

n° ABph 137 174

No d'ordre :

UNIVERSITE DES SCIENCES ET TECHNIQUES DE LILLE FLANDRES ARTOIS

THESE

pour l'obtention du grade de

DOCTEUR EN BIOLOGIE ET PHYSIOLOGIE VEGETALES
option "MICROBIOLOGIE"

par

Pascal VANDEKERCKOVE

**POUVOIR ANTISEPTIQUE DE
CELLULOSES FONCTIONNALISEES PAR
DES AMMONIUMS QUATERNAIRES :
APPLICATIONS AU DEVELOPPEMENT
D'UN NOUVEAU "BIOTEXTILE"
A PROPRIETES ANTIMICROBIENNES**

- PARTIE GENERALE -



Présentée le 30 Octobre 1986 devant le Jury composé de :

Président : M. J. GUILLAUME, Professeur
Rapporteur : M. C. ROMOND, Professeur
Examineurs : M. R. TAILLIEZ, Professeur
M. J-C. CAZIN, Professeur
M. C. ROGUES, Directeur Technique Texunion
M. J. SAINGIER, Directeur de Recherche Texunion

REMERCIEMENTS

Ce travail a été réalisé au laboratoire de Microbiologie Appliquée de l'Université des Sciences et Techniques de Lille Flandres Artois, sous la direction de M. le Professeur GUILLAUME. Je tiens à lui exprimer ma sincère gratitude pour l'aide et les précieux conseils qu'il m'a prodigués.

Que M. le Professeur TAILLIEZ soit assuré de ma profonde reconnaissance pour la sollicitude constante avec laquelle il a suivi notre étude, sa disponibilité et son aide précieuse.

Toute ma reconnaissance va à M. CHRIST, Président Directeur Général de la FILATURE DE LA GOSSE ; son soutien et ses encouragements ont permis la réalisation de cette recherche.

Je remercie beaucoup M. le Professeur ROMOND pour l'honneur qu'il me fait en acceptant de juger ce travail et d'en être le rapporteur.

J'exprime ma profonde reconnaissance à M. le Professeur CAZIN pour sa contribution à ce présent travail et pour l'intérêt qu'il y porte en acceptant de le juger.

Je suis très heureux que M. SAINGIER, Directeur de Recherche de TEXUNION, ait accepté de se joindre au Jury de Thèse. Les judicieux conseils qu'il m'a donnés tout au long de cette étude m'ont toujours beaucoup éclairé.

Mes remerciements vont également à M. ROGUES, Directeur Technique de TEXUNION, qui a bien voulu examiner ce mémoire.

C'est pour moi un plaisant devoir que d'adresser mes vifs remerciements à M. OCHIN, qui m'a guidé tout au long de mes recherches et dont l'expérience et la compétence m'ont été très profitables.

C'est en toute amitié que mes remerciements vont à M. JOLY pour sa gentillesse, ses remarques pertinentes et l'intérêt bienveillant avec lequel il a suivi cette étude.

Je remercie également :

- M. le Professeur BERGOEND et le Docteur MARTIN, du Centre Hospitalier Régional de Lille, pour leur collaboration en matière d'allergologie.

- M. le Professeur GROSS de Nancy I, pour les entretiens fructueux que nous avons eu avec lui.

- M. le Professeur DHAINAUT (Lille I), qui nous a permis d'utiliser son service de microscopie électronique et M. DEREMAUX, son technicien.

- MM. PIAT et BOUILLIEZ, des Ets NEU, pour leur aide technique en matière de filtration d'air.

- Mme DURAND, de DMC PARIS, pour la sympathie qu'elle a témoigné à ce projet et son aide précieuse dans la recherche de documents techniques.

- L'ensemble du laboratoire de Microbiologie de Lille et ses sympathiques techniciens : M et Mme BECHET, Mme MARY et plus particulièrement M. DECQ, dont l'ingéniosité a souvent contribué à la qualité des résultats obtenus.

- J'associe, aussi, à ce travail les stagiaires qui y ont participé : I. DUPONT, M. DIOT, A. DELATTRE, A-M. RUDNIK et N. DENIS.

- Je désire enfin exprimer ma reconnaissance pour leur assistance et leur soutien moral à Marie-José, Marc, Nathalie, Armand, Ioannis, Martine et bien sur à toute ma famille, surtout Sylviane, pour leur patience et leurs encouragements.

A mes parents,
en témoignage d'affectueuse reconnaissance

TABLE DES MATIERES

<u>INTRODUCTION</u>	1
<u>PRESENTATION GENERALE DE DMC</u>	3
<u>GENERALITES</u>	4
AVANT PROPOS	4
I. LES AMMONIUMS QUATERNAIRES	6
1) Composition chimique	6
1.1) <u>Définition</u>	6
1.2) <u>Les ammoniums quaternaires antiseptiques</u>	8
2) <u>Activité antimicrobienne</u>	11
2.1) <u>L'analyse du pouvoir antiseptique</u>	11
2.2) <u>Le pouvoir antiseptique</u>	14
2.3) <u>Toxicologie des ammoniums quaternaires</u>	17
2.4) <u>Principales utilisations</u>	21

3) Mode d'action	23
3.1) <u>Structure chimique et pouvoir antimicrobien</u>	23
3.1.1) <u>Rôle de la chaîne aliphatique</u>	23
3.1.2) <u>Les agents de surface</u>	25
3.1.3) <u>Tensio-activité et pouvoir bactéricide</u>	29
3.1.4) <u>L'approche thermodynamique</u>	32
3.1.5) <u>Conclusions</u>	36
3.2) <u>Modification de la perméabilité membranaire</u>	37
3.3) <u>Interaction avec les lipides membranaires</u>	39
3.4) <u>Interaction avec les protéines enzymatiques</u>	41
3.5) <u>Conclusions</u>	44
4) La résistance aux ammoniums quaternaires	45
4.1) <u>Résistance adaptative</u>	45
4.2) <u>Résistance plasmidique</u>	49
4.3) <u>Autres types de résistance</u>	50
4.4) <u>Conclusions</u>	51
5) Facteurs physico-chimiques influençant le pouvoir antiseptique	52
5.1) <u>Influence de la température</u>	52
5.2) <u>Influence du pH</u>	53
5.3) <u>Antagonisme et synergie</u>	53
5.3.1) <u>Antagonisme</u>	53
5.3.2) <u>Synergie</u>	55
5.4) <u>Conclusions</u>	56

II. LES BIOTEXTILES	58
1) Le coton	58
1.1) <u>La production du coton</u>	58
1.2) <u>La structure du coton</u>	61
2) L'ennoblissement textile	61
2.1) <u>L'affinage du tissu écreu</u>	61
2.2) <u>Le finissage</u>	62
3) Les textiles antimicrobiens	64
3.1) <u>Textiles et microorganismes</u>	64
3.2) <u>Principes généraux sur les biotextiles</u>	66
3.3) <u>Les principaux types de biotextiles</u>	67
3.3.1) <u>Association par interactions polaires</u>	67
3.3.2) <u>Association par interactions ioniques</u>	69
3.3.3) <u>Association par complexation</u>	70
3.3.4) <u>Les textiles à bioactivité fixe</u>	71
3.3.5) <u>Conclusions</u>	72
4) Les méthodes d'étude du pouvoir antiseptique des biotextiles	72

<u>MATERIEL ET METHODES</u>	75
I. MATERIEL	75
1) Les souches microbiennes	75
1.1) <u>Les souches des tests d'activité antiseptique</u>	75
1.2) <u>Les champignons cellulolytiques</u>	77
2) Les sels d'ammoniums quaternaires	78
3) Les échantillons de textiles	78
II. LES METHODES DE DETERMINATION DES ACTIVITES ANTISEPTIQUES	80
1) La détermination des Concentrations Minimales Inhibitrices des sels libres	80
1.1) <u>Les milieux de culture</u>	80
1.2) <u>Le protocole expérimental</u>	81
2) L'étude de la stabilité chimique des sels	82
2.1) <u>Influence du traitement thermique</u>	83
2.2) <u>Influence du pH</u>	83
2.3) <u>Influence de la concentration en chlorure de sodium</u>	83
3) La méthode du contact agité	83
3.1) <u>Les milieux de culture</u>	84
3.2) <u>Le protocole expérimental</u>	84

4) La méthode A. A. T. C. C.	87
4.1) <u>Les milieux de culture</u>	87
4.2) <u>Le protocole expérimental</u>	87
4.3) <u>L'expression des résultats</u>	90
5) La méthode HOFFMAN, YEAGER & KAYES (1955)	92
5.1) <u>Les milieux de culture</u>	92
5.2) <u>Le protocole expérimental</u>	92
6) L'étude de l'aptitude des biotextiles à la filtration de l'air	93
6.1) <u>Les milieux de culture</u>	94
6.2) <u>Les protocoles expérimentaux</u>	94
6.2.1) <u>Filtration d'un aérosol</u>	94
6.2.2) <u>Filtration de poussières</u>	96
7) La filtration continue en circuit fermé	96
8) L'étude de la résistance des tissus à l'exposition aux agents cellulolytiques	98
8.1) <u>Principe de la norme NF X 41-600</u>	98
8.2) <u>Expression des résultats</u>	98
8.3) <u>Choix de quelques paramètres expérimentaux</u>	99
8.4) <u>Protocole expérimental</u>	99

III. LES METHODES D'ETUDE DU MODE D'ACTION	101
1) Mesure de l'activité β -galactosidasique	101
2) Mesure du relargage du phosphore inorganique	102
3) Détection des mutants LPS déficients	103
4) Les techniques de microscopie électronique	103
4.1) <u>La méthode de SIMMONS (1976)</u>	103
4.2) <u>La méthode de SEVIOUR (1984)</u>	104
IV. LES METHODES DE DOSAGE DES AMMONIUMS QUATERNAIRES	105
1) Dosage des sels en solution aqueuse par l'éosine jaunâtre	105
2) Dosage par les ions picrates	106
V. LES METHODES UTILISEES POUR LES TESTS DE TOXICOLOGIE	108
1) Détermination de l'Indice d'Irritation Primaire Cutanée	108
1.1) <u>La préparation des lapins</u>	108
1.2) <u>Lecture et expression des résultats</u>	108
2) Détermination de la tolérance cutanée aux applications itératives	109
2.1) <u>La préparation des lapins</u>	110
2.2) <u>Lecture des résultats</u>	110
3) Les patch-tests	110

<u>PRESENTATION DU TRAVAIL</u>	112
<u>RESULTATS</u>	114
I. ELABORATION ET CARACTERISATION DES BIOTEXTILES	114
1) La sélection des produits de fonctionnalisation	114
1.1) <u>Activité antiseptique des sels d'ammoniums quaternaires</u>	114
1.2) <u>Etude de la stabilité chimique des sels libres</u>	117
1.2.1) <u>Influence du traitement thermique</u>	117
1.2.2) <u>Influence du pH</u>	118
1.2.3) <u>Influence de la concentration en Chlorure de sodium</u>	119
1.3) <u>Etude toxicologique des meilleurs sels</u>	119
1.4) <u>Conclusions</u>	120
2) Le choix de la méthode de détermination du pouvoir antiseptique des celluloses fonctionnalisées	121
2.1) <u>Tests préliminaires</u>	121
2.2) <u>Comparaison entre la méthode du contact agité et la méthode A. A. T. C. C.</u>	123
2.3) <u>Conclusions</u>	129

3) Le pouvoir antiseptique des celluloses fonctionnalisées	129
3.1) <u>Activité antiseptique des sels fixés</u>	129
3.2) <u>Détermination de la charge en ammonium quaternaire</u>	131
3.3) <u>Détermination de l'activité antiseptique maximale</u>	134
3.4) <u>Mise en évidence du masquage des sites actifs</u>	136
4) L'étude toxicologique des tissus traités	138
4.1) <u>Détermination de l'Indice Irritation Primaire Cutanée</u>	138
4.2) <u>Etude de la tolérance cutanée aux applications itératives</u>	139
4.3) <u>Tests d'allergénicité</u>	139
5) Conclusions, choix des paramètres du biotextile	140
II. ACTIVITE ANTISEPTIQUE DES CELLULOSES FONCTIONNALISEES PAR UN SEL DE SYNTHESE INDUSTRIELLE	141
1) Spectre d'activité antimicrobienne des biotextiles	141
1.1) <u>Activité bactériostatique</u>	141
1.2) <u>Activité antifongique</u>	146

2) Activité antiseptique dans des conditions particulières	149
2.1) <u>Activité antiseptique de bourres de coton traitées</u>	149
2.2) <u>La filtration d'aérosol</u>	152
2.3) <u>Les filtres "autostériles"</u>	154
2.4) <u>La filtration des solutions de gélatine</u>	156
3) conclusions	157
III. ETUDE DU MODE D'ACTION DU BIOTEXTILE	158
1) Modifications de la perméabilité membranaire	159
1.1) <u>Relargage de phosphore inorganique</u>	159
1.2) <u>Modification de l'activité β-galactosidasique</u>	161
2) Importance de la paroi dans la résistance au biotextile	162
2.1) <u>Influence des ions Calcium et magnésium</u>	162
2.2) <u>Rôle des LPS dans la résistance au biotextile</u>	164
2.3) <u>Observations en microscopie électronique</u>	167

3) Influence de quelques facteurs physico-chimiques sur le pouvoir antiseptique	167
3.1) <u>Influence de la température</u>	167
3.2) <u>Influence du pH</u>	170
3.3) <u>Influence de la matière organique</u>	171
3.4) <u>Influence de l'ion accompagnateur</u>	173
3.5) <u>Influence des détergents non-ioniques</u>	176
3.6) <u>Influence de l'humidité relative de l'air</u>	180
4) Conclusions	184
<u>CONCLUSION ET DISCUSSION</u>	186
<u>BIBLIOGRAPHIE</u>	197

TABLE DES ABBREVIATIONS

AATCC	: American Association of Textile Chemists and Colorists
AFNOR	: Association Française de Normalisation
ANRT	: Agence Nationale de la Recherche Technique
ANVAR	: Agence Nationale de Valorisation de la Recherche
AOAC	: Association of Official Analytical Chemists
APHA	: American Public Health Association
Carb	: Carbénicilline
CCM	: Concentration Critique Micellaire
CHR	: Centre Hospitalier Régional de Lille
CIP	: Collection de l'Institut Pasteur
Clt	: Chlortétracycline
CMB	: Concentration minimale bactéricide
CMI	: Concentration Minimale Inhibitrice
CRTM	: Centre de Recherche Textile de Mulhouse
CTT	: Chlorure de Triphényl Trétrazolium
EDTA	: Ethylène Diamine Tétracétate
FDA	: Food and Drug Administration
Gen	: Gentamycine
HR	: Humidité Relative de l'air
ICMD	: Industrie Chimique Mulhouse Dornach
IIPC	: Indice d'Irritation Primaire Cutanée
Kan	: Kanamycine
LPS	: Lipopolysaccharide
meq.	: milliéquivalent
MMHN	: Mycothèque du Museum d'Histoire Naturelle
Neo	: Néomycine
OMS	: Organisation Mondiale de la Santé
Oxt	: Oxytétracycline
Pi	: Phosphore inorganique
Pip	: Acide pipémidique
SDS	: Sodium Dodécyl Sulfate
SM	: Solution Mère
Str	: Streptomycine
Suf	: Sulfamides
TGEA	: Tryptone Glucose Extract Agar
u.f.c.	: unité formant colonie
USP	: United States Pharmacopeia

TABLE DES FIGURES

Figure -1- : Influence de la longueur de la chaîne aliphatique sur le pouvoir antimicrobien d'acétates de 4-aminoquinolinium contre <u>Staphylococcus aureus</u>	24
Figure -2- : Représentation éclatée du chlorure de benzalkonium	25
Figure -3- : Formation des micelles en milieu aqueux	27
Figure -4- : Le pouvoir détergent	28
Figure -5- : Influence de la formation en micelles sur la concentration en ammoniums quaternaires libres	31
Figure -6- : Influence de la longueur de la chaîne aliphatique de l'iodure de N-alkyl pyridinium sur l'énergie d'activation apparente (E) du pouvoir bactéricide contre <u>Escherichia coli</u> K 12	35
Figure -7- : Relargage de constituants cytoplasmiques par <u>Escherichia coli</u> mis en présence de cétrimide	38
Figure -8- : Interaction du cétrimide avec la membrane cytoplasmique	41
Figure -9- : Les enveloppes membranaires des bactéries à Gram négatif	47
Figure -10- : Incidence des LPS de type R et de l'EDTA sur la perméabilité de la membrane externe aux molécules lipophiles	48
Figure -11- : Fibres longues et courtes (linters) de la graine de coton	60
Figure -12- : Coupe d'une fibre de coton	60
Figure -13- : Formule chimique de la cellulose	60

Figure -14- : Répartition des différentes solutions mères dans les plaques de microtitration	82
Figure -15- : Schéma de l'installation utilisée pour tester la filtration d'aérosols ou de poussières par les biotextiles	95
Figure -16- : Schéma du montage utilisé pour la filtration de solutions de gélatine en flux continu	97
Figure -17- : Dosage des ammoniums quaternaires fixés par les ions picrates	106
Figure -18- : Courbe de croissance d'une culture non agitée de <u>Staphylococcus aureus</u> en présence de tissu traité avec le sel 8	122
Figure -19- : Relargage de phosphore inorganique en présence de sel 6, de tissu traité à 15 g/kg, et de tissu non traité, par <u>Escherichia coli</u> CIP 7624	159
Figure -20- : Cinétique d'échange d'ions picrates entre un tissu chargé à 15 g/kg de coton (sel 6 _a) et une solution de picrate de potassium	173
Figure -21- : Influence de l'humidité relative de l'air sur l'activité antiseptique de tissus greffés par le sel 6 _a	181-183

TABLE DES TABLEAUX

Tableau -I- : Principaux ammoniums quaternaires	9
Tableau -II- : Principaux ammoniums quaternaires	10
Tableau -III- : Exemple de calcul du coefficient phénol ..	12
Tableau -IV- : Action inhibitrice <u>in vitro</u> de l'acétate de laurolinium vis-à-vis de diverses espèces microbiennes représentatives	15
Tableau -V- : Exemple de toxicité de quelques ammoniums quaternaires	19
Tableau -VI- : Relation entre la concentration minimale bactériostatique vis-à-vis de <u>Staphylococcus aureus</u> et le pouvoir tensio-actif	30
Tableau -VII- : Influence de la température et de la présence de matière organique sur le pouvoir bactéricide du chlorure de pyridinium	53
Tableau -VIII- : Classification de huit désinfectants en fonction de leur tolérance vis-à-vis de divers facteurs physico-chimiques	56
Tableau -IX- : Les principaux paramètres à considérer lors de l'évaluation du pouvoir antiseptique de surfaces dites "auto-stériles"	73
Tableau -X- : Souches microbiennes utilisées pour l'évaluation du pouvoir antiseptique	76
Tableau -XI- : Souches fongiques utilisées pour l'évaluation de la résistance aux agents cellulolytiques	77
Tableau -XII- : Détermination de l'activité antiseptique des biotextiles par la méthode du contact agité	86

