedical Applications. *SM Journal of Biomedical Engineering* 2015, 1, 1002.
- [49]- S.-W. D. Tsen, D. H. Kingsley, C. Poweleit, S. Achilefu, D. S. Soroka, T. Wu, K.-T. Tsen. Studies of inactivation mechanism of non-enveloped icosahedral virus by a visible ultrashort pulsed laser. *Journal of Virology* 2014, 11, 20.
- [50]- Kong-Thon Tsen, Shaw-Wei D. Tsen, Chih-Long Chang, Chien-Fu, Tzyy Choou Wu, Juliann G. Kiang, Inactivation of viruses by laser-driven coherent excitations via impulsive stimulated Raman scattering process. *Journal of Biomedical Optics* 2007, Vol. 12 (1–6), 064030.
- [51]- K.-T. Tsen, S.-W. D. Tsen, C.-L. Chang, C.-F. Hung. Inactivation of viruses with a femtosecond laser via impulsive stimulated Raman scattering. *Proc. of SPIE* 2008, Vol. 6854, 68540N1- 68540N10.
- [52]- S.-W. D. Tsen, K. Kibler, B. Jacobs, J. C. Fay, N. P. Podolnikova; S. Achilefu and K.-T. Tsen. Selective photonic disinfection of cell culture using a visible ultrashort pulsed laser. *IEEE J. Sel. Top Quantum Electron.* 2016, 22 (3), 1-21.
- [53]- S.-W. D. Tsen, Y.-S. D. Tsen, K.-T. Tsen, T. C. Wu. Selective inactivation of viruses with femtosecond laser pulses and its potential use for in vitro therapy. *Journal Healthcare Engineering* 2010, 1 (2), 185.
- [54]- K.-T. Tsen, S.-W. D. Tsen, Q. Fu, S. M. Lindsay, Z. Li, S. Cope, S. Vaiana, J. G. Kiang. Studies of inactivation of encephalomyocarditis virus, M13 bacteriophage and *Salmonella typhimurium* by using a visible femtosecond laser irradiation: Insight into the possible inactivation mechanisms. *Journal of Biomedical Optics* 2011, 16 (1–8), 078003.
- [55]- K.-T. Tsen, S.-W. D. Tsen, C.-F. Hung, T. C. Wu. & J. G. Kiang. Selective Inactivation of human immunodeficiency virus with subpicosecond near-infrared laser pulses. *Journal of Physics: Condens. Matter* 2008, 20, 252205.

- [56]- S.-W. D. Tsen, D. H. Kingsley, K. Kibler, B. Jacobs, S. Sizemore, S. M. Vaiana, J. Anderson, K.-T. Tsen, S. Achilefu. Pathogen Reduction in Human Plasma Using an Ultrashort Pulsed Laser. *PLoS One*. 2014, 9(11), 1-8.
- [57]- K.-T. Tsen, S.-W. D. Tsen, Q. Fu, S. M. Lindsay, K. Kibler, B. Jacobs, T. C. Wu, K. Balasubramanyam, S. Jagu, and Ri. B. S. Roden. Photonic approach to the selective inactivation of viruses with a near-infrared subpicosecond fiber laser. *Journal of Biomedical Optics* 2009, 14, 064042.
- [58]- S.-Wei D. Tsen, D. H. Kingsley, K. Kibler, B. Jacobs, S. Sizemore, S. M. Vaiana J. Anderson, K.-T. Tsen, S.I Achilefu, Pathogen Reduction in Human Plasma Using an Ultrashort Pulsed Laser. *PLOS ONE* 2014, 9 (11), e111673.
- [59]- V. Salunkhe, Pieter F. Van der Meer, D. de Korte, J. Seghatchian and L. Gutierrez, Development of blood transfusion product pathogen reduction treatments: a review of methods, current applications and demands *Transfus. Apher. Sci.* 2015, 52 19–34.
- [60]- C. A. Llewelyn, P. E. Hewitt, R. S. Knight, K. Amar, S. Cousens, J. Mackenzie and al., Possible transmission of variant Creutzfeldt-Jakob disease by blood transfusion. *Lancet* 2004; 363, 417-21.
- [61]- O. Garraud, S. Malot, R. Herbrecht, M. Ojeda-Urbe, A. Veyradier, J.-M. Payrat, K. Liu, L. Corash, P. Coppo, Amotosalen-inactivated fresh frozen plasma is comparable to solvent-detergent inactivated plasma to treat thrombotic thrombocytopenic purpura. *Transfusion and Apheresis Science* 2019, 58, 102665.
- [62]- M. Lozano, J. Cid, C. Prowse, J. McCullough, H. G. Klein, J. P. Aubuchon, et al. Pathogen inactivation or pathogen reduction: proposal for standardization of nomenclature. *Transfusion* 2015; 55, 690.
- [63]- J. S. Epstein and J. Vostal, FDA approach to evaluation of pathogen reduction technology. *Transfusion* 2003, 43, 1347–9.
- [64]- J. Smith, G. Rock, Protein quality in Mirasol pathogen reduction technology-treated, apheresis-derived fresh-frozen plasma. *Transfusion* 2010, 50, 926–931.
- [65]- Peter Schlenke, Pathogen Inactivation Technologies for Cellular Blood Components: an Update, *Transfus Med Hemother.* 2014; 41(4), 309–325.