Tableau -XIII- : Détermination de l'activité antiseptique des biotextiles par la méthode AATCC	88
Tableau -XIV- : Tableau des cotations	91
Tableau -XV- : Humidité Relative de l'air (H.R.) à 25°C dans les enceintes contenant des solutions salines sursaturées	93
Tableau -XVI- : Dosage du phosphore inorganique	102
Tableau -XVII- : Détermination des Concentrations Minimales Inhibitrices des sels libres vis-à-vis de <u>Staphylococcus aureus</u> CIP 7625	115
Tableau -XVIII- : Détermination des Concentrations Minimales Inhibitrices des sels libres vis-à-vis de plusieurs souches microbiennes	116
Tableau -XIX- : Influence d'un traitement thermique sur l'activité antiseptique des 10 meilleurs sels	117
Tableau -XX- : Influence du pH sur l'activité antiseptique des 10 meilleurs sels	118
Tableau -XXI- : Influence de la concentration en NaCl sur l'activité antiseptique des 10 meilleurs sels	119
Tableau -XXII- : Indice d'Irritation Primaire Cutanée des solution aqueuses des cinq meilleurs sels	120
Tableau -XXIII- : Détermination, par la méthode du contact agité, de l'activité antiseptique de celluloses greffées avec le sel no 8	124
Tableau -XXIV- : Détermination, par la méthode AATCC de l'activité antiseptique de celluloses greffées avec le sel no 8	125
Tableau -XXV- : Survie de <u>Staphylococcus aureus</u> CIP 7625 en tampon phosphate avec ou sans tissu	127
Tableau -XXVI- : Estimation de la précision des dénombrements (méthode AATCC)	128

Tableau -XXVII- : Activité antiseptique de celluloses fonctionnalisées par des sels d'ammoniums quaternaires ..	130
Tableau -XXVIII- : Influence de la charge en sel 36 sur le pouvoir antiseptique de celluloses fonctionnalisées ..	132
Tableau -XXIX- : Influence de la charge en sel 37 sur le pouvoir antiseptique de celluloses fonctionnalisées ..	133
Tableau -XXX- : Activité antiseptique de celluloses fonctionnalisées en fonction de la charge en ammoniums quaternaires et de la taille de l'inoculum	135
Tableau -XXXI- : Recouvrement de l'activité antiseptique de celluloses ayant été au contact avec des cellules bactériennes vivantes	137
Tableau -XXXII- : Indices d'Irritation Primaire Cutanée de celluloses fonctionnalisées à 15 g/kg de coton	138
Tableau -XXXIII- : Tests positifs de l'étude d'allergénicité (résultats de 2 patients atypiques)	140
Tableau -XXXIV- : Activité antiseptique de celluloses traitées à 15 g/kg de coton par différentes préparations de sel no 6, vis-à-vis de plusieurs souches de bactéries à Gram positif	142
Tableau -XXXV- : Activité antiseptique de celluloses traitées à 15 g/kg de coton par différentes préparations de sel no 6, vis-à-vis de plusieurs souches de bactéries à Gram négatif de la famille des <u>Enterobacteriaceae</u>	144
Tableau -XXXVI- : Activité antiseptique de celluloses traitées à 15 g/kg de coton par différentes préparations de sel no 6, vis-à-vis de plusieurs souches de bactéries à Gram négatif de la famille des <u>Pseudomonadaceae</u>	145
Tableau -XXXVII- : Activité antiseptique de celluloses traitées à 15 g/kg de coton par différentes préparations de sel no 6, vis-à-vis de <u>Candida albicans</u>	146
Tableau -XXXVIII- : Résistance de tissus traités et non traités à quelques champignons cellulolytiques	147

Tableau -XXXIX- : Résistance de tissus traités et non traités à l'attaque simultanée de 10 souches fongiques ..	148
Tableau -XL- : Activité antiseptique de bourres de coton traitées	151
Tableau -XLI- : Filtration d'un aérosol de bactéries par des tissus traités et non traités	153
Tableau -XLII- : Filtration d'un aérosol de bactéries par des bourres de coton traitées et non traitées	153
Tableau -XLIII- : Activité antiseptique de filtres de cellulose pure fonctionnalisée, vis-à-vis de cellules de <u>Bacillus species</u> desséchées par atomisation	155
Tableau -XLIV- : Filtration de gélatine sur celluloses fonctionnalisées : évolution de la population de <u>Bacillus thermophiles</u>	156
Tableau -XLV- : Activité β -galactosidasique en présence de sel 6, de tissu traité (sel 6) à 15 g/kg ou de tissu témoin, de cellules d' <u>Escherichia coli</u> CIP 7624	161
Tableau -XLVI- : Influence des ions Ca^{++} et Mg^{++} sur la résistance d' <u>Escherichia coli</u> et de <u>Staphylococcus aureus</u> au tissu traité	163
Tableau -XLVII- : Activité antiseptique du sel 6 ₃ fixé (15 g/kg de coton) et non fixé, vis-à-vis de diverses souches de <u>Pseudomonas aeruginosa</u> , en absence et en présence de LPS	166
Tableau -XLVIII- : Influence de la température sur le pouvoir antiseptique de tissu greffé à 15 g/kg de coton	169
Tableau -XLIX- : Influence du pH sur le pouvoir antiseptique de tissu greffé à 15 g/kg de coton	170
Tableau -L- : Influence de la matière organique sur le pouvoir antiseptique de tissu traité à 15 g/kg de coton	172

Tableau -LI- : Influence de l'ion accompagnateur sur le pouvoir antiseptique de tissu greffé à 15 g/kg de coton	175
Tableau -LII- : Influence du milieu de suspension des cellules sur l'activité antiseptique du biotextile greffé à raison de 15 g/kg de coton	177
Tableau -LIII- : Influence d'agents mouillants non-ioniques sur le pouvoir antiseptique de tissu greffé à 15 g/kg de coton	179

TABLE DES ILLUSTRATIONS

PHOTO -1- : Echantillons de tissu traité après trois semaines d'exposition à des champignons cellulolytiques	150
PHOTO -2- : Echantillons de tissu témoin après trois semaines d'exposition à des champignons cellulolytiques	150
PHOTO -3- : Cellule de <u>Staphylococcus aureus</u> après une heure de contact avec le tissu témoin	168
PHOTO -4- : Cellule de <u>Staphylococcus aureus</u> après une heure de contact avec le tissu traité	168
PHOTO -5- : Fibre cellulosique du tissu traité avant et après contact avec des cellules bactériennes	168

INTRODUCTION

Les travaux qui font l'objet de ce mémoire, sont la continuité des recherches entreprises par le groupe DMC sur la conception et la fabrication d'un textile antimicrobien basé sur le traitement du coton par des ammoniums quaternaires. L'initiative de recherche (projet "Textilyse") a été prise par M. CHRIST, Président Directeur Général de la Filature de La Gosse, et M. SAINGIER, Directeur de Recherche de Texunion.

Le procédé de fonctionnalisation de la cellulose de coton par les ammoniums quaternaires a été mis au point par M. JOLY à la Filature de La Gosse et à l'Université de NANCY I, dans le laboratoire de Chimie Organique III, sous la direction de M. le Professeur GROSS.

Nos travaux ont été effectués au laboratoire de Microbiologie Appliquée de l'Université des Sciences et Techniques de Lille Flandres Artois, sous la direction de M. le Professeur GUILLAUME et la responsabilité scientifique de M. le Professeur TAILLIEZ et de M. OCHIN. Le projet de recherche a fait l'objet d'un programme initial d'aide à l'innovation soutenu par l'Agence Nationale de Valorisation de la Recherche (ANVAR, dossier A-81-11-307-W). L'Agence Nationale de la Recherche Technique (ANRT) a également contribué à ce projet sous la forme d'une Convention Industrielle de Formation par la Recherche (dossier CIFRE 255/83).

L'aspect toxicologique des travaux de recherche a été pris en charge par le Laboratoire de Pharmacodynamie de la Faculté de Pharmacie, sous la direction de M. le Professeur CAZIN, expert auprès du Ministère de la Santé.

Les tests d'allergologie ont été menés au Centre Hospitalier Régional de Lille, au Service de Dermatologie de M. le Professeur BERGOEND, sous la direction scientifique du Docteur MARTIN.

Les essais de synthèse industrielle des sels d'ammoniums quaternaires ont été faits par ICMD (Industrie Chimique de Mulhouse Dornach).

Le Centre de Recherche Textile de Mulhouse a assuré les essais de traitements au stade pilote et la plupart des essais de lavages. Les usines DESCAMPS d'Erquinghem ont été le siège des essais de traitement au stade industriel.

Les entreprises NEU ont enfin participé à ce travail, en apportant leur aide technique pour les essais de filtration de l'air.

Ce travail a souvent été à l'interface de plusieurs disciplines. J'associe à ces travaux toutes les personnes des secteurs textile, chimie, microbiologie, médecine, pharmacie et génie industriel, qui ont participé au projet "Textilyse".

Ce mémoire est divisé en deux parties. La partie "générale" traite des performances obtenues avec le textile antimicrobien et de son mode d'action. Les aspects techniques du procédé de fonctionnalisation et certaines recherches, qui doivent faire l'objet d'une protection spéciale, sont réunis dans la partie "confidentielle". L'ensemble du projet est protégé par des accords de confidentialité de sorte que la soutenance du mémoire se fera à huis clos.

PRESENTATION DE DMC

Le groupe DOLLFUS-MIEG & Cie (société anonyme au capital de 195.534.900 F) représente une part importante de notre industrie textile. Ses activités offrent une grande diversité:

- Mercerie : DMC est l'un des leaders mondiaux des fils à coudre et à broder.

- Filés et tissus écrus (Ets GELIOT et LORIDANT).

- Tissés teints (TISSAGES ROANNAIS).

- Linge de maison : La marque DESCAMPS jouit dans ce domaine d'une notoriété internationale.

- Tissus imprimés : KBC (KOECHLIN BAUMGARTNER & Cie) et TEXUNION possèdent des collections dont les dessins sont sélectionnés dans le monde entier. Leader de l'impression en France, TEXUNION répond à l'essentiel des besoins en matière de tissus (habillement, ameublement).

- Tissus industriels (Ets A. HUET), fils et accessoires pour l'industrie (FILATURE DE LA GOSSE). Très connue dans la profession pour la qualité de ses fils spéciaux (velours, voile, corespun...), la FILATURE DE LA GOSSE occupe une place importante. Elle s'est progressivement imposée comme unité de recherche et d'expérimentation du groupe.

En 1985, DMC améliorait ses bénéfices nets de 80 %. Sous l'impulsion de son Président Directeur Général, M. Julien CHARLIER, la stratégie du groupe est désormais orientée vers la croissance du chiffre d'affaire et du résultat. L'ambition du groupe est de devenir le no 1 de l'industrie textile en Europe.

GENERALITES

AVANT PROPOS

L'apparition d'un nombre croissant d'articles textiles doués de propriétés biologiques est à l'origine du mot "biotextile". On regroupe sous ce terme l'ensemble des matériaux textiles susceptibles d'interférer d'une façon active avec un milieu biologique. Parmi les principales propriétés bioactives, on compte le pouvoir antiseptique et le pouvoir cicatrisant. Certains supports textiles peuvent également servir à l'immobilisation de cellules ou d'enzymes, dans le cadre d'applications biotechnologiques.

Les textiles antimicrobiens constituent, de loin, le plus important groupe de biotextiles. La création de ce type de tissu procède d'un intérêt évident car leur domaine d'application est vaste. Utilisés à grande échelle, ils peuvent apporter une amélioration considérable des conditions d'hygiène par leur action prophylactique. L'enjeu commercial est très important. Ainsi, les biotextiles peuvent servir à la fabrication de linges autostériles (draps, champs opératoires, blouses, gants, pansements ...etc), qui seraient très utiles dans les milieux hospitaliers pour diminuer les risques de contamination. Cette utilisation peut être étendue aux linges de collectivités (restaurants, cantines, hôtels, Armée ...etc) ou à toute autre activité nécessitant des conditions sanitaires strictes (laboratoires pharmaceutiques ou industries agro-alimentaires). Sous forme de sous-vêtements, ils éviteraient la dégradation bactérienne de la sueur et les mauvaises odeurs qu'elle engendre (MAC NEIL 1963). Pour l'armée, un tel système serait utile dans le cadre de la protection N.B.C. (Nucléaire Biologique Chimique).

D'autres applications sont à envisager comme la protection des fibres textiles elles-mêmes contre l'action de divers agents biologiques. Les revêtements muraux, les moquettes, les tentes seraient ainsi protégés du pourrissement dû aux champignons et des déprédations causées par certains insectes. Ce problème est parfois posé lors du stockage même des produits manufacturés.

L'assainissement de l'eau sans adjonction de produits désinfectants solubles offre également beaucoup d'intérêt (piscines, eaux de qualité alimentaire). Celui de l'air permet de combattre les risques épidémiologiques dus à la formation d'aérosols chargés de germes pathogènes dans les gaines d'aération (HURST 1958).

Les quelques exemples, que nous venons d'énumérer, indiquent l'ampleur du marché potentiel. Au cours de ces dernières décennies, de nombreux procédés de fabrication de tissus antiseptiques ont vu le jour. Ces tissus présentent, en général, trois défauts majeurs : prix de revient trop élevé, spectre d'action germicide trop étroit et, surtout, labilité du traitement antimicrobien qui ne résiste pas aux lavages. La réalisation d'un biotextile, capable d'opérer dans toutes les situations que nous avons décrites, suppose l'association d'un tissu avec un antiseptique qui doit présenter deux caractéristiques essentielles : un pouvoir germicide à faible dose et une toxicité minime pour l'homme.

Les ammoniums quaternaires peuvent remplir ces conditions, c'est pourquoi ils ont été choisis pour la fabrication du biotextile qui fait l'objet de la présente étude. Leurs principales qualités sont, comme nous le verrons ultérieurement :

- * Un large spectre d'action germicide.
- * Une activité à faible concentration qui est rémanente et rapide.
- * Une faible toxicité cutanée aux concentrations utiles.
- * Un faible prix de revient à la synthèse.

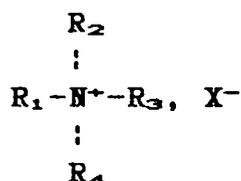
Ces généralités ont pour but de familiariser le lecteur avec les ammoniums quaternaires, leur nature et leur mode d'action dont dépendra celui du biotextile. Nous aborderons ensuite le coton, qui est la matière première de notre textile antimicrobien, et les différentes techniques d'ennoblissement textile. Nous verrons enfin quels sont les différents types de textiles antimicrobiens, leurs avantages et leurs inconvénients. Nous terminerons en situant rapidement le biotextile, que nous avons étudié, parmi les autres produits présents sur le marché.

I. LES AMMONIUMS QUATERNAIRES

1) Composition chimique

1.1) Définition

Sous le terme générique d'ammonium quaternaire, on regroupe les molécules qui possèdent un atome d'azote entièrement substitué par quatre radicaux. Au départ, cette définition était limitée aux seuls radicaux organiques, reliés à l'atome d'azote par une liaison de type C-N. Cependant, avec l'apparitions de molécules possédant des radicaux de plus en plus complexes et variés, la dénomination d'ammonium quaternaire a été étendue aux composés dont au moins un atome d'azote est entièrement substitué par des radicaux autres que l'atome d'hydrogène (Chemical Abstract - Index guide). La formule générale d'un ammonium quaternaire est donc la suivante :



Les radicaux R_1 , R_2 , R_3 et R_4 sont des groupements organiques qui peuvent être tous différents, substitués ou non, saturés ou insaturés, aliphatiques ou aromatiques, branchés ou non branchés. L'atome d'azote, parfois inclus dans un hétérocycle, est pentavalent : Quatre liaisons de covalence et une liaison électrostatique. Les ammoniums quaternaires sont généralement obtenus par alkylation d'une amine tertiaire. L'ion X^- , qui neutralise la charge positive, est amené par l'agent de quaternisation. Cet anion, appelé contre-ion ou ion accompagnateur, est souvent minéral (chlorure, bromure ou iodure) ; parfois il est organique (acétate).

En ce qui concerne leur nomenclature, les ammoniums quaternaires sont considérés comme des dérivés, entièrement substitués, de composés aminés.

Les ammoniums quaternaires sont nommés en fonction de l'amine dont ils sont issus ; il s'agit, dans la grande majorité des cas, d'une amine tertiaire. Le suffixe -ium est employé pour les caractériser et des expressions comme pyridinium ou quinolinium sont alors utilisées pour définir les ammoniums quaternaires dérivés de la pyridine ou de la quinoléine (ex : chlorure d'hexadécyl pyridinium). Les radicaux sont cités soit par ordre alphabétique, sans tenir compte des préfixes numérateurs (di-, tri-...etc), soit par ordre de complexité croissante. Ainsi les dénominations chlorure d'éthyl hexadécyl diméthyl ammonium et chlorure d'hexadécyl éthyl diméthyl ammonium sont toutes deux correctes. La citation des radicaux par ordre alphabétique est la forme la plus largement utilisée (Chemical Abstract - Index Guide). L'attachement des radicaux à l'azote est parfois indiqué par le symbole "N" : Bromure de N-benzyl N-dodécyl N,N-diméthyl ammonium. Les produits industriels sont fabriqués à partir d'huiles d'origine végétale (huile de coco), animale (suif) ou pétrolière. Ces huiles ne sont pas purifiées totalement et sont constituées d'un mélange d'acides gras de différents poids moléculaires. Le suif est par exemple essentiellement composé d'acides gras insaturés à 18 atomes de carbone (44 %) et d'acides gras saturés à 16 et 18 atomes de carbone (respectivement 29 et 21 %). Les ammoniums quaternaires obtenus à partir de ces huiles ont donc des chaînes aliphatiques différentes. Les anglo-saxons caractérisent ces produits impurs en stipulant la source de corps gras dans la dénomination finale. Nous trouverons donc dans la littérature des termes comme chlorure de cocobenzyl diméthyl ammonium ou triméthyl tallow ammonium (tallow -> suif).

Parmi les ammoniums quaternaires, on compte de nombreuses molécules biologiquement actives telles que la vitamine B1 (thiamine), la bétaïne et ses dérivés (végétaux), la choline, l'acétylcholine et diverses drogues utilisées dans la pharmacopée moderne (antispasmodiques, hypotenseurs, analgésiques...etc). Enfin il existe de nombreux composés utilisés dans la désinfection (détergents, conservateurs, talcs et crèmes pour la peau...etc), qui nous intéressent plus particulièrement.

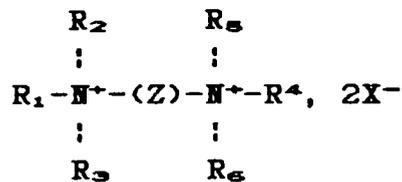
1.2) Les ammoniums quaternaires antiseptiques

Les ammoniums quaternaires antiseptiques possèdent tous au moins un radical aliphatique ou une partie hydrophobe. Nous reviendrons, dans l'étude de leur mode d'action, sur cette caractéristique importante. Les antiseptiques peuvent être séparés en quatre groupes. Nous avons rassemblé dans les tableaux -I- et -II- les plus représentatifs et les plus connus d'entre-eux.

Les composés directement issus de l'alkylation d'une amine tertiaire simple par un acide gras organique, sont à la fois les ammoniums quaternaires les plus faciles à synthétiser et les plus couramment utilisés. On peut citer le bromure de N-cétyl N,N,N-triméthyl ammonium (cétrimide), le chlorure de N-alkyl N-benzyl N,N-diméthyl ammonium (benzalkonium), le bromure de N-dodécyl N-2[phénoxy]éthyl N,N-diméthyl ammonium (bromure de domiphène) parmi les monoalkyl ammoniums et le chlorure de N-dodécyl N,N-diméthyl N-octyl ammonium (BTC 812) parmi les dialkyl ammoniums.

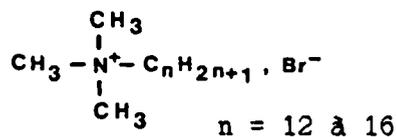
Les molécules dérivées d'une amine hétérocyclique forment un second groupe. Les valences de l'ammonium, non impliquées dans l'hétérocycle, sont occupées par au moins une chaîne aliphatique. Le chlorure de N-hexadécyl pyridinium et l'acétate de N-lauryl 4-aminoquinaldinium sont les plus connus. Les molécules de ce groupe peuvent être très complexes comme, par exemple, les ammoniums quaternaires stéroïdiens (SMITH 1964).

Il existe également des di-ammoniums quaternaires de formule générale :



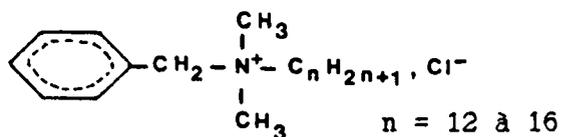
Z est une chaîne carbonée hydrophobe

Cétrimide :



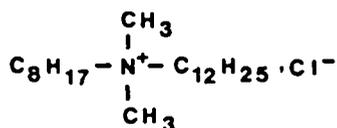
bromure de N-cétyl
N,N,N-triméthyl ammonium

Chlorure de benzalkonium :



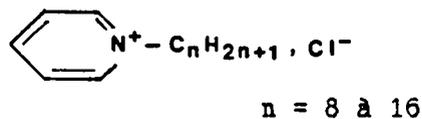
chlorure de N-alkyl N-benzyl
N,N-diméthyl ammonium

BTC 812 :



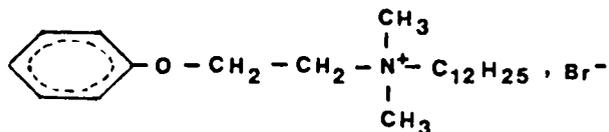
chlorure de N-dodécyl
N,N-diméthyl N-octyl ammonium

Chlorure de pyridinium :



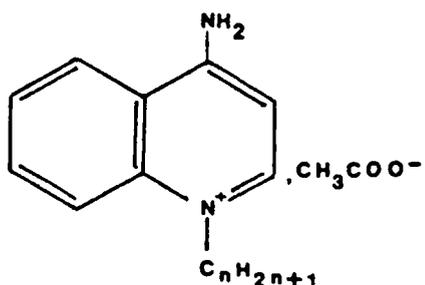
chlorure de N-alkyl pyridinium

Bromure de domiphène :



Bromure de N-dodécyl N-2(phénoxy)éthyl N,N-diméthyl ammonium

Tableau -I- : Principaux ammoniums quaternaires



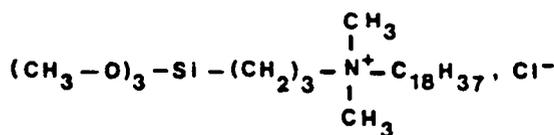
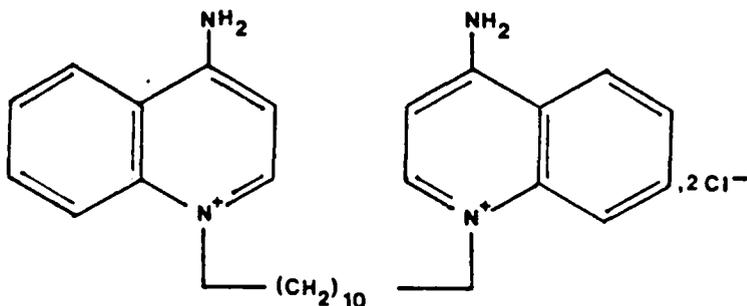
Quinaldinium :

Acétate de N-cétyl 4-aminoquinaldinium

n = 12 à 18

Déqualinium :

Chlorure de N,N'-déca-méthylène bis-(2-méthyl-4-amino) quinaldinium



Chlorure de N,N-diméthyl N-octadécyl N-(3-triméthoxysilyl)propyl ammonium (EUDY 1981)

Poly-(alkyl diméthyl (vinyl benzyl) ammoniums

(IKEDA 1983)

n = 2 à 12

m = 2 à 8

X⁻ = Cl⁻ ou Br⁻

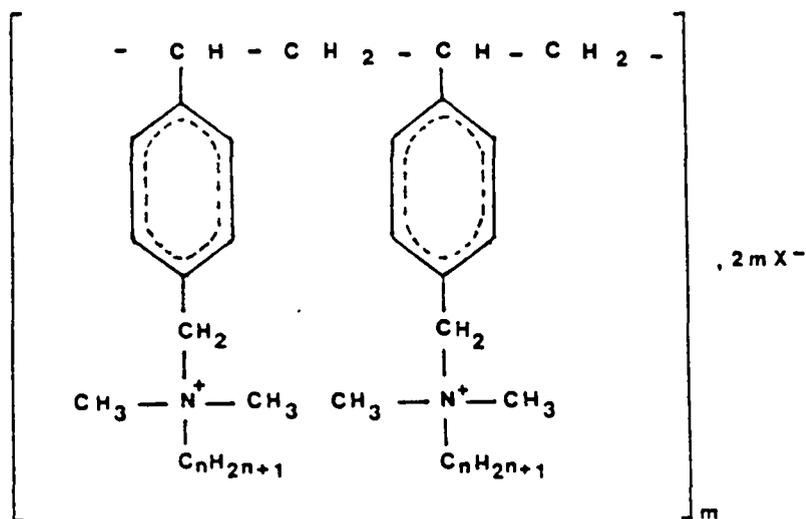


Tableau -II- : Principaux ammoniums quaternaires

Ces composés se distinguent notamment par une bonne activité antifongique comme le chlorure de N,N'-décaméthylène bis-[2-méthyl 4-aminolquinaldinium (chlorure de déqualinium).

La synthèse d'ammoniums quaternaires organosiliconés fait depuis peu l'objet de nombreux brevets (EUDY 1981, ISQUITH 1983, TOYOBO 1984a, SHIGITA 1985a). En tableau -II-, nous citons pour exemple le chlorure de N,N-diméthyl N-octadécyl N-(3-triméthoxysilyl-propyl) ammonium.

Enfin, on peut trouver des composés de haut poids moléculaire formés par la polymérisation de plusieurs ammoniums quaternaires. La commercialisation de ces molécules, souvent regroupées sous le terme de polycations, est encore faible. Les poly-[chlorure d'alkyl-diméthyl(vinylbenzyl) ammoniums (IKEDA 1983) ou les poly-[vinylpyridiniums (LONGLEY 1970) semblent offrir des débouchés intéressants. Parmi cette catégorie de molécules, se trouvent certains biotextiles que nous évoquerons ultérieurement.

2) Activité antimicrobienne

2.1) L'analyse du pouvoir antiseptique

Les méthodes de détermination du pouvoir antiseptique font en général l'objet de normes officielles qui réglementent le protocole expérimental et définissent les souches microbiennes de référence. Les principales méthodes sont le calcul du coefficient phénol et celui de la dilution stérilisante utile qui en découle, la détermination de la Concentration Minimale Bactéricide (C.M.B.) et de la Concentration Minimale Inhibitrice (C.M.I.).

La méthode des coefficients phénol a été développée par l'Association of Official Analytical Chemist (A.O.A.C. 1970). Le principe consiste à comparer le pouvoir stérilisant d'une solution de 5 % de phénol avec une solution de 1 % du produit que l'on veut tester. A partir de chacune de ces deux solutions mères, on effectue plusieurs dilutions. on sélectionne, ensuite, la plus grande dilution qui permet la destruction d'une suspension bactérienne en dix minutes.

Un exemple est donné dans le tableau -III- (revivification +, pas de revivification des cellules 0). Le coefficient phénol sera, dans cet exemple, égal à $350/90 = 3.89$ soit 3,9. La norme NF T 72-160 de l'Association Française de Normalisation (AFNOR 1977a), qui correspond à cette méthode, ne prévoit pas l'utilisation de phénol ou de tout autre désinfectant de référence. Elle consiste à évaluer la concentration minimale à laquelle le germicide est capable de réduire d'au moins 10^5 fois le nombre de cellules vivantes en cinq minutes de contact.

La dilution stérilisante utile est évaluée en faisant une simulation de stérilisation de surface suivant un protocole proche de la méthode des coefficients phénol. Pour ce faire, on utilise des cylindres en acier inoxydable, qui sont contaminés par une suspension bactérienne, séchés et plongés dans différentes dilutions de l'antiseptique à tester. La dilution stérilisante utile est la plus grande dilution capable de décontaminer totalement un cylindre en 10 minutes (A.O.A.C. 1970). La norme française équivalente est celle dite des porte-germes (Norme NF T 72-161, AFNOR 1977b).

Dilution	5 min	10 min	15 min
Désinfectant (Y) :			
1/300	0	0	0
1/325	+	0	0
1/350	+	0	0
1/375	+	+	0
1/400	+	+	+
Phénol :			
1/90	+	0	0
1/100	+	+	+

Tableau -III- : Exemple de calcul du coefficient phénol

La C.M.I. peut être définie comme la plus petite concentration en antiseptique capable d'inhiber la multiplication d'une suspension connue de bactéries placées dans des conditions optimales de croissance. La lecture des résultats se fait après 24-48 heures d'incubation. Cette méthode est très utile lorsqu'il est nécessaire de comparer rapidement un grand nombre de produits entre-eux (U.S. PHARMACOPEIA 1980, KHANAKA 1981). Le système des disques antibiogrammes est une adaptation pratique de cette méthode qui peut être également automatisée (STANECK 1985). Une C.M.B. en 24-48 heures peut être déterminée en vérifiant l'absence de formes revivifiables par repiquage sur des milieux neufs.

Les méthodes de porte-germes offrent l'avantage d'une meilleure approche des conditions réelles de la stérilisation par rapport aux méthodes utilisant des suspensions bactériennes. Ces dernières méthodes ont souvent fait l'objet de critiques qui portent sur les conditions trop artificielles de l'expérimentation. MAC CULLOCH (1947) a trouvé inadéquate la méthode des coefficients phénol pour déterminer la valeur antiseptique des ammoniums quaternaires. Plus récemment, GELINAS (1983a) et NICKEL (1985) ont constaté que la bactérie Pseudomonas aeruginosa est 10 fois plus résistante aux antiseptiques et aux antibiotiques lorsqu'elle a colonisé des surfaces solides. Les résistances, évaluées par C.M.I., de la bactérie sont ainsi sous-estimées gravement. PETROCCI (1977) estime qu'une partie des résultats erronés est due à l'utilisation de neutralisants inadéquats. Les neutralisants sont des substances qui inhibent l'action des germicides au terme des temps de contact dans les méthodes type coefficient phénol et porte-germes. Leur choix est donc primordial et fait encore l'objet d'études importantes (REYBROUCK 1979). Les principaux inactivateurs prévus par les normes, en ce qui concerne les ammoniums quaternaires, sont la lécithine, le jaune d'oeuf, le polysorbate 80 (Tween 80) et le thiosulfate de sodium.

Les différentes normes, que nous venons de voir, doivent être prises à leur juste valeur. L'évaluation du pouvoir antiseptique in vitro se fait dans des conditions standard que l'on rencontre rarement en analyse de routine. Les organisations officielles préconisent l'utilisation de plusieurs méthodes pour évaluer le pouvoir antiseptique d'une nouvelle molécule.

Il existe également des protocoles expérimentaux pour les cas particuliers (pouvoir tuberculocide, sporicide, virucide). In vivo, de nombreux facteurs peuvent modifier le pouvoir antimicrobien et l'utilisateur doit avoir à l'esprit qu'un composé peut être rendu rapidement inefficace par les fluides biologiques (GUMP 1982). Les systèmes qui pourraient permettre une étude directe in vivo, telles la bioluminescence (JOHNSTON 1976, BECKERS 1985) ou la microcalorimétrie (ERIKSSON 1973), n'ont pas une sensibilité suffisante. Les méthodes d'étude de la flore cutanée, qui servent actuellement à tester in vivo l'action des antiseptiques, consistent à employer une solution de détergent doux pour détacher les bactéries de la peau. Les techniques de WILLIAMSON (1965) et de ENGLELY (1970) sont applicables à l'homme. Celle développée par BOURLIOUX (1983 & 1985) est plus précise mais nécessite le sacrifice des animaux d'expérience. La valeur des résultats est, pour ces techniques, tributaire du pourcentage de bactéries vivantes récupérées et du risque de sélection d'une flore particulière.

En résumé, dans l'expression des résultats d'évaluation du pouvoir antimicrobien, il faut préciser pour chaque essai le nombre de germes éliminés (ou survivants) en fonction du temps, de la quantité d'antiseptique utilisée et tenir compte de la population microbienne initiale. Il convient de vérifier l'efficacité des neutralisants et la nature du pouvoir désinfectant (inhibition ou mort des cellules). L'incidence de substances inhibitrices (sang, pus, sérosités... etc) doit être évaluée. De nombreuses autres études peuvent être ajoutées comme l'influence du pH, de la température ou même du milieu de culture des bactéries avant ou pendant le test (AL-HITI 1980).

2.2) Le pouvoir antiseptique

Les propriétés antiseptiques des ammoniums quaternaires s'exercent sur la majeure partie des microorganismes. D'ARCY (1971) a par exemple rapporté l'activité de l'acétate de laurolinium sur des bactéries à Gram positif et à Gram négatif, sur des levures, des moisissures, des actinomycètes et enfin sur quelques protozoaires et mycoplasmes (Tableau -IV-). Ce spectre d'action est caractéristique et représentatif du pouvoir germicide des ammoniums quaternaires. On peut y ajouter une activité virucide, algicide et même insecticide.

Microorganismes	C.M.I. après 24h ou plus (µg/ml)
<u>Bactéries à Gram positif</u>	
Bacillus megaterium	1.7
Bacillus subtilis	0.2
Clostridium welchii	2.5 (48h)
Corynebacterium ovis	6.2
Diplococcus pneumoniae	1.5
Lactobacillus acidophilus	2.2
Lactobacillus brevis	6.25
Sarcina lutea	0.1
Staphylococcus aureus	0.15
Staphylococcus saprophyticus	0.2
Streptococcus agalactiae	0.4
Streptococcus faecalis	1.5
Streptococcus pyogenes	3.1
Streptococcus viridans	0.35
<u>Bactéries à Gram négatif</u>	
Brucella abortus	3.1 (48h)
Escherichia coli	8.8
Haemophilus influenzae	12.5
Klebsiella pneumoniae	17.7
Moraxella bovis	6.2
Proteus vulgaris	>100.0
Pseudomonas aeruginosa	50.0
Salmonella dublin	8.8
Salmonella typhi	1.56
Salmonella typhimurium	12.5
Shigella flexneri	1.56
<u>Actinomycètes</u>	
Actinomyces bovis	>50.0
Dermatophilus dermatonomus	0.5
<u>Champignons et levures</u>	
Candida albicans	1.25 (3 jours)
Microsporium audouini	0.5 (7 jours)
Microsporium canis	6.25 (7 jours)
Saccharomyces cerevisiae	8.8 (3 jours)
Trichophyton mentagrophytes	5.0
<u>Protozoaires</u>	
Trichomonas vaginalis	15.0 (48h)
Mycoplasma hominis	50.0

TABLEAU -IV- : Action Inhibitrice in vitro de l'acétate de Laurolinium vis-à-vis de diverses espèces microbiennes représentatives (D'après D'ARCY 1971)

C'est DOMAGK en 1935 qui, pour la première fois, a recommandé l'utilisation d'un ammonium quaternaire pour la désinfection. Comme on peut le voir sur le tableau -IV-, l'activité bactéricide est intense à des concentrations faibles de l'ordre du $\mu\text{g/ml}$. En étudiant le pouvoir bactéricide du chlorure de benzalkonium (ou Zéphiran), DOMAGK constate que les bactéries à Gram positif sont plus sensibles que les bactéries à Gram négatif. Cette particularité peut être généralisée à tous les autres ammoniums quaternaires. Les publications récentes, portant sur des nouvelles catégories de composés, confirment ce fait (EUDY 1981, PERNAK 1985a). Les Concentrations Minimales Inhibitrices (C.M.I) des bactéries à Gram négatif sont en moyenne dix fois plus élevées que celles des bactéries à Gram positif. Les bactéries du genre Pseudomonas peuvent présenter des formes adaptées très résistantes aux ammoniums quaternaires (GEFTIC 1979). Pseudomonas aeruginosa est connu pour sa résistance aux antiseptiques et aux ammoniums quaternaires en particulier. Le chlorure de benzalkonium a toutefois été utilisé avec succès contre cette bactérie en ophtalmologie (BROWN 1971). Le groupe des Mycobactéries compte les espèces les plus résistantes aux ammoniums quaternaires, en particulier Mycobacterium tuberculosis. Cette résistance est d'ailleurs mise à profit pour isoler les Mycobactéries pathogènes des crachats (FRUCHART 1974) ou de l'eau (BROOKS 1984). Les espèces saprophytes ont une sensibilité équivalente à celle des bactéries à Gram négatif.

Les ammoniums quaternaires sont plus sporostatiques que sporicides. Il n'agiraient qu'au moment de la germination de la spore (PARKER 1969). Leur action est grandement facilitée par les pH alcalins. La dilution stérilisante utile pour inhiber la plupart des spores bactériennes varie de 1/2.500 à 1/6.000 contre 1/80.000 à 1/30.000 pour détruire les formes végétatives (LAWRENCE 1970). Les spores de champignons sont également sensibles comme celles de Trichophyton interdigitale inhibées avec 1/5000 de bromure de N-dodécyl N, N-diméthyl N-octyl ammonium (PETROCCI 1977).