- [66]- R. J. Benjamin, J. McCullough, P. D. Mintz, E. Snyder, W. D. Spotnitz, R. J. Rizzo, David Wages, Jin Sying Lin, Lindsey Wood, and Laurence Corash, Maureen G. Conlan, Therapeutic efficacy and safety of red blood cells treated with a chemical process (S- 303) for pathogen inactivation: a Phase III clinical trial in cardiac surgery patients. *Transfusion* 2005, 45, 1739-1749
- [67]- J. Kaiser-Guignard, G. Canellini, N. Lion, M. Abonnenc, J.-C. Osselaer, J.-D. Tissot, The clinical and biological impact of new pathogen inactivation technologies on platelet concentrates. *Blood Reviews* 2014, 28, 235–241.
- [68]- R. E. Agliastro, G. De Francisci, R. Bonaccorso, D. Spicola, O. Ziino, M. Arico, G. D'Alia, Clinical study in pediatric hemato-oncology patients: Efficacy of pathogen inactivated buffy coat platelets versus aphaeresis platelets. *Transfusion* 2006, 49 (9s), 117 a.
- [69]- <http://www.phac-aspc.gc.ca/lab-bio/res/psds-ftss/mycoplasma-spp-fra.php>;
- [70]- M. Harald, U. Gravemann, A. Bayer, & T. H. Müller, Sterilization of platelet concentrates at production scale by irradiation with short wave ultraviolet light. *Transfusion* 2009, 49, 1956-1963.
- [71]- H. C. Randall, V. Djonov, C. Fellabaum, and V. Volarevic, Risks of Using Sterilization by Gamma Radiation: The Other Side of the Coin. *International Journal of Medical Sciences* 2018; 15(3), 274-279.
- [72]- S. P. Langdon, Cell culture contamination: an overview *Methods Mol. Med.* 2004, 88, 309–17.

- [73]- A. Mirjalili, E. Parmoor, S. M. Bidhendi and B. Sarkari, Microbial contamination of cell cultures: a two year study. *Biologicals*, 2005, 33, 81–85.
- [74]- B. N. Fields, D. M. Knipe; P. M. Howley, *Fields Virology*, Wolters Kluwer Health/Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia 2013, pp 500.
- [75]- B. Sanders, M. Koldijk and H. Schuitemaker, Inactivated viral vaccines *Vaccine Analysis: Strategies, Principles, and Control* ed B K Nunnally, V E Turula and R. D Sitrin RD (Berlin: Springer) 2015, pp 45–80.
- [76]- Felix Geeraedts, Nadege Goutagny, Veit Hornung, Martina Severa, Aalzen de Haan, Judith Pool, Jan Wilschut, Katherine A. Fitzgerald, and Anke Huckriede, Superior Immunogenicity of Inactivated Whole Virus H5N1 Influenza Vaccine is Primarily Controlled by Toll-like Receptor Signalling. *PLoS Pathogens* 2008, 4(8), e1000138.
- [77]- D. G. Brockstedt, K.S. Bahjat, M. A. Giedlin, W. Liu, M. Leong, W. Luckett, Y.Gao, P. Schnupf, D. Kapadia, G. Castro, J.Y.H. Lim, A. Sampson-Johannes, A. A. Herskovits, A. Stassinopoulos, H.G. Archie Bouwer, J. E. Hearst, Portnoy D.A, Cook D. N., Dubensky TW J. R., Killed but metabolically active microbes: a new vaccine paradigm for eliciting effector T-cell responses and protective immunity. *Nature Medicine* 2005, 11, 853–860.
- [78]- M. Alsharifi, Y. Furuya, T. R. Bowden, M. Lobigs, A. Koskinen, M. Regner, L. Trinidad, D. B. Boyle, A. Mullbacher, Intranasal Flu Vaccine Protective against Seasonal and H5N1 Avian Influenza Infections. *PLoS One* 2009, 4(4), e5336.
- [79]- N. Bardiya and J H Bae, Influenza vaccines: recent advances in production technologies *Appl. Microbiol. Biotechnol*, 2005. 67,299–305.
- [80]- N. K. Blackburn and T. G. Besselaar, study of the effect of chemical inactivants on the epitopes of Rift Valley fever virus glycoproteins using monoclonal antibodies *Journal of Virological Methods* 1991, 33, 367–74.
- [81]- A. E. Moghaddam, W. Olszewska, B. Wang, J. S. Tregoning, R. Helson, Q. J. Sattentou and P. J. M. Openshaw, A potential molecular mechanism for hypersensitivity caused by formalin-inactivated vaccines. *Nature Medicine* 2006, 12, 905–07.
- [82]- A. E. Moghaddam, K. H. Gartlan, L. Kong and Q. Sattentau, Reactive carbonyls are a major Th2-inducing damage-associated molecular pattern generated by oxidative stress, *Journal of Immunology* 2011, 187, 1626–33.
- [83]- V. A. Fulginiti, J. J. Eller, O. F. Sieber, J. W. Joyner, M. Minamitani and G. Meiklejohn, Respiratory virus immunization. I. A field trial of two inactivated respiratory virus vaccines; an aqueous trivalent parainfluenza virus vaccine and an alum-precipitated respiratory syncytial virus vaccine. *American Journal Epidemiology*. 1969, 89, 435–48.
- [84]- Y. Maeda, M. Hatta, A. Takada, T. Watanabe, H. Goto, G. Neumann, Y. Kawaoka, Live Bivalent Vaccine for Parainfluenza and Influenza Virus Infections. *Journal of Virology* 2005, 79 (11), 6674-6679.
- [85]- H. W. Kim, J. G. Canchola, C. D. Brandt, G. Pyles, R. M. Chanock, K. Jensen and R. H. Parrott, Respiratory syncytial virus disease in infants despite prior administration of antigenic inactivated vaccine. *American Journal of Epidemiology* 1969, 89, 422–34.
- [86]- R. A. Dudas and R. A. Karron, Respiratory Syncytial Virus Vaccines. *Clinical Microbiology Reviews* 1998, 11(3), 430–439.
- [87]- C. S. Sander, H. Chang, S. Salzmann, C. S. L. Muller, S. E. Mudiyansele, P. Elsner and J. J. Thiele, Photoaging is associated with protein oxidation in human skin in vivo. *Journal of Investigative Dermatology* 2002, 118, 618–25.

- [88]- D. Scheidegger, R. P. Pecora, P. Radici, S. C. Mand Kivatinitz, Protein oxidative changes in whole and skim milk after ultraviolet or fluorescent light exposure. *Journal Dairy Sci.*, 2010, 93 (5), 101–9.
- [89]- S.-W. D. Tsen, N. Donthi, V. La, W.-H. Hsieh, Y.-D. Li, J. Knoff, A. Chen, T.-C. Wu, Chien-Fuung, S. Achilefu, and K.-T. Tseni, Chemical-free inactivated whole influenza virus vaccine prepared by ultrashort pulsed laser treatment. *Journal Biomed Opt.* 2015, 20(5), 051008.
- [90]- K.-C. Chou. Low-frequency collective motion in biomacromolecules and its biological functions. *Biophysical chemistry*, 1988, 30, 3-48.
- [91]- E. C Dykeman, O. F Sankey and K.-T. Tsen. Raman intensity and spectra predictions for cylindrical viruses. *Physical Review E* 2007, 76.
- [92]- T.-M. Liu, H.-P. Chen, H.-C. Wang, L.-T. Wang, J.-R. Wang, T. -N. Luo, Y.-J. Chen, S.-I. Liu and C.-K. Sun. Microwave resonant absorption of viruses through dipolar coupling with confined acoustic vibrations. *Applied Physics Letters* 2009, 94, 043902
- [93]- C.-K. Sun, Y.-C. Tsai, Y.-J. E. Chen, T.-M. Liu, H.-Y. Chen, H.-C. Wang, and C. Fang Lo. Resonant Dipolar Coupling of Microwaves with Confined Acoustic Vibrations in a Rod-shaped Virus. *Scientific Reports* 2017, 7, 4611.
- [94]- R. Y. Dodd, E. P. Notari, and S. L. Stramer. Current prevalence and incidence of infectious disease markers and estimated window-period risk in the American Red Cross blood donor population. *Transfusion* 2002, 42, 975-9.
- [95]- E. C. Dykeman, D. Benson, K.-T. Tsen, and O. F Sankey. Simulations of impulsive laser scattering of biological protein assemblies: Application to M13 bacteriophage. *Physical Review E* 2009, 80, 041909.
- [96]- R. C. Prince, R. R. Frontiera, and E. O. Potma. Stimulated Raman Scattering: From Bulk to Nano. *Chemical Reviews* 2017, 117 (7), 5070.
- [97]- Y. X. Yan, E. B. Gamble, and K. A. A. Nelson. Impulsive stimulated scattering: General importance in femtosecond laser pulse interactions with matter, and spectroscopic applications. *Journal of chemical physics* 1985, 83, 5391.
- [98]- K.-T. Tsen, E. C. Dykeman, O. F Sankey, S.-W. D. Tsen, and J. G. Kiang. *Contemporary Trends in Bacteriophage Research* ed H T Adams (Hauppauge, NY: Nova Science Publishers) 2009, pp 151–177.
- [99]- G. B. Arfken. *Mathematical Methods for Physicists*, Elsevier Academic Press 2005 sixth edition, New York: Academic.
- [100]- A. A. Aksyuk and M. G. Rossmann. Bacteriophage Assembly. *Viruses* 2011, 3 (3), 172–203.
- [101]- M. G. Weinbauer. Ecology of prokaryotic viruses. *FEMS Microbiology views* 2004, 28 (2), 127-181.
- [102]- S. Hagens, U. Bläsi. Genetically modified filamentous phage as bactericidal agents: a pilot study. *Lett Appl Microbiol.* 2003, 37(4), 318-23.
- [103]- D. A. Marvin. Filamentous phage structure, infection and assembly. *Curr. Opin. Struct. Biol.* 1998, 8, 150-158.
- [104]- R. J. Rakonjac, N. J. Bennett, J. Spagnuolo, D. Gagic and M. Russe. Filamentous Bacteriophage: Biology, Phage Display and Nanotechnology Applications. *Curr. Issues Mol. Biol.* 2011, 13, 51-75.
- [105]- D. A. Marvin, R. D. Hale, C. Nave, and M. H. Citterich. Molecular-Models and Structural Comparisons of Native and Mutant Class-i Filamentous Bacteriophages Ff (Fd, F1, M13), If1 and Ike. *Journal Mol. Biol.* 1994, 235, 260-286.
- [106]- D. Stopar, R. B. Spruijt, C. J. A. M. Wolfs, and M. A. Hemminga. Mimicking initial interactions of bacteriophage M13 coat protein disassembly in model membrane systems. *Biochemistry* 1998, 37, 10181-10187.
- [107]- G. P. Smith, and V. A. Petrenko. Phage display. *Chem. Rev.* 1997, 391-410.

- [108]- C. Gao, S. Mao, C.-H. L. Lo, P. Wirsching, R. A. Lerner, and K. D. Janda. Making artificial antibodies: A format for phage display of combinatorial heterodimeric arrays. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 1999, 96, 6025-6030.
- [109]- B. L., M. Langley, and D. Twa. Co-infection of C3000 *Escherichia coli* with Bacteriophages MS2 and, T7 or Φ X-174 Results in Differential Cell Lysis Patterns. *Journal of Experimental Microbiology and Immunology (JEMI)* 2012, 16, 139-143.