L'activité antifongique est importante tant sur les levures que sur les champignons mycéliens. Le déqualinium est notamment très actif sur Candida albicans avec des C.M.I. variant entre 0,63 et 5 $\mu\text{g/ml}$ (D'ARCY 1971). Le cétrimide, l'hédaquinium et le chlorure de benzalkonium ont été utilisés avec succès contre les dermatophytes pathogènes, notamment dans des infections moniliales.

Les champignons cellulolytiques sont aussi très sensibles. La croissance de Trichoderma viride et d' Aspergillus niger est par exemple inhibée par la présence de 20 ppm de chlorure de cocobenzyldiméthylammonium (PETROCCI 1977).

Le pouvoir virucide des ammoniums quaternaires a longtemps été mis en doute. Certains ont même été recommandés pour la préparation de suspensions virales indemnes de bactéries (STUART 1950). Cependant, ARMSTRONG (1964) a pu montrer que les seuls virus sensibles possèdent dans leur capsidie des constituants lipidiques. Par exemple, les picornavirus qui n'en possèdent pas sont résistants tandis que les myxovirus (Influenza) sont détruits en 10 minutes par une solution de 25 µg/ml de chlorure de benzalkonium. Ce dernier est considéré comme un agent désinfectant efficace contre le virus de la Rage (LAWRENCE 1970) ou certains virus phytopathogènes (STOLZ 1965).

Les ammoniums quaternaires ont été utilisés avec succès contre les protozoaires. LAWRENCE (1970) a décrit la très grande activité du chlorure de benzalkonium vis-à-vis de Trichomonas foetus et divers trypanosomes. Contre Trichomonas vaginalis, la dilution stérilisante utile est de l'ordre de 1/30.000.

Certains auteurs ont décrit la très grande sensibilité d'algues comme Chlorella vulgaris aux ammoniums quaternaires. 0,2 à 3 ppm suffisent à les éliminer (HUECK 1966). Cette extrême sensibilité pose d'ailleurs des problèmes écologiques graves de pollution des rivières (HUBER 1985). Contre les insectes, certaines applications sont possibles comme celle du chlorure de tricapril méthyl ammonium dont les solutions de 0,5 à 0,9 % protègent la laine des mites et des cafards (TOLGYESI 1971, Mc LAREN 1984). L'utilisation de certaines formules contre les larves de moustiques est fortement limitée du fait de leur grande toxicité vis-à-vis des algues et des poissons.

2.3) Toxicologie des ammoniums quaternaires

En toxicologie, les principales études portent sur la toxicité aiguë et chronique des substances ainsi que leur pouvoir irritant et allergène.

La DL50 définit la dose, exprimée en ppm (mg de produit par kg de poids vif), qui provoque la mort de 50 % des animaux d'expérimentation qui y sont soumis. Plus la DL50 est faible, plus la toxicité est grande. Les essais durent de 1 à 7 jours. En injection intraveineuse ou péritonéale, la DL50 des ammoniums quaternaires aliphatiques est de l'ordre de 15 à 40 mg/kg chez le rat (tableau -V-). Par voie orale, les DL50 sont de 10 à 20 fois supérieures, à savoir 200 à 300 mg/kg en 24 heures, jusque 700 à 900 mg/kg en 7 jours (CUTLER 1970). Ces valeurs les placent parmi les substances moyennement toxiques. Parmi les ammoniums quaternaires, il existe des composés peu ou pas toxiques, dont la DL50 par voie orale est, par exemple, de l'ordre de 1000 à 5000 mg/kg de poids vif pour des dérivés de la pyrrolidine (KOLOCOURIS 1981). En toxicité aiguë, les symptômes sont semblables à ceux résultant de l'empoisonnement au curare (paralysie musculaire, asphyxie, blocage ganglionnaire) avec action muscarinique (stimulation directe des muscles lisses) et nicotinique (dépression des systèmes sympathiques et parasympathiques) sans attaque du système nerveux central (RECK 1982). Dans tous les cas, on remarque des lésions de l'appareil gastro-intestinal. Les molécules les plus toxiques sont les composés cycliques qui peuvent provoquer des convulsions (chlorure de cétylpyridinium). Le mode d'action serait une inhibition de la cholinestérase qui entraîne l'abolition des transmissions synaptiques du système nerveux. SWENSON (1981) a mis en évidence un effet dépolarisant des alkylammoniums quaternaires qui bloquent au niveau de la membrane le transit des ions potassium des cellules musculaires. La perturbation des régulations osmotiques a été retrouvée par ISOMAA (1981a) en étudiant l'action du cétrimide sur les érythrocytes du rat. De nombreux dérivés du curare sont utilisés en anesthésie pour désensibiliser les muscles.

Chez la souris, la présence dans l'eau de boisson de 0,2 à 0,5 % de chlorure de benzalkonium entraîne un arrêt de leur croissance. A partir de 0,5 %, on constate une nette augmentation de la mortalité (CUTLER 1970). On observe des nécroses de l'estomac et une irritation du tractus intestinal. Des essais de toxicité chronique chez le rat ont montré que des solutions de chlorure de benzalkonium de titre inférieur ou égal à 0,25 % n'ont pas eu d'effets nocifs pendant deux ans (PETROCCI 1977). Selon d'autres auteurs, 0,05 % de benzalkonium dans l'eau de boisson provoque un arrêt de la croissance (tableau -V-).

	Voie	DL50	Observations
Cétrimide	Orale	680	Etat dépressif
	I.V.	40	Etat dépressif
Benzalkonium	Orale	450	Convulsions
	I.V.	16	Paralyse respiratoire
Pyridinium	Orale	200	Etat dépressif
	I.V.	30	Paralyse musculaire
Dequalinium	Orale	650	Paralyse respiratoire
	I.V.	19	Paralyse respiratoire

Toxicité aiguë en mg/kg de poids vif pour le rat

I.V. : Administration par voie intra-veineuse

	Durée du test	C	Observations
Cétrimide	20 mois	1 %	Inocuité
Benzalkonium	5 semaines	0,05%	Pas de croissance
Pyridinium	3 générations	0,1 %	Inocuité
Dequalinium	26 semaines	0,05%	Inocuité

Toxicité chronique pour le rat

C : Concentration en produit dans l'eau de boisson

Tableau -V- : Exemple de toxicité de quelques ammoniums quaternaires (D'après CUTLER 1970)

SHINDO a montré (1976) que les ammoniums quaternaires sont surtout fixés par les tissus cartilagineux. Le lait est considéré comme un bon antidote, probablement à cause de sa richesse en protéines (effet protecteur).

L'effet irritant n'apparaît qu'à des concentrations importantes. Les solutions de 5 à 10 % entraînent une libération d'histamine. Chez l'homme le contact pendant quatre semaines avec une solution à 0,1 % de chlorure de benzalkonium n'a entraîné ni irritation, ni sensibilisation (CUTLER 1970). L'expérience a été menée sur 200 personnes. Dans un hôpital U.S., le chlorure de benzalkonium a été employé sous forme de teinture alcool-acétone pour désinfecter la peau des patients au bloc opératoire. Après 18.000 opérations, aucun cas d'irritation (ni d'infection) n'a été signalé. A partir de 5 mg/ml, il y a danger pour l'oeil, d'autant plus grave que certains ammoniums quaternaires ont un effet anesthésiant et que l'intéressé ne ressent aucune douleur. Certains déodorants jouent sur cet effet en désensibilisant le système sensoriel du nez (GERSTEIN 1979).

Les différentes études menées sur le pouvoir allergène se heurtent au pouvoir irritant de ces détergents. Leur action histamino-libératrice gêne, en particulier, la lecture des tests. Au Centre Hospitalier Régional de Lille, le professeur MARTIN (1967) a détecté dix cas d'allergie en appliquant une solution à 0,1 % de cétrimide sur 440 malades exzémateux (2,3 % des patients). Le céthexonium a été trouvé très allergène (16,4 % des cas considérés comme positifs). Ces résultats ont été observés sur des sujets enclins à ce genre de réactions. Quelques cas rares d'hypersensibilité ont été toutefois signalés (CUTLER 1970) et certains ammoniums quaternaires sont considérés comme des allergènes professionnels (cétrimide, céthexonium).

En résumé, si les solutions de 1-10 % sont dangereuses à l'ingestion, les probabilités d'accident sont faibles. En effet, les ammoniums quaternaires sont rarement utilisés à de telles concentrations. De plus, l'absorption de telles solutions provoque une sensation de brûlure intense qui incite à la prudence. L'effet irritant est faible aux doses couramment admises et ces composés sont présents dans de nombreuses préparations en cosmétologie (KINGET 1985). Pour les mêmes raisons, le risque de toxicité chronique dû à la consommation d'aliments contenant des traces d'ammoniums quaternaires (résidus de solutions désinfectantes sur les équipements industriels), est faible.

Il existe cependant des décrets qui limitent l'utilisation des ammoniums quaternaires à certains commerces et industries (J.O. 29 sept. 1985). Ils sont interdits, par exemple, en boulangerie où ils peuvent interférer avec les levains (GELINAS 1982a). La F.D.A. (U.S. Food and Drug Administration) autorise l'emploi des ammoniums quaternaires dans l'industrie agro-alimentaire, à condition que les teneurs en matière active des solutions d'emploi soient inférieures à 200 ppm. La législation en matière de dose admissible dans les aliments et boissons est à la fois précise et floue. Elle est précise car aucune trace d'ammonium quaternaire ne doit être détectée et floue parce que les méthodes de détection sont relativement peu précises. La toxicité des ammoniums quaternaires est due à leur pouvoir tensio-actif (ALLEN 1985). Ils sont toutefois considérablement moins toxiques que certains autres désinfectants comme les organomercuriels, certains composés phénolés ou les métaux lourds. Aux concentrations utilisées, les ammoniums quaternaires sont considérés comme peu irritants pour la peau des animaux à sang chaud.

2.4) Les principales utilisations

Si on résume les principales qualités des ammoniums quaternaires, on comprend en partie la raison de leur large utilisation. LETOURNEAU (1980 et 1981) en dénombre dix :

1. Action bactéricide rapide.
2. Grande portée antibactérienne.
3. Effet antibactérien persistant.
4. Activité en présence de matières organiques.
5. Activité en concentrations relativement faibles.
6. Absence de propriétés corrosives et toxicité faible.
7. Grande stabilité dans le temps.
8. Peu ou pas d'effet nocif pour la peau et les tissus.
9. Facilité de dilution.
10. Economiques (faible coût de fabrication).

Les ammoniums quaternaires sont présents à tous les niveaux de la désinfection dans les hôpitaux. En chirurgie, urologie, obstétrique et gynécologie, ils servent à la stérilisation des instruments, tubes et catheters. Dans ce dernier emploi, ils sont appréciés pour leur absence de propriétés corrosives (PERNAK 1985b).

Pour la désinfection des mains du personnel hospitalier et de la peau du patient, les ammoniums quaternaires font partie des meilleurs désinfectants (MYKLEBUST 1985). Leur emploi est limité par leur absence de propriétés tuberculocides. Cette carence est en partie comblée par l'utilisation des ammoniums quaternaires sous forme de teinture (chlorure de benzalkonium à 0,1 % dans une solution d'éthanol ou d'isopropanol à 60 %). L'hexachlorophène leur est parfois préféré parce qu'il n'est pas inhibé par les phospholipides présents à la surface de la peau.

Le chlorure de benzalkonium entre dans la composition de solutions ophtalmiques (collyres) pour la désinfection de l'oeil à raison d'environ 1000 à 2000 ppm de produit actif. La cosmétologie exploite leur affinité avec la kératine dans la formulation de shampoings et de démêlants pour les cheveux. Les pouvoirs désinfectants, émulsifiants et électrostatiques servent à la fabrication de crèmes, onguents et parfums. Certains dérivés du carbamate empêchent la formation de la plaque dentaire (GERSTEIN 1979).

Les ammoniums quaternaires sont souvent associés avec des détergents non-ioniques pour le nettoyage et la désinfection des surfaces (sols, tables, ...etc). Ces solutions sont utilisées au cours du dernier cycle de lavage de linges ou de couverts que l'on veut désinfecter. Ils sont également utilisés sous forme d'aérosols ou sous forme gazeuse. Leur efficacité est alors décuplée (une pièce est désinfectée en dix minutes).

Ils servent également à la désinfection des équipements en industrie agro-alimentaire et même dans le traitement de certains emballages et des eaux industrielles. Leur faible toxicité est ici appréciée. Ils offrent également l'avantage de ne pas être corrosifs, notamment par rapport au chlore actif. On utilise leur propriété algicide pour la désinfection de l'eau (pour des raisons essentiellement esthétiques) et bactéricide pour éviter la prolifération de bactéries ferrugineuses dans les systèmes de refroidissement, où ils pourraient former des concrétions (RUCKA 1983).

Dans l'industrie textile ils servent à préserver les fibres naturelles du pourrissement (LONDON 1984), mais aussi en tant qu'agent adoucissant, antistatique et pour augmenter l'affinité tinctoriale des tissus.

Les ammoniums quaternaires aliphatiques offrent donc de nombreuses possibilités. Ceci est dû à la grande diversité de molécules et de propriétés physico-chimiques qu'offre cette catégorie de molécules (CANN 1982).

3) Le mode d'action

3.1) Structure chimique et pouvoir antimicrobien

3.1.1) Rôle de la chaîne aliphatique

Le mode d'action des ammoniums quaternaires antiseptiques est en corrélation étroite avec leur structure chimique. Ainsi la longueur de la chaîne aliphatique est déterminante et il existe, pour chaque composé, une longueur optimale où l'efficacité antimicrobienne sera maximale. La figure -1- en est une illustration caractéristique (CALDWELL 1961). L'auteur a synthétisé plusieurs dérivés de 4-aminoquinolinium qui ne diffèrent entre eux que par la longueur de la chaîne hydrocarbonée. On voit que les composés en C₁₄ et C₁₆ sont les plus actifs. Faire varier la longueur de la chaîne aliphatique dans les études de nouvelles formules est systématique (KUCHARSKI 1980, PERNAK 1985a). Selon les formules chimiques, l'optimum se situe en moyenne entre C₁₂ et C₁₆ d'un type de molécule à l'autre. Cet optimum varie également d'une espèce microbienne à l'autre.

CULLER (1979), en menant une étude systématique sur des composés simples, a obtenu pour les bactéries à Gram positif le maximum d'activité avec des produits en C₁₄. L'activité demeure importante pour les composés en C₁₆. contre les bactéries à Gram positif le pouvoir désinfectant maximum est obtenu avec les composés en C₁₃ et C₁₂, avec une forte diminution de ce pouvoir au-delà de C₁₄. On ne peut toutefois pas généraliser, tantôt les molécules avec une chaîne en C₁₂ sont les plus actives (Benzalkonium), tantôt ce sont les produits qui possèdent un groupement en C₁₆ (cétrimide). Contre Pseudomonas aeruginosa, GILBERT (1985) recommande l'utilisation de chaînes en C₁₆ et contre les levures, des chaînes en C₁₄.

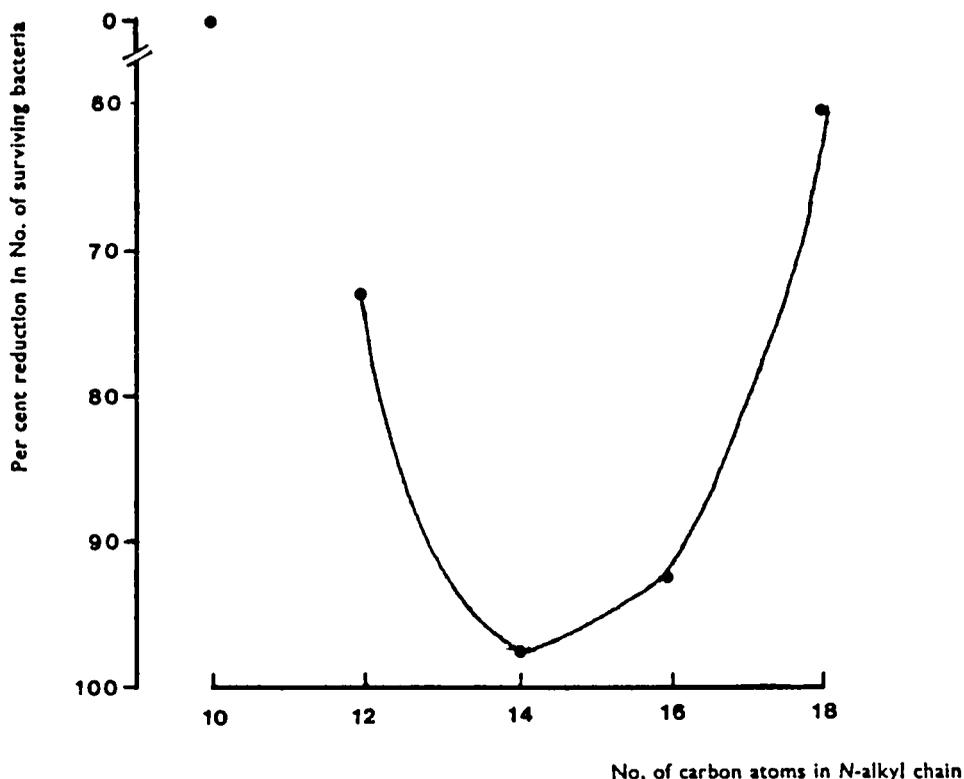


Figure -1- : Influence de la longueur de la chaîne aliphatique sur le pouvoir antimicrobien d'acétates de 4-aminoquinolinium contre S.aureus
% de survie après action de 10 µg/ml en 2,5 min.
(D'après CALDWELL 1961)

Ce comportement est retrouvé chez les alkylamines (CULLER 1979). Avec les polycations, l'activité bactéricide est fonction du poids moléculaire et donc de la longueur des polymères. Il existe également une longueur optimale (IKEDA 1985).

De nombreux auteurs ont cherché l'explication de ce phénomène en étudiant le caractère amphiphile de chaque composé. Les molécules dites amphiphiles possèdent une région paraffinique hydrophobe et une région hydrophile (figure -2-). Elles sont à la fois lipophiles et hydrophiles. La présence de la chaîne aliphatique confère en effet aux molécules un pouvoir tensio-actif.

pôle hydrophobe

pôle hydrophile

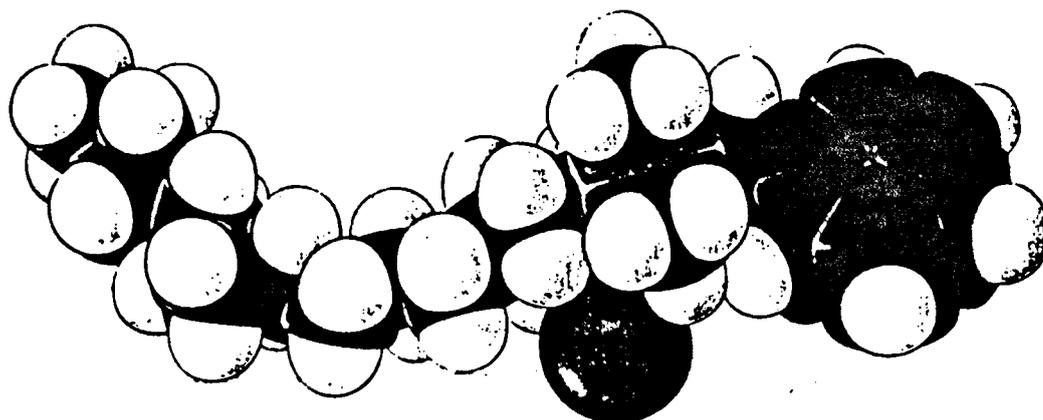


Figure -2- : Représentation éclatée du chlorure de benzalkonium

Le caractère amphiphile d'une molécule et donc son pouvoir tensio-actif dépendent étroitement de l'importance du groupement hydrophobe qui ne doit être ni trop petit (molécule non tensio-active), ni trop grand (molécule insoluble dans l'eau). C'est ce que l'on nomme la balance hydrophile/hydrophobe. L'analogie avec les optimums de pouvoir antimicrobien en fonction de l'importance du groupement hydrophobe est évidente.

3.1.2) Les agents de surface

Du fait de la structure particulière de leurs molécules, les substances amphiphiles s'adsorbent soit à la surface libre des solutions (cas des mousses), soit à l'interface entre l'eau et une huile (cas des émulsions), soit enfin à la surface des objets qui entrent en contact avec leurs solutions aqueuses (cas des mouillants et des détergents). Les substances ainsi adsorbées forment une couche superficielle, le plus souvent d'une seule assise moléculaire.

Les molécules amphiphiles s'orientent à l'interface de sorte que leur groupe hydrophile soit au contact avec le milieu aqueux et que leur partie paraffinique soit rejetée vers l'air (cas de la surface libre), ou tournée vers le liquide organique (cas de l'interface liquide-liquide). Ils peuvent former alors une couche régulière, un film (ZEMBALA 1982, PEREA-CARPIO 1986).

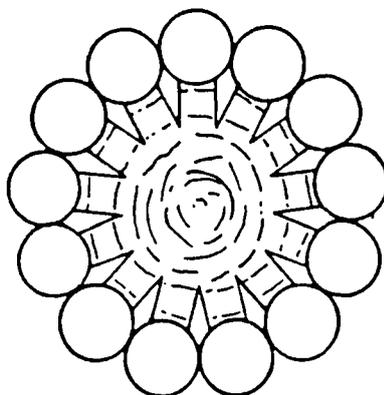
Dans le cas des interactions liquide-air, un des effets de la présence de la couche superficielle est l'abaissement de la tension superficielle ou interfaciale. La tension superficielle correspond à la résultante de l'énergie libre superficielle (travail dépensé par un liquide pour créer sa surface) et de la cohésion des molécules à l'interface. Il est possible de calculer la tension de surface et l'énergie libre superficielle. Les unités les plus couramment employées sont respectivement le $N.m^{-1}$ et le $J.m^{-2}$. Les forces et énergie qui entrent en jeu étant faibles, on rencontre souvent des unités comme le $dyne.cm^{-1}$ ($10^{-3} N.m^{-1}$) et l' $erg.cm^{-2}$ ($10^{-3} J.m^{-2}$).

Il faut très peu de tensio-actif pour abaisser la tension de surface d'une solution aqueuse. La présence de 0,01 % de cetylsulfate suffit à amener la tension superficielle de l'eau de $72,8.10^{-3} N.m^{-1}$ à $30.10^{-3} N.m^{-1}$. L'état de solubilité maximale de l'agent tensio-actif se situe à l'interphase ; seule la partie hydrophile est en contact avec l'eau. L'enrichissement de la surface en molécules dissoutes s'établit selon une cinétique, plus ou moins rapide selon les molécules, jusqu'à un équilibre dit équilibre d'adsorption. Le groupement hydrophile ne peut assurer seul la dissolution dans l'eau ; c'est pourquoi il se forme un autre système de solvatation lorsque l'interphase est saturée. Il s'agit de la formation de micelles (figure -3-) où il y a mise en commun des parties hydrophobes et orientation des motifs hydrosolubles vers l'eau.

C'est la formation des micelles qui explique la bonne solubilité des corps gras comme les savons. L'aggrégation en micelles se produit lorsque l'on atteint et dépasse une certaine concentration définie appelée "Concentration Critique Micellaire" (C.C.M.). La valeur de la C.C.M. dépend de la température et de la nature du contre-ion (les savons de potassium sont bien plus solubles que les savons de sodium). A la C.C.M. la couche d'adsorption à l'interface est maximale. Il y a aussi une saturation en molécules libres (molécules non impliquées dans une micelle).

Dans le cas des interactions liquide-liquide, l'énergie interfaciale dépend de la miscibilité des deux liquides et de leur différence de tensions superficielles. La présence d'un agent de surface permet de réduire cette différence et donc permet leur mélange (émulsion).

Micelle Formation in Aqueous Media



Spherical micelle of Adam. Redrawn from Ref. (10), p. 99, by courtesy of the Williams and Wilkins Co.

**Figure -3- : Formation des micelles en milieu aqueux
(D'après ANACKER 1970)**

Dans le cas des interactions solide-liquide, les notions de tension de surface et d'énergie interfaciale ne signifient plus rien car il est impossible de définir une variation d'énergie libre par unité de surface et encore moins d'envisager une tension superficielle des solides (DERVICHIAN 1979). On parle alors du phénomène d'adhésion.

L'adhésion dépend en partie du groupement polaire de l'agent de surface et de la charge électrostatique du solide. C'est l'effet d'adhésion qui maintient le liquide soulevé lors de la formation des ménisques et provoque le phénomène de capillarité. De l'importance de l'énergie d'adhésion, dépend le pouvoir mouillant. Plus l'agent de surface a d'affinité pour le support solide et plus il sera mouillant. L'agent mouillant parfait permettrait à une goutte, posée sur une surface plane, de s'étaler au maximum (couche monomoléculaire). L'adhésion entraîne un appauvrissement en substances actives dans la solution mais donne aussi naissance à la détergence. Les détergents agissent selon le schéma présenté en figure -4-.

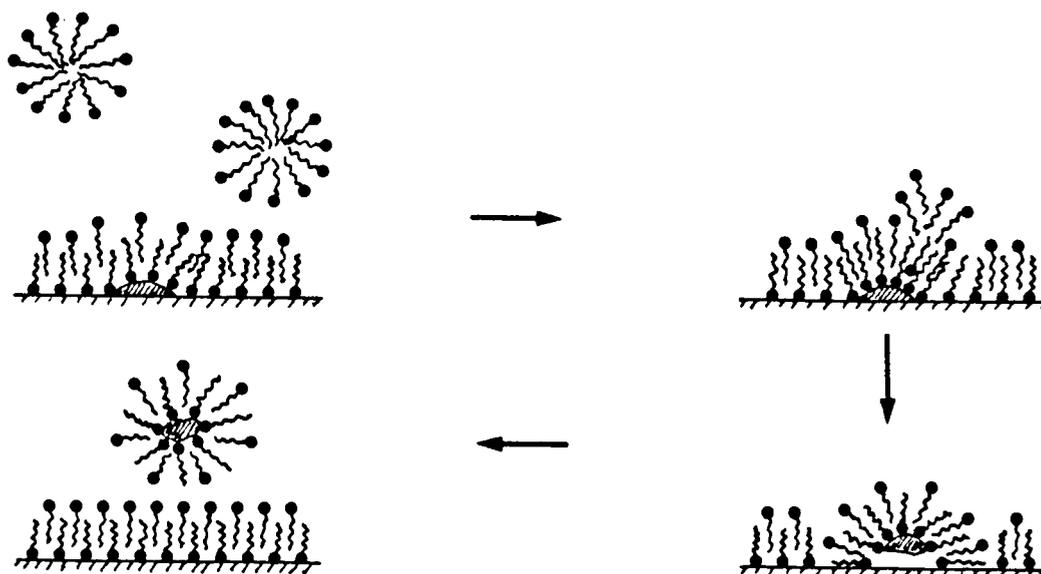


Figure -4- : Le pouvoir détergent

Comme on peut le voir, ce phénomène se produit surtout à des concentrations supérieures à la C.C.M. (présence de micelles indispensable). Le détergent s'adsorbe de plus en plus sur la souillure, jusqu'à ce qu'elle soit séparée de la surface solide. Comme pour l'effet d'adhésion, l'affinité du détergent pour la substance à détacher est importante.

On classe les agents de surface en fonction de l'ionisation de leur pôle hydrosoluble. Il y a trois groupes distincts :

- Les détergents anioniques qui forment le groupe le plus vaste tant par leur diversité que par leur importance économique. On y trouve les savons, acides gras et des composés synthétiques comme le Teepol. Ces molécules comprennent un groupe anionique tel que -COO^- , -OSO_3^- ou -SO_3^- . Dans ce groupe, il n'existe pas d'agents bactéricides puissants.

- Les agents de surface non ioniques tels que les polysorbates (Tween) ou les polyoxyéthylènes (Triton, Lubrol). la partie hydrophile est constituée par un ou plusieurs groupements hydroxyles OH^- ayant de l'affinité pour l'eau mais ne s'ionisant pas comme dans le cas précédent. Les détergents non-ioniques possèdent une petite action antiseptique lorsque leurs chaînes sont courtes (10 à 20 molécules).

- Enfin les composés cationiques aux quels appartiennent les ammoniums quaternaires et les composés comme les amines aliphatiques (groupements de type $-NH_3^+$) qui sont leurs précurseurs. Les autres détergents cationiques comme les sulfoniums, sulfoxoniums, phosphoniums ou idoniums ne sont pas encore exploités (JUNGERMAN 1970). Certains polypeptides comme les polymyxines, la tyrocidine ou la gramicidine possèdent une forte charge électrostatique négative. Leur comportement et leur mode d'action se rapprochent de ceux des ammoniums quaternaires par bien des points (BLASKO 1984).

3.1.3) Tensio-activité et pouvoir bactéricide

La bibliographie des auteurs qui ont mis en parallèle pouvoir tensio-actif et pouvoir antimicrobien est complexe. En effet les différents résultats obtenus sont souvent fragmentaires. L'interprétation est rendue difficile par l'interdépendance des paramètres étudiés et certains résultats contradictoires. Nous n'exposerons ici que les expérimentations les plus significatives.

La diminution de la tension superficielle est en corrélation avec la concentration en agents de surface. Le rapport de la concentration en produit sur la diminution de la tension de surface occasionnée, définit le pouvoir tensio-actif d'une molécule. Généralement les propriétés bactériostatiques les meilleures sont obtenues avec les composés qui possèdent le rapport le plus grand. ZISSMAN (1954 et 1957) a pu montrer que la concentration bactériostatique minimale, d'une série d'ammoniums quaternaires, correspond à la concentration nécessaire pour abaisser la tension de surface de l'eau peptonée d'environ 9-11 dynes.cm⁻¹ (tableau -VI-). ZISSMAN confirme ainsi l'existence d'un parallélisme entre l'action bactériostatique et l'activité superficielle des ammoniums quaternaires. Cependant, d'après l'auteur, il peut s'agir de deux manifestations différentes régies par un même mécanisme. On ignore le comportement de produits plus hydrophobes (en C₁₆ ou C₂₀).

Le pouvoir tensio-actif est maximal à la C.C.M. et des corrélations entre cette caractéristique et le pouvoir bactéricide ont été faites. CELLA (1952), par exemple, trouve pour une série de composés que les meilleurs désinfectants possèdent les C.C.M. les plus faibles.

Longueur de la chaîne aliphatique	Concentration minimale bactériostatique	Tension de surface (dyne/cm)
C ₇	1.10 ⁻² M	40
C ₁₀	5.10 ⁻⁴ M	38
C ₁₂	5.10 ⁻⁵ M	39
C ₁₆	1.10 ⁻⁶ M	40

Tableau -VI- : Relation entre la concentration minimale bactériostatique vis-à-vis de Staphylococcus aureus et le pouvoir tensio-actif (D'après ZISSMAN 1957)

CELLA montre aussi qu'il est possible d'accentuer le pouvoir antibactérien en augmentant le caractère dipolaire des molécules par la présence de radicaux plus électronégatifs à la périphérie de l'atome d'azote. CELLA précise que lorsque la C.C.M. est trop faible, les composés perdent leur pouvoir bactéricide. Ce phénomène est attribué au manque de solubilité de telles molécules. En effet, une C. C.M. faible implique une solubilité faible. La formation des micelles intervient alors précocement ; ce qui implique une faible concentration en molécules libres. Selon le schéma de KOSTENBAUDER (figure -5-), si la micellisation se produit à une concentration très faible, la quantité en molécules libres n'est pas suffisante pour assurer une bonne activité antimicrobienne. Le schéma de KOSTENBAUDER suppose que les ammoniums quaternaires soient moins actifs sous forme de micelle. Le pouvoir bactéricide apparaît à des concentrations très faibles bien inférieures à la C.C.M. Pour le cétrimide, par exemple, la C.C.M. est de l'ordre de 480 µg.ml⁻¹ tandis que son pouvoir bactéricide commence dès 10-20 µg.ml⁻¹. Le pouvoir antiseptique apparaissant bien avant que les micelles ne se forment, il est difficile de vérifier cette hypothèse. Il existe, cependant, certains arguments comme la très faible activité antimicrobienne des détergents anioniques. En effet KRAMER (1984) a trouvé 200 souches d'entérobactéries, sur 208 testées, résistantes au Sodium Dodécyl Sulfate (SDS). Le SDS possède pourtant un bon pouvoir détergent.

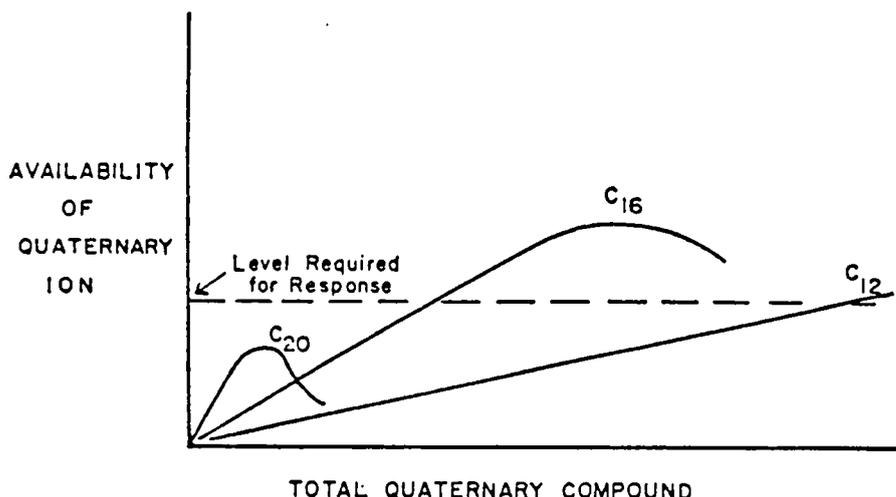


Figure -5- : Influence de la formation en micelles sur la concentration en ammoniums quaternaires libres. (D'après KOSTENBAUDER 1977)

Dans les genres Klebsiella et Enterobacter, certaines souches arrivent à se multiplier en présence de 5 % de SDS tout en restant sensibles au chlorure de benzalkonium. Cette observation tend à minimiser le rôle des pouvoirs tensio-actifs et détergents dans le mode d'action des ammoniums quaternaires. Il existe également des ammoniums quaternaires peu bactéricides doués d'un bon pouvoir tensio-actif ; c'est ainsi que SMITH (1964) ne trouve aucune corrélation entre le pouvoir tensio-actif et le pouvoir germicide. Enfin, après l'étude d'une quarantaine de dérivés du durène, MOTTA (1979) estime que l'activité antimicrobienne est plus en relation avec un effet stérique des substituants qu'avec une influence de ces substituants sur la balance hydrophile/hydrophobe des molécules.

Lorsque les chaînes grasses sont insaturées, les corps gras et les détergents sont en général plus solubles (DERVICHIAN 1979). Ainsi les stéarates (chaînes saturées en C₁₈) sont bien moins solubles que les oléates qui comportent une double liaison. Il en est de même pour les ammoniums quaternaires. Or il a été prouvé qu'un accroissement du degré d'insaturation des chaînes entraîne une augmentation du pouvoir bactéricide (DAMODARAN 1953).

Des sels d'ammoniums quaternaires insaturés ont d'ailleurs été brevetés pour cette raison (KOHJIN 1985). Ainsi quand le bromure de stéaryl pyridinium a une dilution stérilisante utile de 1/9.000, les dérivés oleyl-, linoleyl- et linolényl- ont respectivement des dilutions stérilisantes utiles de 1/21.000, 1/42.500 et 1/60.000 (DAMODARAN 1953). Ces observations sont en contradiction avec les expériences de CELLA à propos des C.C.M. Certaines autres observations sont inexplicables. Par exemple, le branchage des chaînes aliphatiques provoque une perte d'activité vis-à-vis des bactéries à Gram négatif mais pas vis-à-vis des bactéries à Gram positif (CULLER 1979).

Le fait que le pouvoir détergent semble jouer un rôle mineur et qu'il n'existe pas de corrélation nette entre les pouvoirs tensio-actif et bactéricide, pose problème. Le pouvoir bactéricide dépend parfois de la solubilité du produit et parfois de son hydrophobicité. D'autres mécanismes doivent exister. La réponse à ces problèmes a été recherchée dans une approche différente qui met en jeu un autre phénomène surfaciel : l'adhésion ou l'affinité du tensio-actif pour certains substrats.

3.1.4) L'approche thermodynamique

Cette approche est basée sur le principe de FERGUSON (1939) qui est le suivant : la toxicité d'une substance dépend de sa capacité à passer du milieu extérieur à la biophase où se situe son site d'action. La réponse biologique serait moins due à des concentrations stoechiométriques qu'au potentiel chimique de la substance (pouvoir d'adsorption, énergie libre d'activation) et sa capacité de passer d'une phase à l'autre, autrement dit de traverser une interphase. Avec une approche plus thermodynamique, on trouve de meilleures corrélations en calculant par exemple le rapport T_{CME}/T_{CCM} des ammoniums quaternaires (WEINER 1965). T_{CME} correspond au nombre de molécules présentes à l'interface air-liquide par unité de surface (molécules/A²) à la Concentration Minimale Effective (CME) nécessaire pour tuer 99,9% d'une suspension bactérienne de titre connu. T_{CME} est donc une représentation de la proportion de molécules présentes à l'interface à une concentration (CME) donnée. T_{CCM} donne cette valeur à la Concentration Critique Micellaire.