- [110]- H. Mamane, H. Shemer, K. G. Linden. Inactivation of *E. coli*, *B. subtilis* spores, and MS2, T4, and T7 phage using UV/H₂O₂ advanced oxidation. *Journal of Hazardous Materials* 2007, 146, 479–486.
- [111]- W. Min Jou, G. Haegeman, M. Ysebaert, W. Fiers. Nucleotide sequence of the gene coding for the bacteriophage MS2 coat protein. *Nature* 1972, 237, 82–88.
- [112]- C. D. Anobom, S. C. Albuquerque, F. P. Albernaz, A. C. Oliveira, J. L. Silva, D. S. Peabody, A. P. Valente, F. C. L. Almeida. Structural Studies of MS2 Bacteriophage Virus Particle Disassembly by Nuclear Magnetic Resonance Relaxation Measurements. *Biophys Journal* 2003, 84, 3894–3903.
- [113]- Ó. Rolfsson, S. Middleton, I. W. Manfield, S. J. White, B. Fan, R. Vaughan, N. A. Ranson, E. Dykeman, R. Twarock, J. Ford, K. C. Cheng and P. G. Stockley. Direct Evidence for Packaging Signal-Mediated Assembly of Bacteriophage MS2. *Journal of molecular biology* 2016, 428 (2 Pt B), 431-48.
- [114]- C. Z. Ni, R. Syed, R. Kodandapani, J. Wickersham, D. S. Peabody, K. R. Ely. Crystal-structure of the MS2 coat protein dimer—implications for RNA binding and virus assembly. *Structure*.1995; 3, 255-263.
- [115]- K. Valegård, L. Liljas, K. Fridborg, T. Unge. The three-dimensional structure of the bacterial virus MS2. *Nature* 1990, 345(6270), 36–41.
- [116]- D. S. Peabody. The RNA binding site of bacteriophage MS2 coat protein. *EMBO Journal*, 1993, 12:595–600.
- [117]- M. Perry. Multilayer Dielectric Gratings, Increasing the Power of Light. *Science and Technology Review* 1995.
- [118]- D. Strickland, G. Mourou. Compression of amplified chirped optical pulses. *Optics Communications*, 1985, 55(6), 447 – 449.
- [119]- S. Jensen and M. E. Anderson. Measuring Ultrashort Optical Pulses in the Presence of Noise: an Empirical Study of the Performance of Spectral Phase Interferometry for Direct Electric Field Reconstruction. *Applied Optics* 2004, 43 (4), 883-93.
- [120]- R. Trebino, K. W. DeLong, D. N. Fittinghoff, J. N. Sweetser, M. A. Krumbugel, and B. A. Richman. Measuring Ultrashort Laser Pulses in the Time-frequency Domain using Frequency-resolved Optical Gating. *Review of Scientific Instruments* 1997, 68 (9), 3277-3295.
- [121]- R. J. W. Lambert and M. D. Johnston. One explanation for the variability of the bacterial suspension test. *Journal of Applied Microbiology* 2000, 88, 907-913.
- [122]- M. Ferrario, S. Maris Alzamora, S. Guerrero. Inactivation kinetics of some microorganisms in apple, melon, orange and strawberry juices by high intensity light pulses. *Journal of Food Engineering* 2013, 118, 302–311.
- [123]- A. H. Geeraerd, V. P. Valdramidis, J. F. Van Impe. GlnaFit, a freeware tool to assess non-log-linear microbial survivor curves. *International Journal of Food Microbiology* 2005, 102, 95–105.
- [124]- A. Bevilacqua, B. Speranza, M. Sinigaglia and M. Rosaria Corbo. A Focus on the Death Kinetics in Predictive Microbiology: Benefits and Limits of the Most Important Models and Some Tools Dealing with Their Application in Foods. *Foods* 2015, 4, 565-580.

- [125]- P. Mafart, O. Couvert, S. Gaillard, & I. Leguerinel. On calculating sterility in thermal preservation methods: application of the Weibull frequency distribution model. *International Journal of Food Microbiology* 2002, 72, 107-113.
- [126]- M. Peleg and M. B. Cole. Reinterpretation of microbial survival curves. *Crit Rev Food Sci Nutr.* 1998, 38, 353-80.
- [127]- A.J.S Martinus. van Boekel. On the use of the Weibull model to describe thermal inactivation of microbial vegetative cells. *International Journal of Food Microbiology* 2002, 74:139– 159.
- [128]- R. Virto, D. Sanz, I. Álvarez, S. Condon. Application of the Weibull model to describe inactivation of *Listeria monocytogenes* and *Escherichia coli* by citric and lactic acid at different temperatures. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 2006, 86 (6), 865-870.
- [129]- E. C Dykeman, O. F Sankey. Vibrational energy funneling in viruses—simulations of impulsive stimulated Raman scattering in M13 bacteriophage. *Journal of Physics: Condens. Matter* 2009, 21, 505102.
- [130]- L. Dhar, J. A. Rogers, and K. A. Nelson. Time-Resolved Vibrational Spectroscopy in the Impulsive Limit. *Chemical Review* 1994, 94, 157.
- [131]- R. W. Boyd. *Nonlinear Optics*, 2nd ed. Academic Press, San Diego, 2003, pp. 253.
- [132]- T. Brabec and F. Krausz. Nonlinear optical pulse propagation in the single-cycle regime. *Physical Review Letters* 1997, 78, 3282 - 3285.
- [133]- A. V. Husakou and J. Hermann. Supercontinuum generation of higher-order solitons by fission in photonic crystal fibers. *Physical Review Letters* 2001, 87, 203901 1-4.