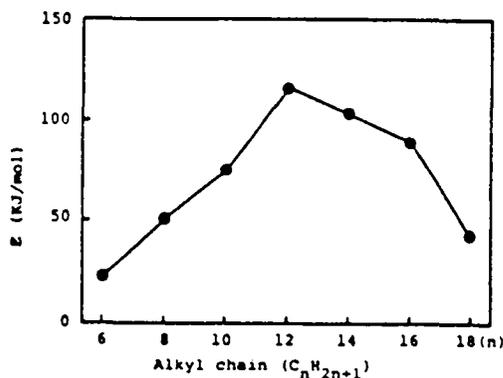
Le rapport T_{CME}/T_{CCM} varie d'une espèce microbienne à l'autre. Cependant, aucune règle générale n'a pu être dégagée de ce type d'expériences où l'on ne prend en considération que les propriétés tensio-actives des ammoniums quaternaires (KOSTENBAUDER 1977). Toutefois WEINER conclut que le mode d'action des ammoniums quaternaires dépend principalement de l'interaction entre une phase externe où évolue l'antiseptique et la biophase représentée par le système membranaire des cellules. L'étude de l'interphase cellule-milieu externe est donc primordiale.

Il faut considérer qu'une suspension cellulaire forme un système particulière où les cellules sont autant de grains en relation avec le milieu ambiant par une interphase de type solide-liquide. Les phénomènes qui vont régir les relations entre un agent tensio-actif et une cellule microbienne seront l'adsorption mais également l'adhésion. Etant donné que les cellules sont globalement chargées négativement, la charge positive du motif hydrosoluble entraîne un phénomène d'adhésion. Cette particularité, alliée à la tendance naturelle des tensio-actifs à migrer aux interfaces (adsorption), explique la très forte affinité des ammoniums quaternaires pour les cellules. Cette affinité se mesure de différentes manières.

On peut mesurer l'importance de l'adsorption en étudiant les cellules. La technique consiste à ajouter à une suspension cellulaire une quantité connue de désinfectant et procéder à des dosages du principe actif à intervalles réguliers. De ces données, des isothermes d'adsorption sont tracés et des informations concernant le taux et la quantité totale de produit adsorbé peuvent être établis (HUGO 1967). L'isotherme d'adsorption du cétrimide sur les cellules de Staphylococcus aureus est de type H2 selon la classification de GILES (1960). Le type H (pour "High affinity") définit les systèmes où la molécule soluble possède une grande affinité pour la surface du solide considéré. Ainsi 1 mg (poids sec) de cellules d'Escherichia coli est capable d'adsorber 420 µg de cétrimide (SALTON 1951a). NEWTON en 1958 constate que plus les bactéries sont sensibles, plus elles adsorbent d'ammoniums quaternaires. D'une manière générale, les antiseptiques les plus actifs sont ceux qui se fixent le mieux sur les cellules bactériennes (HUGO 1976).

L'adsorption massive d'ammoniums quaternaires par les cellules provoque des modifications spectaculaires de leur mobilité électrophorétique (Mc QUILLEN 1950). La charge globale des bactéries est neutralisée au fur et à mesure que l'on augmente la concentration en antiseptique. La charge négative n'est pas seulement neutralisée, les bactéries deviennent électropositives jusqu'à une valeur stable qui correspond au maximum d'adsorption. Les ammoniums quaternaires impliqués peuvent former une surface 15 fois supérieure à la surface de la bactérie (NEWTON 1958). Les cellules entourées par de multiples couches de tensio-actifs deviennent hydrophobes (SALTON 1951a). Il existe par ailleurs une relation linéaire entre la quantité d'ammonium quaternaire et le nombre de cellules détruites (ANDERS 1985). Les bactéries les plus sensibles (Bacillus subtilis, Staphylococcus aureus) absorbent plus d'antiseptique que les espèces plus résistantes comme Pseudomonas aeruginosa ou Escherichia coli. Paradoxalement, l'élimination de bactéries sensibles peut entraîner une consommation importante en antiseptique. L'affinité peut se mesurer en calculant une constante d'adsorption des composés sur les surfaces bactériennes. Si cette constante est mesurée en fonction de la température, il est possible de déterminer une énergie d'activation apparente du système (KOURAI 1985a). Sur la figure -6-, on voit que l'énergie d'activation varie en fonction de la longueur de la chaîne aliphatique. La corrélation avec le pouvoir antiseptique est excellente.

KOURAI (1985b) a poursuivi ses travaux sur différents dérivés du composé en C₁₂ (N-dodécyl pyridinium) en utilisant des pyridines substituées. Il a ainsi mis en évidence une relation linéaire étroite entre la constante de dissociation acide (pKa) des pyridines utilisées pour la synthèse et le pouvoir bactéricide des ammoniums quaternaires obtenus. Plus la valeur du pKa est basique, plus le produit est actif contre les agents microbiens. Les radicaux, qui substituent le noyau aromatique de la pyridine, potentialisent l'activité antiseptique de la molécule lorsqu'ils sont donneurs d'électrons (radicaux aminés et méthyl) tandis que les accepteurs d'électrons (carboxyl, carbamoyl) réduisent cette activité. Ces résultats confirment l'importance de la partie hydrosoluble dans l'activité antiseptique. Selon KOURAI (1985b) il existe une relation étroite entre le pouvoir antiseptique et la densité électronique au voisinage de l'atome d'azote pentavalent.



Effect of alkyl chain length of N-alkyl pyridinium iodides on the apparent activation energy of bactericidal action against *E. coli* K 12. The measurement of the energy was carried out with the following concentrations: 1200 µg/ml, N-hexylpyridinium iodide; 320 µg/ml, N-octylpyridinium iodide; 100 µg/ml, N-laurylpyridinium iodide; 6.5 µg/ml, N-myristylpyridinium iodide; 1.7 µg/ml, N-cetylpyridinium iodide; 0.5 µg/ml, N-stearylpyridinium iodide.

Figure -6- : Influence de la longueur de la chaîne aliphatique de l'iodure de N-alkyl pyridinium sur l'énergie d'activation apparente (E) du pouvoir bactéricide contre *E. coli* K 12 (D'après KOURAI 1985 a)

En constatant l'importance de la structure chimique sur l'action bactéricide, il était intéressant de connaître l'influence de la chiralité. Après avoir séparé les isomères optiques du bromure de N-alkyl N-(1-phényléthyl) N,N-diméthyl ammonium, OSANAI (1985) n'a trouvé aucune différence dans leurs activités antiseptiques. L'atome asymétrique est le no 1 du radical propyl. La grande mobilité des radicaux, qui peuvent pivoter aisément autour de l'atome d'azote, n'autorise pas la formation d'isomères optiques par l'asymétrie de l'atome d'azote.

Pour clore ce chapitre, il convient de noter l'importance du contre-ion (ion accompagnateur) qui neutralise la charge des ammoniums quaternaires. Cet ion participe beaucoup à la formation des micelles et influe donc sur la C.C.M. et la solubilité des agents de surface (ANACKER 1970). Les ions accompagnateurs jouent également un rôle important dans les mécanismes d'adsorption et d'affinité avec les surfaces solides. De plus certains ions sont eux-mêmes antiseptiques comme par exemple l'iode qui est de plus en plus utilisé en association avec les ammoniums quaternaires.

Certains auteurs préconisent l'emploi d'anions organiques bactéricides (REBOLD 1958) qui permettent l'obtention d'une activité bactéricide en présence de substances qui neutralisent normalement l'activité des ammoniums quaternaires.

3.1.5.) Conclusions

La relation structure chimique-pouvoir antiseptique dépend de trois points :

- La chaîne aliphatique confère les pouvoirs tensio-actifs et détergents qui ne peuvent participer à l'activité antimicrobienne qu'à fortes doses. Par contre, le comportement des ammoniums quaternaires en solution aqueuse est fortement influencé par la présence d'un pôle hydrophobe. Les détergents cationiques ont ainsi tendance à migrer aux interfaces et donc vers les cellules microbiennes où ils vont pouvoir agir. Ce comportement est également présent avec les dérivés du paraben (méthyl et éthyl), les alkylamines et les alcools (GUMP 1982).

- Avec le pôle hydrosoluble, on peut accentuer le caractère amphiphile des molécules et augmenter par là-même leur pouvoir tensioactif. Toutefois, le principal atout reste la charge électrostatique positive qui donne aux ammoniums quaternaires une grande affinité pour les bactéries comme c'est le cas pour les polypeptides basiques (NEWTON 1956).

- L'ion accompagnateur donne une certaine réactivité au sel d'ammonium quaternaire. Sa nature influe sur la concentration en produit actif soluble. Il s'agit très souvent d'un halogène.

Ces trois points définissent le comportement des ammoniums quaternaires. A forte dose, le pouvoir détergent et l'adsorption de multiples couches de tensio-actifs autour de la cellule bactérienne, vont créer des contraintes importantes qui aboutissent à l'éclatement de la cellule. Le pouvoir détergent à lui seul provoque la dénaturation des protéines et la solubilisation des lipides membranaires. Cependant, l'activité antimicrobienne débute à de très faibles concentrations. Il y a donc un autre niveau d'activité où les ammoniums quaternaires vont agir de manière précoce.

Cette observation est étayée par le fait que les détergents anioniques ne possèdent qu'un pouvoir antiseptique faible malgré un pouvoir détergent important. Par leur charge négative, ils seraient repoussés au niveau de la paroi des bactéries (affinité faible). Par contre, les détergents non-ioniques sont nettement plus adsorbés par les cellules bactériennes (HUGO 1976).

Nous avons vu que l'affinité des ammoniums quaternaires pour les cellules joue un rôle majeur dans l'activité bactéricide. Il convient de connaître maintenant la nature même de leur toxicité vis à vis des agents microbiens, en étudiant les perturbations métaboliques qu'entraîne leur présence.

3.2) Modification de la perméabilité membranaire

Les principaux travaux concernant ce sujet ont été effectués en mesurant des cinétiques de relargages de divers constituants cytoplasmiques dans le milieu extérieur. En présence d'ammoniums quaternaires, de nombreuses molécules ne sont plus retenues par les cellules. De nombreux constituants cytoplasmiques peuvent être relargués. Les premiers sont les plus petits composants comme les ions (Pi, K⁺, SO₄²⁻..etc) ; suivent ensuite les amino-acides puis les bases organiques. SALTON (1951a) a ainsi constaté le relargage de bases nucléiques (purine, pyrimidine), d'acide glutamique et de phosphore inorganique (Pi) par Staphylococcus aureus sous l'effet du cétrimide. Les constituants relargués peuvent être différents selon l'espèce bactérienne utilisée ; Escherichia coli ne relargue pas d'acide glutamique (SALTON 1951a).

Le relargage des ions K⁺, qui est achevé en trente minutes, est considéré comme le premier indice de la dégradation des membranes (LAMBERT 1973, BLASKO 1984, KEWELOH 1984a et 1984b). La figure -7- montre des courbes type de relargage des ions K⁺, du phosphore inorganique et de matériel absorbant à 260 nm (bases nucléiques). Certaines substances, qui comme le pyruvate ou l'ATP (Adenosine TriPhosphate) ne peuvent normalement pas passer à travers les membranes plasmiques, peuvent également diffuser vers l'extérieur (HUGO 1965).

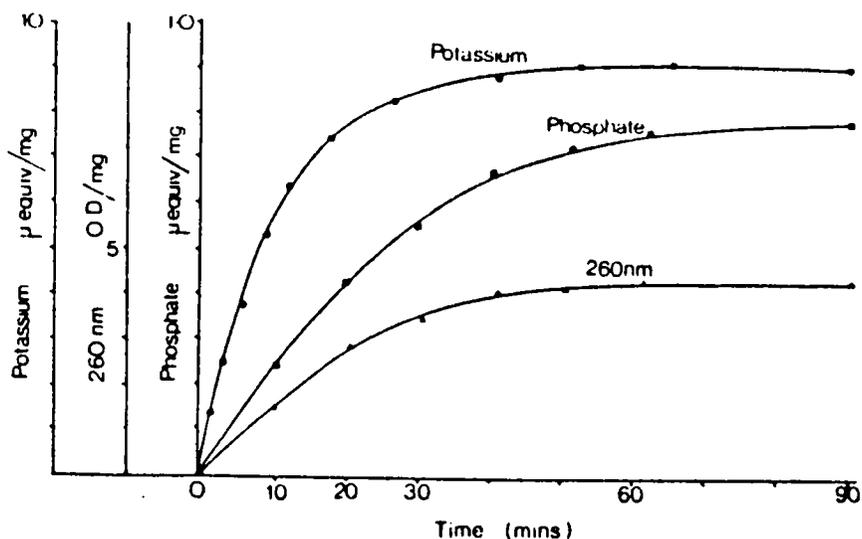


Figure -7- : Relargage de constituants cytoplasmiques par Escherichia coli mis en présence de 0,2 mM de cétrimide à pH 7 et 25°C (D'après LAMBERT 1973)

Des molécules de haut poids moléculaire peuvent finalement être relarguées, sans que la lyse intervienne, comme par exemple, le cytochrome c_3 de Desulphovibrio desulphuricans (POSTGATE 1956). La perte du caractère semi-perméable des membranes peut être mis en évidence de deux autres façons. La première consiste à étudier des protoplastes ou des sphéroplastes de bactéries (HAMILTON 1971). La membrane des protoplastes est normalement perméable au glycérol, aux ions NH_4^+ et acétates, tandis que les ions K^+ , Na^+ , NO_3^- et Cl^- ne peuvent traverser. En présence de cétrimide, les protoplastes deviennent perméables à tous les ions sans que la lyse intervienne. Au fur et à mesure que le contact se poursuit, les protoplastes deviennent très sensibles aux chocs osmotiques (NEWTON 1958). La seconde méthode se rapporte à l'étude de liposomes ou de membranes artificielles. La présence d'ammonium quaternaire accroît la perméabilité membranaire aux ions sulfate des liposomes de lécithine (KUCZERA 1985). NEWTON rapporte également que la quantité de bases nucléiques relarguées est en rapport avec la quantité d'ammonium quaternaire ajouté. La quantité maximale de matériel absorbant à 260 nm relargable correspond à peu près au pool total de bases nucléiques présentes dans les cellules.

Cependant la lyse des cellules ne contribue à l'enrichissement du milieu extérieur en métabolites cytoplasmiques qu'aux derniers stades de l'action antiseptique.

La perte du rôle de barrière osmotique joué par la membrane cytoplasmique entraîne rapidement une diminution du métabolisme bactérien (fuite des cofacteurs, des substrats... etc). La lyse serait due d'une part à la fragilisation de la paroi, qui ne peut plus être renouvelée à cause de la fuite des principaux métabolites nécessaires à son entretien ; d'autre part, à la libération d'enzymes autolytiques qui s'échapperaient du cytoplasme (HUGO 1967). SATA (1986) a montré que les ammoniums quaternaires aliphatiques sont capables de modifier le caractère semi-perméable de certaines membranes artificielles, dont ils modifient également la résistivité électrique.

3.3) Interaction avec les lipides membranaires

L'interaction avec les composés lipidiques membranaires est certaine. Le rôle important qu'ils jouent dans la résistance aux ammoniums quaternaires en est une preuve. FISHER (1952) a pu progressivement adapter une souche de Serratia marcescens à des concentrations très importantes en chlorure de benzalkonium. La tolérance est ainsi passée de 50 µg/ml à 10 mg/ml !

La composition chimique de la paroi des formes adaptées est considérablement enrichie en lipides. D'autre part, l'extrême résistance des mycobactéries aux ammoniums quaternaires est attribuée, également, à la richesse en lipides de leur paroi. La différence de sensibilité entre les bactéries à Gram négatif et les bactéries à Gram positif, est également imputable à la présence d'une quantité plus importante de composés lipidiques dans la paroi des premières.

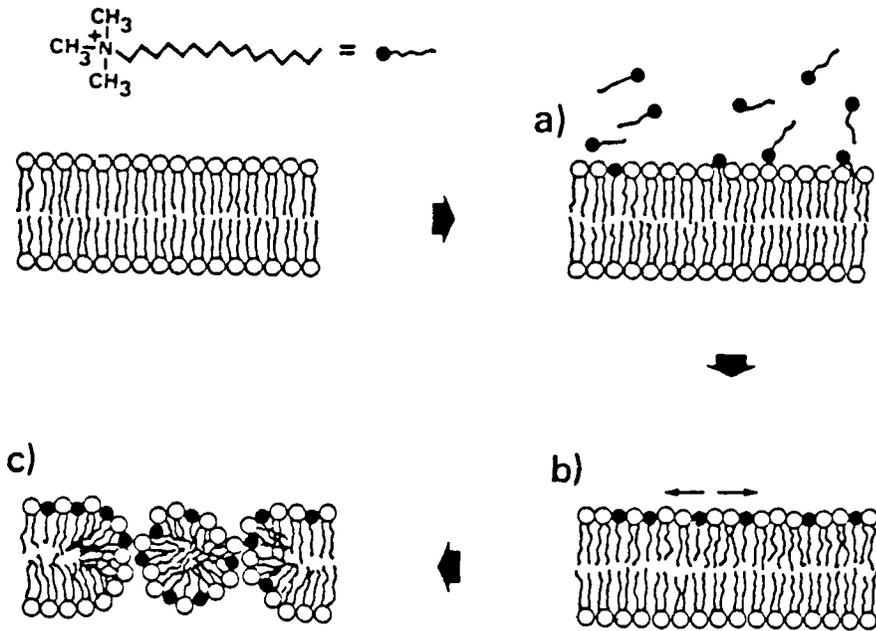
Enfin, nous savons que seuls les virus contenant des composés lipidiques dans leur capsid peuvent être inactivés par les ammoniums quaternaires. Toutes ces observations indiqueraient que la principale cible des ammoniums quaternaires serait les lipides membranaires (VENTURA 1985). Ainsi les phospholipides sont des neutralisateurs connus des ammoniums quaternaires (REYBROUCK 1979).

L'affinité de ces deux types de composés l'un pour l'autre est due à la possibilité qu'ils ont de se lier ensemble à la fois par des liaisons hydrophobes et par des liaisons électrostatiques. Les ammoniums quaternaires font partie des substances dites "membrane-actives" (HAMILTON 1971) comme la plupart des composés phénolés, les dérivés diguanidiques (chlorhexidine), les alcools, les alkylamines...etc.