- [134]- R L. Fork, C.V. Shank, C. Hirlmann, R. Yen et W. J. Tomlinson. Femtosecond white-light continuum pulses. *Optics Letters* 1983, 8, 1–3.
- [135]- R. Hellwarth. Third-order optical susceptibilities of liquids and solids, *Progress in Quantum Electronics* 1977, 5, 1-68.
- [136]- W. Harm. *Biological effects of ultraviolet radiation*. IUPAB biophysics series 1. Cambridge University Press, Cambridge, England 1980, pp. 23.
- [137]- W. A. M Hijnen, E. F. Beerendonk, G. J. Medema. Inactivation credit of UV radiation for viruses, bacteria and protozoan (oo) cysts in water: a review. *Water Res* 2006, 40, 3–22.
- [138]- G. W. Park, K. G. Linden, M. D. Sobsey. Inactivation of murine norovirus, feline calicivirus and echovirus 12 as surrogates for human norovirus (NoV) and coliphage (F+) MS2 by ultraviolet light (254 nm) and the effect of cell association on UV inactivation. *Lett Appl Microbiol* 2011, 52, 162– 167.
- [139]- N. Giese and J. Darby. Sensitivity of microorganisms to different wavelengths of UV light: implications on modeling of medium pressure UV systems. *Journal: Water Research.* 2000: 34 (16): 4007-4013.
- [140]- T. X. Wang, Scott J. MacGregor, John G. Anderson, Gerry Woolsey, Pulsed ultraviolet inactivation spectrum of *Escherichia coli*. *Water Research* 2005, 39 (13), 2921-2925.
- [141]- M. Maclean, S. J. MacGregor, J. G. Anderson, G. Woolsey. High-intensity narrow-spectrum light inactivation and wavelength sensitivity of *Staphylococcus aureus*, *FEMS Microbiology Letters* 2008, 285 (2), 227–232.
- [142]- J. G. Anderson, N. J. Rowan, S. J. MacGrego, R. Anthony Fouracre, O. Farish. *IEEE Trans Plasma science* 2000, 28, 83–88.
- [143]- J. Dunn, T. Ott, W. Clark. Pulsed-light treatment of food & packaging. *Food technology* 1995, 49(9), 95-98.
- [144]- A.-M. Sapse. *Molecular Orbital Calculations for Biological Systems*, Oxford University Press, New York 1998, pp.256.

- [145]- F. S. Barnes, B. Greenebaum. *Biological and Medical Aspects of Electromagnetic Fields*, CRC Press, New York 2006, pp.371.
- [146]- Z. Sinkala. Soliton/exciton transport in proteins. *Journal of Theoretical Biology* 2006, 241 (4), 919.
- [147]- C. H. Lu, K. H. Lin, Y. Y. Hsu, K.-T. Tsen, Yung Kuan Kuan. Inhibition of *Escherichia coli* respiratory enzymes by short visible femtosecond laser irradiation. *Journal of Physics D: Applied Physics* 2014, 47, 315402.
- [148]- M. Nazari, X. Li, M. A. Alibakhshi, H. Yang, K. Souza, C. Gillespie, S. Gummuluru, M. Hong, B. M. Reinhard, K. S. Korolev. Femtosecond photonic viral inactivation probed using solid-state nanopores. *Nano Futures* 2018, 2, 1-11.
- [149]- E. L. Nussbaum, L. Lilge, and T. Mazzulli. Effects of 630-, 660-, 810-, and 905-nm Laser Irradiation Delivering Radiant Exposure of 1-50 J/cm² on Three Species of Bacteria in Vitro. *Journal of Clinical Laser Medicine & Surgery* 2002, 20 (6), 325-33.
- [150]- R. Lubart, A. Lipovski, Y. Nitzan, and H. Friedman. A possible mechanism for the bactericidal effect of visible light, *Laser Therapy*. 2011, 20 (1), 17.
- [151]- A. Lipovsky, A. Gedanken, Y. Nitzan, R. Lubart. Visible light-induced killing of bacteria as a function of wavelength: Implication for wound healing. *Lasers in Surgery and Medicine* 2010, 42(6), 467-72.
- [152]- S. J. Guffey and J. Wilborn. In Vitro Bactericidal Effects of 405-nm and 470-nm Blue Light. *Photomed Laser Surg.* 2006, 24 (6), 680.
- [153]- S. Zilberg, Y. Haas. Conical intersections in molecular photochemistry – the role of phase change. *Chemical Physics* 200, 259 (2-3), 249 – 261.
- [154]- K. I. Ramachandran, G. Deepa, K. Namboori. *Computational Chemistry and Molecular Modeling: Principles and Applications*. Springer-Verlag Berlin Heidelberg 2008, pp. 53.
- [155]- F. S. Barnes, B. Greenebaum. *Bioengineering and Biophysical Aspects of Electromagnetic Fields*, CRC Press, New York 2006, pp.52.
- [156]- E. Clementi and S. Chin. *Structure and Dynamics of Nucleic Acids, Proteins, and Membranes*, Plenum Press (Book review, Volume 13), New York 1986, pp. 113.
- [157]- H. A. Scheraga. Conformational analysis of polypeptides and proteins for the study of protein folding, molecular recognition, and molecular design. *Journal of Protein Chemistry* 1987, 6, 61-80.
- [158]- R. E. Dickerson, M. L. Kopka and H. R. Drew. Structural correlations in B-DNA, in "Structure and Dynamics: Nucleic Acids and Proteins," E. Clementi and R.H. Sarma, eds., Adenine Press, New York 1983, pp. 149.
- [159]- K. C. Chou. The biological functions of low-frequency phonons (primary). *Scientia Sinica* 1977, 20 (4), 447–457.