Selon ISOMAA (1981b & 1984), la lyse aux concentrations pré-micellaires serait due à l'intercalation des molécules amphiphiles dans la double couche lipidique par interaction hydrophobique. Il s'en suivrait une modification du comportement de la membrane affectant ses principales fonctions (osmorégulation, actions enzymatiques membranaires, perméabilité, endocytose...). Au dernier stade du processus d'intercalation, la double couche lipidique serait solubilisée par la formation de micelles mixtes (voir figure - 8-). Les ammoniums quaternaires ne pourraient pas pénétrer dans le cytoplasme avant la disparition totale des membranes.

La dégradation des enveloppes membranaires a pu être visualisée par la microscopie. CHAPLIN (1952a) a pu observer plusieurs stades de dégradation chez plusieurs espèces de *Bacillus*. La membrane cytoplasmique de *Staphylococcus aureus* disparaît en 30 minutes en présence de 900 µg/ml de benzalkonium ; il s'en suit une extrusion du cytoplasme (SALTON 1951b). La paroi perd progressivement sa rigidité et finit par disparaître probablement par autolyse après la rupture de la membrane plasmique. En ce qui concerne les bactéries à Gram négatif, la première modification intervient au niveau de la paroi (RICHARDS 1980). Celle-ci prend un aspect granuleux caractéristique de l'action de substances "membrane-actives" comme les polymyxines ou la chlorhexidine.

La paroi est progressivement décapée chez *Pseudomonas aeruginosa* et les bactéries deviennent Gram positif. La membrane cytoplasmique doit alors être accessible au désinfectant. Chez *Pseudomonas cepacia* (bactérie plus sensible), la membrane cytoplasmique est détruite bien avant la paroi. La paroi est le plus important obstacle à la pénétration des ammoniums quaternaires. IKEDA (1985) estime que les polycations de poids moléculaires élevés sont peu actifs en raison de leur incapacité à traverser la paroi pour aller léser la membrane cytoplasmique.



Interaction of surface-active alkyltrimethylammonium salts with cell membranes. a) The surfactant molecules are intercalated in the lipid bilayer of the cell membrane with their hydrocarbon chains between the hydrocarbon chains of the phospholipids and with their polar heads at the polar region of the bilayer. b) Intercalated surfactant molecules have a disordering (fluidizing) effect on the hydrocarbon chains of the phospholipids. The surfactants are intercalated preferentially in the outer half of the bilayer and this expands the outer half relative to the inner one. c) When a certain amount of surfactant molecules have been intercalated in the bilayer the bilayer structure collapses and mixed micelles are formed in the bilayer.

Figure -8- : Interaction du cétrimide avec la membrane cytoplasmique (D'après ISOMAA 1984)

3.4) Interaction avec les protéines enzymatiques

Il est connu que les ammoniums quaternaires interagissent fortement avec les protéines en provoquant leur coagulation (FEW 1955). Certains auteurs ont même établi une corrélation entre la capacité à précipiter les protéines et le pouvoir antiseptique (CALDWELL 1961). SALTON en 1951b a pu observer, en microscopie électronique, la contraction du cytoplasme de bactéries traitées avec 90 µg/ml de cétrimide. Toutefois, ce phénomène n'intervient qu'à des concentrations assez importantes. L'étude de la sensibilité des systèmes enzymatiques a permis de détecter des modifications très précoces du métabolisme bactérien. Ces modifications peuvent intervenir avant que l'on constate une augmentation de la perméabilité membranaire.

Dès 1949, KNOX établit une corrélation étroite entre le taux de mortalité et le pourcentage d'inhibition de certaines activités biochimiques, notamment celles concernant le métabolisme oxydatif. Il existe de grandes différences de sensibilité entre les différentes réactions biochimiques. La décarboxylation de l'arginine peut, par exemple, subsister à des concentrations importantes de chlorure de benzalkonium. L'oxydation de l'acide lactique, la glycolyse et les réactions du cycle de KREBS sont par contre inhibées rapidement. HUGUES (1949) constate en outre que la plupart des réactions enzymatiques, qui sont inhibées lorsque l'on fait agir des ammoniums quaternaires sur des cellules entières, ne sont pas affectées quand l'enzyme purifiée est utilisée. HUGO (1965) estime que l'inhibition des réactions enzymatiques est surtout due à la perte des cofacteurs et à la fuite des substrats, provoquée par l'augmentation de la perméabilité membranaire. Les enzymes ne disposent alors ni d'énergie, ni de substrat. La plus grande perméabilité des membranes peut agir dans l'autre sens. En effet certaines voies biochimiques sont exaltées quand les ammoniums quaternaires sont utilisés à des doses très faibles qualifiées de sous-inhibitrices. Certains métabolites peuvent alors passer plus facilement dans le cytoplasme ; les enzymes disposent alors d'une plus grande quantité de substrat. C'est le cas notamment de la plupart des réactions du métabolisme oxydatif et de la consommation en oxygène.

Deux zones d'activité peuvent être distinguées :

- Une zone prélytique où la consommation en oxygène est exaltée et où le métabolisme fermentatif n'est pas affecté.
- Une zone lytique où la fermentation et la consommation en oxygène sont inhibées.

Les voies métaboliques qui n'utilisent pas de cofacteurs peuvent être exaltées dans la zone lytique, surtout si la concentration interne en substrat est soumise à l'activité d'une perméase. L'existence d'enzymes spécifiquement sensibles aux détergents cationiques est controversée. KNOX (1949) estime que la lactate-oxydase entre dans cette catégorie. L'enzyme purifiée est en effet inactivée en présence de faibles quantités de benzalkonium. Selon HUGO (1965), l'enzyme peut être dénaturée rapidement sous l'effet des seules propriétés tensio-actives des ammoniums quaternaires. Il estime que ce type d'expérience ne permet pas de postuler sur l'existence d'enzymes "ultra-sensibles".

HAMILTON (1971) n'exclut pas cette hypothèse et fait état de la possibilité d'inhibition, par de très faibles doses d'ammoniums quaternaires, de perméases responsables du transfert actif de certains métabolites. Cette hypothèse n'a toujours pas été prouvée de façon certaine à cause de la multiplicité des mécanismes qui peuvent intervenir. KOLODYNSKI (1984) fait, par exemple, état de la cessation du transport actif de la méthionine chez les levures en présence d'ammonium quaternaire. Ce phénomène est rapidement suivi d'un relargage massif de l'acide aminé dans le milieu extérieur. Ceci peut être dû à l'augmentation de la perméabilité membranaire, à l'inactivation directe (dénaturation) ou indirecte (perte de cofacteur) de l'enzyme. Les ammoniums quaternaires ne sont pas des découplants énergétiques, même à fortes concentrations (HUGO 1967).

Il est évidemment difficile de faire la part des choses entre l'inhibition due à la perte des cofacteurs, celle due à la dénaturation des protéines ou celle due au blocage de sites actifs. SWENSON (1981) a pu montrer que l'effet dépolarisant, des ammoniums quaternaires sur les neurones, est dû au blocage du système de transport membranaire des ions potassium. D'ARCY (1971) indique, chez les levures, la possibilité d'une action inhibitrice précoce de la conversion de l'acétaldéhyde en acétyl-coenzyme A, par des di-ammoniums quaternaires. L'enzyme responsable de la transformation serait située sur la face externe de la membrane cytoplasmique. VINCENZINI (1985) a mis en évidence des degrés très divers de sensibilité aux détergents chez les protéines enzymatiques. Cependant, un mode d'action possible des ammoniums quaternaires serait la dissociation des protéines et surtout des lipoprotéines associées aux membranes. Cette dissociation serait due à l'adsorption de détergent cationique par les phospholipides membranaires. La chaîne respiratoire et ses cytochrome-oxydases est particulièrement susceptible de subir ce type de dénaturation.

En présence de faibles quantités d'ammoniums quaternaires (1 µg/ml), la proportion de cellules de grande taille augmente. Cette observation, faite par RYE (1968) pourrait être due à un métabolisme exalté, ou au développement d'une couche extérieure à la paroi, formée d'un amalgame de désinfectant et de résidus membranaires.

3.5) Conclusions

La complexité du mode d'action des ammoniums quaternaires est incontestablement due à leur manque de spécificité. Les mécanismes d'action évoluent au fur et à mesure que la concentration en ammonium quaternaire augmente. On observe ainsi pour les membranes la suite des évènements suivants :

- 1) Adsorption puis modification de la mobilité électrophorétique.
- 2) Intercalation des ammoniums quaternaires entre les lipides membranaires.
- 3) Perte du caractère semi-perméable.
- 4) Formation de micelles mixtes.
- 5) Solubilisation de la double couche lipidique.
- 6) Libération d'enzymes autolytiques, lyse de la paroi.

On peut aussi résumer en cinq points les différents aspects de l'interaction avec les protéines en général et les enzymes en particulier :

- 1) Inactivation d'enzymes spécifiques (probablement des perméases).
- 2) Exaltation de l'activité de certaines enzymes due à l'entrée plus rapide de certains substrats
- 3) Diminution du métabolisme due à la perte de métabolites et de cofacteurs (relargage).
- 4) Dissociation des protéines conjuguées
- 5) Dénaturation générale des protéines cytoplasmiques.

Les possibilités de dénaturation précoce des acides nucléiques de haut poids moléculaire sont faibles. Selon NEWTON (1958), les ammoniums quaternaires ne peuvent passer les membranes cytoplasmiques. L'accès au cytoplasme n'est donc possible qu'au moment de la lyse. Une des rares interactions directes avec du matériel nucléaire a été décrite par STOLS (1965) pour expliquer la destruction du virus de la mosaïque des crucifères. NEWTON (1958) estime que les ammoniums quaternaires ne pénètrent pas dans les cellules bactériennes et que leur pouvoir antiseptique est une "action de surface".

4) La résistance aux ammoniums quaternaires

4.1) Résistance adaptative

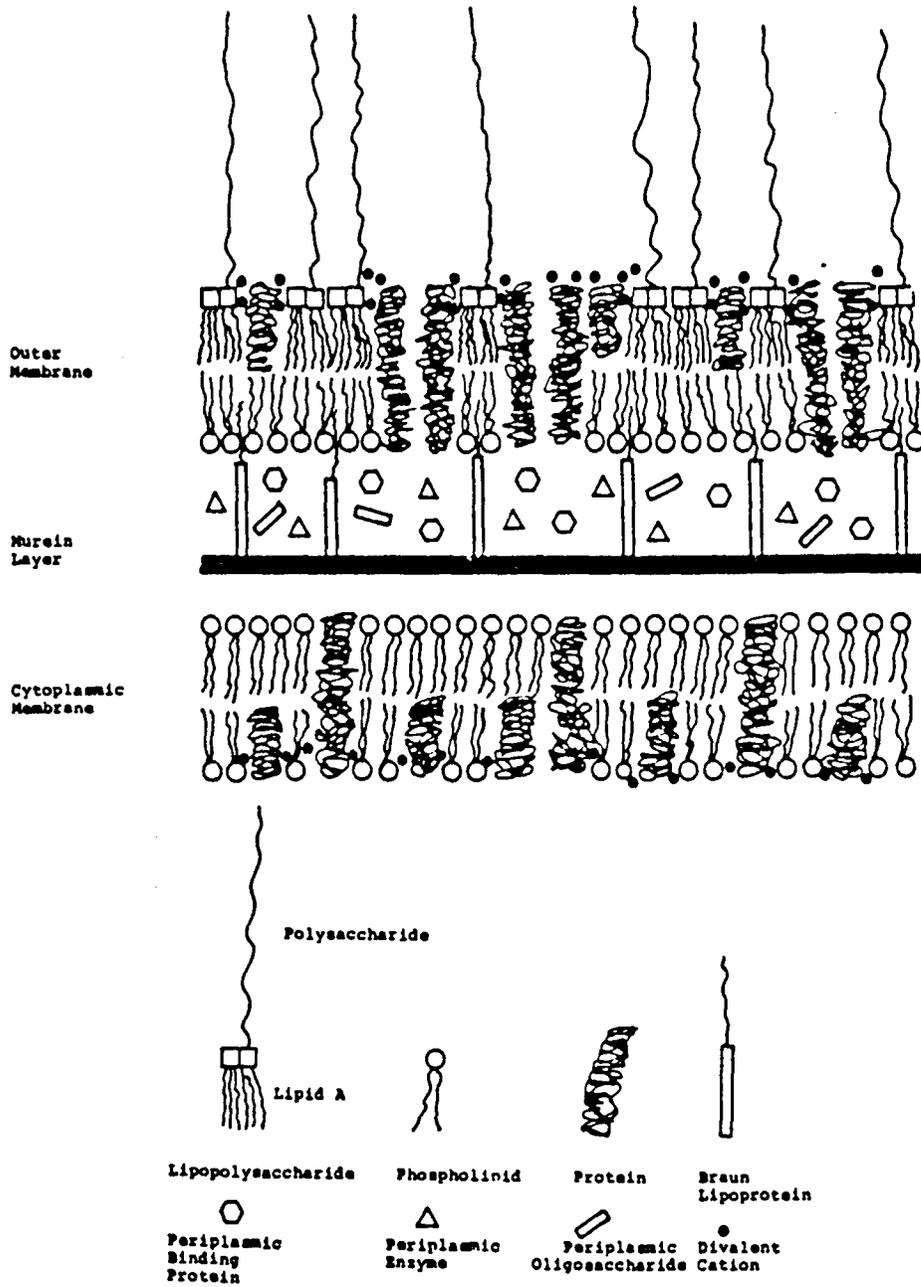
Nous avons vu précédemment, qu'il était possible de rendre des souches de Serratia marsecens très résistantes au cétrimide (FISHER 1952). Cette résistance, par adaptation progressive à des concentrations croissantes en ammoniums quaternaires, est perdue en une seule génération, si les cellules sont cultivées en absence de désinfectant. L'enrichissement des bactéries en composés lipidiques est à la base de cette résistance qui n'est pas plasmidique et dont l'induction demeure encore un mystère. Selon HUGO (1976), il s'agit d'un mécanisme de résistance non spécifique de réaction à un stress chimique. Les bactéries à Gram positif ne peuvent pas induire des résistances aussi importantes. Certains auteurs n'ont même jamais pu obtenir de souches de Staphylococcus aureus adaptées à la présence d'ammoniums quaternaires dans le milieu de culture (CHAPLIN 1952b). L'étude des mécanismes de résistance de type adaptatif, s'est surtout développée avec les bactéries à Gram négatif, notamment Pseudomonas aeruginosa qui possède une résistance naturelle à de nombreux antiseptiques. La paroi semble représenter l'obstacle le plus important à la pénétration des agents antiseptiques dans les cellules bactérienne. Les protoplastes (bactéries à Gram positif sans paroi) et les sphéropastes (bactéries à Gram négatif sans paroi) possèdent en effet une sensibilité égale aux ammoniums quaternaires.

La paroi des bactéries à Gram négatif est caractérisée par la présence d'une membrane externe composée de lipopolysaccharides (LPS), de phospholipides (PL) et de protéines. Cette membrane externe recouvre le peptidoglycane (mureïne) qui constitue l'ossature rigide de la paroi. Un diagramme schématique de la structure des enveloppes bactériennes de type Gram négatif est présenté dans la figure -9-. Une attention particulière doit être portée aux LPS dont la structure chimique est formée de trois éléments distincts : un noyau saccharidique ou "core" sur lequel se branche d'un coté, une chaîne polysaccharidique ou "side-chain" et de l'autre, un résidu de nature glycolipidique : le lipide A (NIKAIDO 1985).

La chaîne polysaccharidique, de longueur très variable, contient souvent des sucres atypiques et possède une antigénicité spécifique de type O (KARAMANOS 1983). Le lipide A est un glycolipide formé de résidus de glucosamine et plusieurs acides gras insaturés, dont des acides 3-OH alcanoniques. Le noyau est surtout riche en aldohéptose et en acide 2-kéto 3-déoxyoctonique (KDO) relié directement au lipide A (WILKINSON 1973, BENEDETTO 1976). Les LPS sont impliqués dans la résistance des bactéries à Gram négatif à de nombreux agents antimicrobiens comme les macrolides, la novobiocine, la rifampicine ou l'acide fusidique (NIKAIDO 1985). Ils empêcheraient ceux-ci d'atteindre leur cible en les bloquant au niveau de la membrane externe grâce à l'hydrophilicité de la chaîne polysaccharidique (EAGON 1984).

BROWN en 1965 remarque que la résistance acquise aux ammoniums quaternaires peut être éliminée en présence d'Ethylène Diamine Tétracétate (EDTA). Ce chélateur a pour effet de complexer les ions divalents Ca^{++} et Mg^{++} qui jouent un grand rôle dans la cohésion des structures pariétales de la bactérie (figure -9-). La cohésion des LPS est particulièrement dépendante de la présence de cations divalents qui neutralisent leur charge négative globale. L'effet de l'EDTA serait de disperser les couches lipopolysaccharidiques.

Les mutants LPS-déficients de Pseudomonas aeruginosa sont extrêmement sensibles aux détergents et désinfectants (KROPINSKY 1978). Ces mutants sont de type R ("Rough" : rugueux). Par rapport aux souches de type S ("Smooth" : lisse), la chaîne polysaccharidique des LPS de souches de type R contient moins de glucose, rhamnose et fucosamine (JARRELL 1977). La chaîne polysaccharidique des LPS de type R est ainsi beaucoup plus courte, ce qui nécessite une technique spéciale pour leur extraction (GALANOS 1969). Les parois des mutants R apparaissent plus perméables aux ammoniums quaternaires. L'accès à la membrane cytoplasmique est ainsi facilité (EL-FAHALA 1983). La modification des LPS de Pseudomonas aeruginosa peut également intervenir au niveau de la partie lipidique. Un mutant hyper-susceptible aux antibiotiques, s'est avéré déficient en dodécanoate et hexadécanoate (KROPINSKY 1982). Les LPS joueraient également un rôle important sur le comportement des porines, en association avec les ions Ca^{++} et Mg^{++} (PASTERNAK 1985).