- [160]- S. Brul, S. V. Gerwen and M. Zwietering. *Modeling Microbial Responses in Food*. CRC Press LLC, Boca Raton 2003, pp. 22.
- [161]- I. R. Booth. Stress and the single cell: Intrapopulation diversity is a mechanism to ensure survival upon exposure to stress. *International Journal of Food Microbiology* 2002, 78, 19-30.
- [162]- B. F. Brehm-Stecher, E. A. Johnson. *Single-Cell Microbiology: Tools, Technologies, and Applications*. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 2004, 68 (3), 538–559.
- [163]- I. S. Lee, J. L. Slonczewski, and J. W. Foster. A low-pH-inducible, stationary-phase acid tolerance response in *Salmonella typhimurium*. *Journal of Bacteriology* 1994, 176, 1422-1426.
- [164]- O. Cerf. Tailing of survival curves of bacterial spores, a review. *Journal of Applied Bacteriology* 1977, 42, 1-19.

- [165]- A. H. Geeraerd, C. H. Herremans, and J. F. V. Impe. Structural model requirements to describe microbial inactivation during a mild heat treatment. *International Journal of Food Microbiology* 2000, 59, 185-209.
- [166]- D. R. Heldman, and R. L. Newsome. Kinetic Models for Microbial Survival During Processing. *Food Technology* 2003, 57, 40-47.
- [167]- V. P. Valdramidis, A. H. Geeraerd, K. Bernaerts, F. Devlieghere, J. Debevere, and J. F. Van Impe. Accurate Modelling of Non-Loglinear Survival Curves. *Bulletin of the international dairy federation* 2004, 97-110.
- [168]- R. C. Whiting. Modeling bacterial survival in unfavorable environments. *Journal of Industrial Microbiology* 1993, 12, 240-246.
- [169]- R. C. Whiting, and R. L. Buchanan. A classification of models in predictive microbiology—a reply to K.R. Davey. *Food Microbiology* 1993, 10, 175-177.
- [170]- R. Xiong, G. Xie, A. E. Edmondson, and M. A. Sheard. A mathematical model for bacterial inactivation. *International Journal of Food Microbiology* 1999, 46, 45-55.
- [171]- D. D. Murphy, S. M. Rueter, J. Q. Trojanowski, and V. M.-Y. Lee. Synucleins Are Developmentally Expressed, and α -Synuclein Regulates the Size of the Presynaptic Vesicular Pool in Primary Hippocampal Neurons. *The Journal of Neuroscience* 2000, 20(9), 3214–3220.
- [172]- C. P. Gerba. Applied and theoretical aspects of virus adsorption to surfaces. *Advances in Applied Microbiology* 1984, 30, 133 - 168.
- [173]- C. P. Gerba, S. R. Farrah, S. M. Goyal, C. L. Wallis and J. L. Melnick, Concentration of enteroviruses from large volumes of tap water, treated sewage, and seawater. *Applied and Environmental Microbiology* 1978, 35(3), 540-548.
- [174]- C. Carbonnaux, M. Ries-Kautt and A. Ducruix. Relative effectiveness of various anions on the solubility of acidic *Hypoderma lineatum* collagenase at pH 7.2. *Protein Science* 1995, 4(10), 2123 - 2128.
- [175]- S. Finet, F. Skouri-Panet, M. Casselyn, F. Bonnete and A. Tardieu. The Hofmeister effect as seen by SAXS in protein solutions. *Current Opinion in Colloid and Interface Science* 2004, 9(1-2), 112-116.
- [176]- M. M. Ries-Kautt, and A. F. Ducruix. Relative effectiveness of various ions on the solubility and crystal growth of lysozyme. *Journal of Biological Chemistry* 1989, 264 (2), 745-748.
- [177]- R. Floyd. Viral aggregation: mixed suspensions of poliovirus and reovirus. *Applied and Environmental Microbiology* 1979, 38 (5), 980-986.
- [178]- R. Floyd, and D. G. Sharp. Viral aggregation: effects of salts on the aggregation of poliovirus and reovirus at low pH. *Applied and Environmental Microbiology* 1978 a, 35 (6), 1084-1094.
- [179]- R. Floyd, and D. G. Sharp. Aggregation of poliovirus and reovirus by dilution in water. *Applied and Environmental Microbiology* 1977, 33 (1), 159-167.
- [180]- J. Langlet, F. Gaboriaud, C. Gantzer, J. F. L. Duval. Impact of Chemical and Structural Anisotropy on the Electrophoretic Mobility of Spherical Soft Multilayer Particles: The Case of Bacteriophage MS2. *Biophysical Journal* 2008, 94 (8), 3293 – 3312.
- [181]- J. Langlet, F. Gaboriaud, J. F. L. Duval, C. Gantzer. Aggregation and surface properties of F-specific RNA phages: Implication for membrane filtration processes. *Water Research*, *Water Research* 2008, 42 (10–11), 2769 – 2777.
- [182]- J. Langlet, L. Ogorzaly, J.-C. Schrotter, C. Machinal, F. Gaboriaud, J. F. L. Duval and C. Gantzer. Efficiency of MS2 phage and Q β phage removal by membrane filtration in water treatment: applicability of real-time RT-PCR method, *Journal of Membrane Science*. *Journal of Membrane Science* 2009, 326, 111 - 116.

- [183]- J. Langlet, F. Gaboriaud, C. Gantzer. Effects of pH on plaque forming unit counts and aggregation of MS2 bacteriophage. *Journal of applied microbiology* 2007, 13, 1632-1638.
- [184]- C. P. Gerba, W. Q. Betancourt. Viral Aggregation: Impact on Virus Behavior in the Environment. *Environmental Science Technology* 2017, 51 (13), 7318 – 7325.
- [185]- F. Galdiero. Adenovirus aggregation and preservation in extracellular environment. *Archives of Virology* 1979, 59(1-2), 99 - 105.
- [186]- A. Sagrera, C. Cobaleda, S. Berger, M. J. Marcos, V. Shnyrov and E. Villar. Study of the influence of salt concentration on Newcastle disease virus matrix protein aggregation. *Biochemistry and Molecular Biology International* 1998, 46 (3), 429 - 435.
- [187]- S. Y. Lee, J. N. Culver and M. T. Harris. Effect of CuCl₂ concentration on the aggregation and mineralization of Tobacco mosaic virus biotemplate. *Journal of Colloid and Interface Science* 2006, 297(2), 554 - 560.
- [188]- S. A. Overman, D. M. Kristensen, P. Bondre, B. Hewitt and G. J. Thomas. Effects of virion and salt concentrations on the Raman signatures of filamentous phages fd, Pf1, Pf3, and PH75. *Biochemistry* 2004, 43(41), 13129 - 13136.
- [189]- L. Shi, G. Sanyal, A. Ni, Z. Luo, S. Doshna, B. Wang, T. L. Graham, N. Wang and D. B. Volkin. Stabilization of human papillomavirus virus-like particles by non-ionic surfactants. *Journal of Pharmaceutical Sciences* 2005, 94 (7), 1538-1551.
- [190]- V. N. Orlov, A. M. Arutyunyan, S. V. Kust, E. A. Litmanovich, V. A. Drachev and E. N. Dobrov. Macroscopic aggregation of tobacco mosaic virus coat protein. *Biochemistry* 2001, 66 (2), 154-162.
- [191]- A. Nedoluzhko and T. Douglas. Ordered association of tobacco mosaic virus in the presence of divalent metal ions. *Journal of inorganic biochemistry* 2001, 84 (3-4), 233-240.
- [192]- J. X. Tang, P. A. Janmey, A. Lyubartsev and L. Nordenskiöld. Metal ion-induced lateral aggregation of filamentous viruses fd and M13. *Biophysical Journal* 2002, 83(1), 566 - 581.
- [193]- P. A. Shields and S. R. Farrah. Influence of salts on electrostatic interactions between poliovirus and membrane filters. *Applied and Environmental Microbiology* 1983, 45(2), 526 – 531.
- [194]- T. Sigstam, G. Gannon, M. Cascella, B. M. Pecson, K. R. Wigginton and T. Kohn. Subtle differences in virus composition affect disinfection kinetics and mechanisms. *Applied and environmental microbiology* 2013, 79 (11), 3455 - 3467.
- [195]- M. J. Mattle, B. Crouzy, M. Brennecke, K. R. Wigginton, P. Perona and T. Kohn. Impact of virus aggregation on inactivation by peracetic acid and implications for other disinfectants. *Environmental science & technology* 2011, 45 (18), 7710 - 7717.
- [196]- A. P. Minton. Influence of excluded volume upon macromolecular structure and associations in “crowded” media. *Curr. Opin. Biotechnol.* 1997, 8, 65 – 69.
- [197]- A. P. Minton. Implications of macromolecular crowding for protein assembly. *Curr. Opin. Struct. Biol.* 2000, 10, 34 – 39.
- [198]- D. Homouz, M. Perham, A. Samiotakis, M. S. Cheung, P. Wittung-Stafshede. Crowded, cell-like environment induces shape changes in aspherical protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 2008, 105, 11754 – 11759.
- [199]- S. B. Zimmerman, A. P. Minton. Macromolecular crowding: Biochemical, biophysical, and physiological consequences. *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* 1993, 22, 27 – 65.
- [200]- A. P. Minton. Models for excluded volume interaction between an unfolded protein and rigid macromolecular cosolutes: Macromolecular crowding and protein stability revisited. *Biophys. Journal* 2005, 88, 971 – 985.

- [201]- I. M. Kuznetsova, K. K. Turoverov and V. N. Uversky. What Macromolecular Crowding Can Do to a Protein. *Int. J. Mol. Sci.* 2014, 15, 23090 - 23140.
- [202]- G. Rivas, J. A. Fernandez, and A. P. Minton. Direct Observation of the Self-Association of Dilute Proteins in the Presence of Inert Macromolecules at High Concentration via Tracer Sedimentation Equilibrium: Theory, Experiment, and Biological Significance, *Biochemistry*.1999, 38(29), 9379 - 9388.
- [203]- H.-X. Zhou, G. Rivas, and A. P. Minton. Confinement: Biochemical, Biophysical, and Potential Physiological Consequences. *Annu. Rev. Biophys.* 2008. 37,375 – 397.
- [204]- A. Philippe, G. E. Schaumann. Interactions of Dissolved Organic Matter with Natural and Engineered Inorganic Colloids: A Review, *Environmental Science & Technology*, 2014, 8946 – 8962.
- [205]- M. Baalousha. Aggregation and disaggregation of iron oxide nanoparticles: Influence of particle concentration, pH and natural organic matter. *Sci. Total Environ.* 2009, 407, 2093 – 2101.
- [206]- R. I. Labelle and C. P. Gerba. Influence of pH, Salinity, and Organic Matter on the Adsorption of Enteric Viruses to Estuarine Sediment. *Applied and Environmental Microbiology* 1979, 93 – 101.
- [207]- L. Cao, X. Liu, E.-J. D. Lin, C. Wang, E. Y. Choi, V. Riban, B. Lin, and M. J. During. Environmental and Genetic Activation of a Brain-Adipocyte BDNF/Leptin Axis Causes Cancer Remission and Inhibition. *Cell* 2010, 142, 52 – 64.
- [208]- J. Zhuang, Y. Jin. Interactions between viruses and goethite during saturated flow, Effects of solution pH, carbonate, and phosphate. *Journal of Contaminant Hydrology* 2008, 98, 15 – 21.
- [209]- C. Dika, J. F. L. Duval, H. M Ly-Chatain, C. Merlin, & C. Gantzer. Impact of internal RNA on aggregation and electrokinetics of viruses: comparison between MS2 phage and corresponding virus-like particles. *Applied and environmental microbiology*, 2011 77(14), 4939–48.
- [210]- C. Dika, M. H. Ly-Chatain, G. Francius, J. F. L. Duval & C. Gantzer. Non-DLVO adhesion of F-specificRNA bacteriophages to abiotic surfaces: Importance of surface roughness, hydrophobic and electrostatic interactions. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, 2013, 435, 178–187.
- [211]- J. R. Kanofsky. Singlet oxygen production by biological systems. *Chem.-Biol Interactions* 1989, 70, 1 – 28.
- [212]- J. F. Ward. The complexity of DNA damage: Relevance to biological consequences. *International Journal of Radiation Biology* 1994, 66, 427 – 432.
- [213]- F. Wilkinson, W. P. Helman and A. B. Ross. Rate constants for the decay and reactions of the lowest electronically excited state of molecular oxygen in solution an expanded and revised compilation. *Journal Phys. Chem. Ref. Data* 1995, 24, 663 – 1021.
- [214]- M. J. Davies. Reactive species formed on proteins exposed to singlet oxygen. *Photochem. Photobiol. Sci.* 2004, 3, 17 – 25.
- [215]- M. J. Davies et R. J. W. Truscott. Photo-oxidation of protein and its role in cataractogenesis. *Journal. Photochem. Photobiol. B* 2001, 63, 114 – 125.
- [216]- M. Gracanin, C. L. Hawkins, D. I. Pattison et M. J. Davies. Singlet-oxygenmediated amino acid and protein oxidation: Formation of tryptophan peroxides and decomposition products. *Free Rad. Biol. Med.* 2009, 47, 92 – 102.
- [217]- M. A. Sorolla, M. J. Rodriguez-Colman, N. Vall-Illaura, J. Tamarit, J. Ros et E. Cabisco. Protein oxidation in Huntington disease. *Biofactors* 2012, 38, 173 – 18.
- [218]- M. A. Sorolla, M. J. Rodriguez-Colman, J. Tamarit, Z. Ortega, J. J. Lucas, I. Ferrer, J. Ros et E. Cabisco. Protein oxidation in Huntington disease affects energy production and vitamin B6 metabolism. *Free Radic. Biol. Med.* 2010, 49, 612 – 621.

- [219]- D. A. Long. *The Raman Effect: A Unified Treatment of the Theory of Raman Scattering by Molecules*, John Wiley & Sons, New York 2002, pp. 85.
- [220]- C. F. Bohren, D. R. Huffman. *Absorption and Scattering of Light by Small Particles*, John Wiley & Sons, New York 1983, Ch. 4.
- [221]- B. D. Strycker, M. M. Springer, A. J. Traverso, A. A. Kolomenskii, G. W. Kattawar, and A. V. Sokolov. Femtosecond-laser-induced shockwaves in water generated at an air-water interface. *Optical Society of America* 2013, 21(20), 23772 – 23784.
- [222]- F. V. Potemkin, E. I. Mareev, A. A. Podshivalov and V. M. Gordienko. Laser control of filament-induced shock wave in water. *Laser Phys. Lett.* 2014, 11, 106001.
- [223]- A. Gomes, E. Fernandes, J. L. F. C. Lima. Fluorescence probes used for detection of reactive oxygen species. *Journal Biochem. Biophys. Methods* 2005, 65, 45 – 80.
- [224]- Y. Wei, Q. Chen, D. Xing, S. Luo, W. Xu. Quantitative Detection of Singlet Oxygen in PDT by Monitoring Chemiluminescence and Florescence of FCLA. *IEEE/ICME International Conference on Complex Medical Engineering* 2007.
- [225]- H. Yonghong, D. Xing, Y. Guihong, K.-I. Ueda. FCLA chemiluminescence from sonodynamic action in vitro and in vivo. *Cancer Letters* 2002, 182, 141 – 145.
- [226]- J. Zhou, D. Xing, Q. Chen. Enhancement of Fluoresceinyl Cypridina Luciferin Analog Chemiluminescence by Human Serum Albumin for Singlet Oxygen Detection. *Photochemistry and Photobiology* 2006, 82, 1058 – 1064.
- [227]- G. Zhang, X. Li, Huimin Ma, D. Zhang, J. Li and D. Zhu. A selective and sensitive chemiluminescence reaction of 4,4'(5')-bis[2-(9-anthryloxy)ethylthio]tetrathiafulvalene with singlet oxygen. *Chemical Communications* 2004 , 2072 – 2073.
- [228]- X. Li, G. Zhang, Huimin Ma, D. Zhang, J. Li, and D. Zhu. 4,5-Dimethylthio-4 ϕ -[2-(9-anthryloxy)ethylthio]tetrathiafulvalene, a Highly Selective and Sensitive Chemiluminescence Probe for Singlet Oxygen. *Journal American Chemical Society* 2004, 126, 11543 – 11548.
- [229]- D. Kingsley, R. Kuis, R. Perez, I. Basaldua, P. Burkins, A. Marcano and A. Johnson. Oxygen-dependent laser inactivation of murine norovirus using visible light lasers, *Journal Virology* 2018, 15, 117.