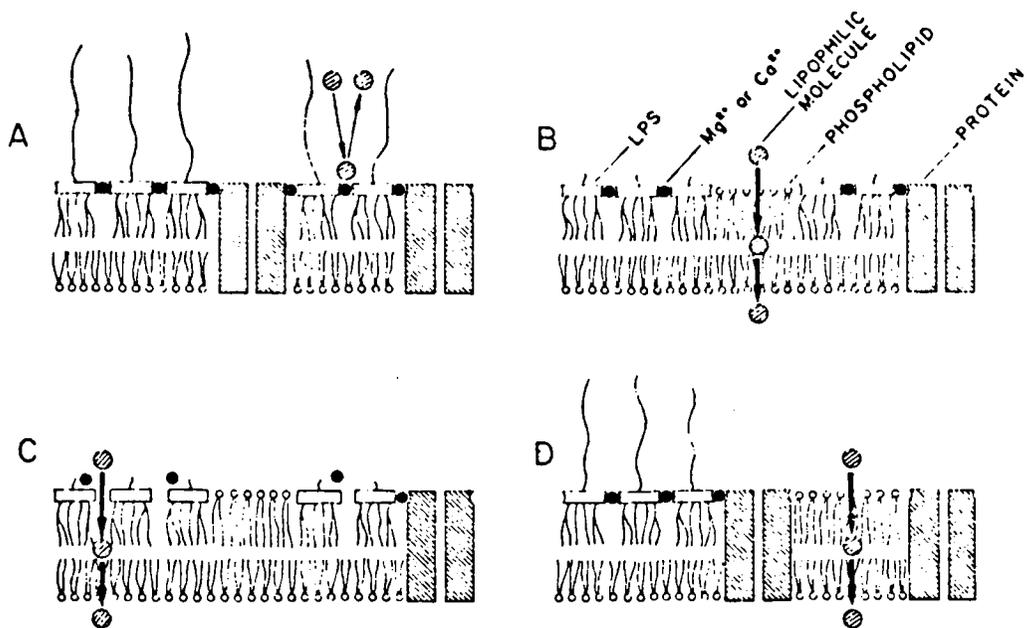


Schematic diagram of a gram-negative bacterial-cell envelope showing the outer membrane, murein (i.e., peptidoglycan) layer, cytoplasmic membrane, and the periplasmic constituents of binding proteins, periplasmic enzymes, and periplasmic oligosaccharide molecules.

Figure -9- : Les enveloppes membranaires des bactéries à Gram négatif (D'après BAGON 1984)

EAGON (1984) estime que la meilleure efficacité des LPS de Pseudomonas aeruginosa (par rapport aux LPS des Entérobactéries) tient à leur richesse en phosphore, à la présence d'oses atypiques et à leur taux important d'acide gras hydroxylés. Pour NIKAIDO (1985) les LPS de type R ne peuvent plus empêcher le passage des molécules lipophiles et l'EDTA découvre les phospholipides, qui sont alors accessibles aux agents antimicrobiens (figure -10-).

Le renforcement de la résistance aux agents antimicrobiens est souvent associé à la constitution par la bactérie d'une paroi plus riche en LPS. On rencontre ainsi des résistances importantes à la polymyxine et aux ammoniums quaternaires chez Salmonella typhimurium (LOUNATMAA 1976), à la carbénicilline et à la gentamycine chez Pseudomonas aeruginosa (KATSORCHIS 1985), à l'activité bactéricide du sérum chez Haemophilus influenza (GILSDORF 1986).



Hypothetical structure of outer membrane in the wild type, deep rough mutants, and EDTA-treated wild-type cells of *E. coli* and *S. typhimurium*. (A) Wild-type strain in which the outer leaflet is almost entirely composed of LPS and proteins. (B) Deep rough mutants. Hydrophobic molecules are assumed to penetrate through the phospholipid bilayer domains. (C) Deep rough mutants. Hydrophobic molecules are assumed to penetrate through the LPS domains, which could have become more permeable due to alterations in LPS structure. (D) EDTA-treated wild-type cells. Phospholipid molecules are assumed to fill the void left by the selective removal of LPS by EDTA.

Figure -10- : Incidence des LPS de type R et de l'EDTA sur la perméabilité de la membrane externe aux molécules lipophiles (D'après NIKAIDO 1985)

Tous ces auteurs ont pu remarquer la formation d'extrusions et de vésicules à la surface des parois. Ce serait une conséquence de la désorganisation de la membrane externe (KATSORCHIS 1985).

L'enrichissement en lipide peut également venir d'une modification du taux de phospholipide et d'acides gras (SULING 1977). Les souches d' Escherichia coli résistantes à la polymyxine montrent une plus grande richesse en diphosphatidylglycérol et d'importantes modifications dans la composition de leurs acides gras insaturés et des composés cyclopropanoïques. Les LPS interagissent fortement avec les antibiotiques polycationiques (MOORE 1986).

4.2) Résistance plasmidique

A notre connaissance, un seul cas de résistance transmissible génétiquement a été décrit. Il a été mis en évidence en Australie chez des souches multirésistantes de Staphylococcus aureus (GILLESPIE 1985). Plusieurs plasmides portant un gène de résistance aux ammoniums quaternaires (Qa^r) et au bromure d'éthidium (Eb^r) ont été découverts. L'un d'entre-eux est un plasmide (pSK1) d'environ 18 Mégadaltons (Md) qui code également pour la résistance à trois aminoglycosides (Gentamycine, Kanamycine et Tobramycine) grâce à l'insertion dans sa séquence du transposon Tn 4001 (Gm^r, Km^r, Tm^r). La séquence codant Qa^r, Eb^r n'appartient pas au transposon Tn 4001 (résistance non croisée). Un fragment de 5,3 kilobases (Kb), issu de la digestion du plasmide pSK1 par l'enzyme de restriction Hind III, a pu être inséré dans le vecteur plasmidique pBR322 puis cloné sur Escherichia coli K12 (TENNENT 1986). La résistance des souches ainsi transformées a été multipliée par 8 pour le bromure d'éthidium, par 5 pour le chlorure de benzalkonium et par 3 pour le cétrimide. Le plasmide pSK1 appartient au même groupe d'incompatibilité que des plasmides codant pour la résistance aux métaux lourds. Un autre plasmide (pSK57), qui appartient à un groupe différent et code pour une pénicillinase, a été isolé (GILLESPIE 1986). Ce plasmide possède une séquence, portant Qa^r et Eb^r, identique à celle du plasmide pSK1. Les auteurs cherchent à déterminer l'appartenance éventuelle du gène Qa^r et Eb^r à un transposon. Malheureusement, le déterminisme phénotypique de cette résistance n'a pas encore été étudié.

Il semble toutefois, que les bactéries résistantes soient plus réfractaires aux détergents et colorants cationiques (bromure d'éthidium et acrifavine) et donc que les composés ne traversent plus aussi facilement la paroi. L'hypothèse d'un renforcement des structures pariétales par une couche de polysaccharides capsulaires est la plus probable.

Certains plasmides de résistance induisent des modifications des surfaces cellulaires (CURTIS 1974). La résistance aux aminoglycosides (kanamycine, neomycine...) n'est pas toujours liée à la synthèse par la bactérie d'une aminoglycosidase. On constate alors que les membranes deviennent imperméables aux antibiotiques et que dans ce cas, il existe toujours une résistance croisée avec tous les aminoglycosides (PHILLIPS 1984). Certains auteurs ont voulu savoir si le renforcement des structures pariétales pouvait induire des résistances croisées avec des antiseptiques de classes différentes. Les facteurs R ont fait l'objet d'études importantes parce qu'ils sont faciles à cloner (DAVIES 1972). AHONKHAI (1979) a cherché à établir l'existence de résistances croisées à différents antiseptiques, dues à la présence du facteur RP1, qui code des résistances à la tétracycline, la kanamycine et la carbenicilline. Une absence totale de résistance croisée a été constatée. Ce même auteur a obtenu le même résultat avec le transposon Tn 501 codant la résistance à des sels de mercure (AHONKHAI 1984). L'induction de résistance, par modification de la membrane externe, est donc assez spécifique. Les entérobactéries très résistantes aux détergents anioniques les plus puissants (SDS à 5 %) sont sensibles aux détergents cationiques (KRAMER 1984).

4.3) Autres types de résistance

Un des mécanismes probables de résistance consiste pour la bactérie à synthétiser et excréter des substances qui vont neutraliser l'action de l'antiseptique. Escherichia coli et Salmonella minnesota sont ainsi capables de libérer de grandes quantités de LPS dans le milieu de culture (JANDA 1971). La présence de benzalkonium dans le milieu de culture induit la production de polysaccharides acides par Enterobacter cloacae (NISHIKAWA 1979). Seuls les ammoniums quaternaires alkylés peuvent provoquer cette synthèse. Le benzalkonium pourrait agir sur l'enzyme responsable de la synthèse.

La résistance est probablement due à la fois à la présence des polysaccharides et à l'acidification du milieu (les pH acides minimisent en effet l'action des ammoniums quaternaires). Le glycocalyx développé par les bactéries lorsqu'elles se fixent sur un substrat solide, semble constituer un obstacle supplémentaire à la pénétration des antiseptiques (NICKEL 1985).

Pseudomonas aeruginosa sécrète une quantité importante de pigments pyrocyaniques en présence d'agents antimicrobiens en général et d'ammoniums quaternaires en particulier (BROWN, 1971, AL-ANI 1985). On ignore cependant si ce phénomène est véritablement un système de défense contre les antibiotiques ou le symptôme de dérèglements occasionnés par les antiseptiques. Toutefois certains plasmides de résistances, découverts chez Staphylococcus aureus, codent pour la synthèse d'un pigment diffusible (TOWNSEND 1985).

Il ne semble pas exister d'enzymes, hydrolysant les ammoniums quaternaires, qui soient aussi efficaces que les β -lactamases ou la chloramphénicol acétyl transférase. L'étude de la biodégradation des ammoniums quaternaires dans divers écosystèmes apporte quelques indications. VENTULLO (1986) a découvert que l'exposition chronique de populations bactériennes lacustres au cétrimide induit la formation de formes adaptées chez toutes les espèces microbiennes. Il constate surtout une augmentation sensible mais encore faible de la biodégradation du désinfectant. La mise en évidence la plus nette d'une activité de dégradation d'ammoniums quaternaires a été faite par DEAN-RAYMOND (1977). Il s'agit d'une bactérie du sol (Xanthomonas sp.) qui possède une activité β -oxydative. Seuls quelques composés (2 sur 10 testés) qui possèdent une chaîne aliphatique à 16 atomes de carbone sont oxydés. L'attaque commencerait par le carbone terminal du groupement alkyl. L'activité enzymatique n'est toutefois induite que lorsque les ammoniums quaternaires constituent la seule source de carbone.

4.4) Conclusions

Il existe différents types de résistances possibles. La résistance la plus efficace consiste pour la bactérie à rendre les enveloppes membranaires imperméables aux détergents cationiques.

Nous avons pu remarquer que l'obtention d'une résistance à un ammonium quaternaire particulier, confère au microorganisme la résistance à l'ensemble des ammoniums quaternaires, probablement parce qu'ils agissent tous selon les mêmes modes d'action. Ce mécanisme ne semble pas permettre l'obtention de multi-résistances croisées. Les composants membranaires qui stoppent les détergents cationiques ne sont pas ceux qui arrêtent les aminoglycosides ou les métaux lourds : Les LPS et les phospholipides semblent jouer ce rôle.

L'existence de plasmides de résistance a longtemps été considérée comme impossible. Les plasmides découverts en Australie chez Staphylococcus aureus vont probablement relancer les études dans ce domaine. On ignore encore ce que codent ces plasmides. Ils pourraient induire la formation d'une capsule polysaccharidique, mais aussi coder pour une enzyme ou un composé capable de neutraliser les ammoniums quaternaires. Quel que soit le mécanisme, il ne semble agir que sur les seuls ammoniums quaternaires.

5) Facteurs physico-chimiques influençant le pouvoir antiseptique

5.1) Influence de la température

La température permet une plus grande solubilité des ammoniums quaternaires en relevant la C.C.M. lorsqu'elle devient plus élevée. L'augmentation de l'activité antiseptique est très sensible puisque les ammoniums quaternaires sont notablement plus actifs quand on les utilise à la température de 55°C qu'à 20°C (FREKE 1981). Ils sont alors 100.000 fois plus efficaces contre Escherichia coli. Le tableau -VII- montre que l'activité du chlorure de cétylpyridinium est plus importante à 37°C qu'à 20°C. KOURAI (1985a) a pu montrer que la température accélère et favorise l'adsorption du désinfectant par les surfaces membranaires. GELINAS (1984a) a pu montrer que le chlorure de benzalkonium est encore très actif à basse température. Ils conservent, à 4°C, 70 % de leur activité à 20°C. Les ammoniums quaternaires sont en général stables à haute température et peuvent subir un traitement à l'autoclave. Ils se conservent bien et ne sont pas sensibles aux phénomènes de photodécomposition (GELINAS 1982b).

	Dilutions stérilisantes			
	37°C		20°C	
	sans sérum	10% sérum	sans sérum	10% sérum
<u>Staphylococcus</u>				
<u>aureus</u>	1/110.000	1/11.500	1/67.500	1/6.750
<u>Salmonella</u>				
<u>typhi</u>	1/83.500	1/4.000	1/62.500	1/1.300

Tableau -VII- : Influence de la température et de la présence de matière organique sur le pouvoir bactéricide du chlorure de pyridinium (D'après PETROCCI 1977)

5.2) Influence du pH

Les pH basiques sont favorables à l'action des ammoniums quaternaires. Le cétrimide a une activité stérilisante trois fois plus rapide à pH 10,6 qu'à pH 9 (HUGO 1976). L'activité sporostatique ne se manifeste qu'à pH basique (RUSSELL 1977). FISHER (1952) obtient des bactéries résistantes à 1 mg/ml de chlorure de benzalkonium en trois étapes si les bactéries sont cultivées à pH 6,8 et en 20 étapes à pH 7,7. Cette dépendance indique selon HAMILTON (1971) que la partie hydrophobe joue un rôle primordial dans le mode d'action. Il pourrait s'agir selon NEWTON (1958) d'une modification de sensibilité de la bactérie. Cependant les composés anioniques sont favorisés par les pH acides. Le pH agirait surtout sur la constante d'équilibre entre les molécules libres et les micelles. La concentration en formes actives libres serait plus importante aux pH alcalins qu'aux pH acides (KOSTENBAUDER 1977).

5.3) Antagonisme et synergie

5.3.1) Antagonisme

Les substances interférentes ou antagonistes de l'action des ammoniums quaternaires peuvent être classées en trois catégories.

La première est formée des composés qui, par leur affinité naturelle, vont se combiner avec les ammoniums quaternaires pour former un complexe insoluble irréversible. L'une des principales propriétés des ammoniums quaternaires est leur capacité à précipiter avec de nombreuses macromolécules. La présence de substances de ce type dans le milieu réactionnel va entraîner une consommation en éléments actifs qui ne pourront pas agir sur les cellules (KOSTENBAUDER 1977). L'exemple le plus évident est celui de l'interaction avec les protéines (CALDWELL 1961). Le sérum albumine bovine diminue notablement le pouvoir germicide des ammoniums quaternaires (Tableau -VII-). Le lait est recommandé pour éliminer les ammoniums quaternaires résiduels des canalisations (WILDBRETT 1985). Cependant, les matières organiques interagissent et inhibent la plupart des désinfectants à des degrés divers (GELINAS 1983b, LONCIN 1986) et les détergents cationiques sont parmi ceux qui y résistent le mieux (LAWRENCE 1970). Les ammoniums quaternaires peuvent également s'adsorber sur des surfaces solides pour peu qu'elles portent une charge électrostatique négative. C'est le cas par exemple des surfaces silicylées (DANIELS 1985) ou métalliques (HELLMANN 1984). De même la présence d'une phase organique où ils sont plus solubles entrainera une diminution notable de la concentration en éléments actifs dans la phase aqueuse.

La seconde catégorie est formée par les substances inhibitrices dites neutralisatrices. Les lipides et composés lipidiques, ainsi que les détergents anioniques et non-ioniques, peuvent s'associer aux ammoniums quaternaires par interaction électrostatique ou hydrophobe pour former un complexe ou une micelle soluble mais inactive (HAMILTON 1971). Le mélange polysorbate 80 (3 %), lécithine d'oeuf (0,3 %) et laurylthiosulfate de sodium (0,5 %) est particulièrement efficace (REYBROUCK 1979).

La troisième catégorie de substances antagonistes est celle des composés qui renforcent la résistance des bactéries à l'antiseptique. Le calcium et le magnésium, en consolidant les structures pariétales des bactéries, jouent ce rôle. AL-HITI (1980) a montré que Pseudomonas aeruginosa devient cinq fois plus résistant au chlorure de benzalkonium s'il est cultivé sur un milieu riche en glycérol. GEPTIC (1979) déconseille l'utilisation d'ammoniums quaternaires dilués dans une solution d'acétate d'ammonium, pour que les bactéries ne disposent pas d'une source de carbone et d'azote.

5.3.2) Synergie

Les principaux composés capables d'avoir une action de synergie sont ceux qui sensibilisent les cellules à l'action des ammoniums quaternaires. L'EDTA complexe les ions bivalents de la paroi qui devient plus perméable. Pseudomonas aeruginosa devient particulièrement sensible aux ammoniums quaternaires en sa présence (KENWARD 1979). Les alcools, en mobilisant partiellement les composants lipidiques des parois, préparent bien l'action des ammoniums quaternaires. Les protamines et les alkylamines ont également cette action (ALLEN 1985). Les cellules traitées par des lipases deviennent hypersensibles (NEWTON 1958).

Les agents mouillants non-ioniques forment un cas particulier : à faible dose (100 µg/ml), ils facilitent l'adsorption des ammoniums quaternaires par les membranes (RICHARDS 1980). Le polysorbate 80 ou les polypropylène-glycols sont ainsi ajoutés à de nombreuses préparations commerciales de désinfectants à base de détergents cationiques (INTERKEMIA 1985, WOSCINSKI 1985). A forte concentration (30 mg/ml), le polysorbate 80 neutralise ces mêmes ammoniums quaternaires.

Il est possible d'obtenir une synergie par les ions accompagnateurs. Les sels d'iode sont encore actifs en présence de savon. REBOLD (1958) recommande l'association avec le 2-mercapto benzothiazolate qui potentialise leur pouvoir antiseptique. Les dérivés de la 4-isothiazoline sont également plus actifs en présence de chlorure de benzalkonium (LAW 1979).

Les ammoniums quaternaires entrent en synergie avec de nombreux désinfectants comme le m crésol. Ils facilitent la pénétration des organomercuriels et des métaux lourds (HUGBO 1977). L'association du salicylate de déqualinium avec l'hexetidine (FROSCH 1978) ou celle du chlorure de benzalkonium avec la chlorhexidine (STOLZ 1985), sont jugés très bactéricides.

Un mélange composé de gramicidine, de chlorure de cetylpyridinium et de 2,4-dichloro benzylalcool est fortement fongicide. Le mélange avec l'hexachlorophène est par contre fortement déconseillé (GUMP 1982).

Disinfectant group	Mode of action	General reactivity	Heat and light stability	Tolerance to organic matter	Temperature dependance + E _a	Low temperature efficacy
1. Sodium hypochlorite	General cell oxidation	High	Low	Low	Low	High
2. Iodophor	General cell permeability denaturation	↑	↓	↓	↓	↑
2. Acid-anionic surfactant						
Quaternary ammonium compound						
Aldoquaternary complex						
3. Chlorhexidine acetate	General cell permeability denaturation	↑	↓	↓	↓	↑
Amphoteric surfactant						
4. Glutaraldehyde	Fixation of external cell layers	Low	High	High	High	Low

Tableau -VIII- : Classification de huit désinfectants en fonction de leur tolérance vis-à-vis de divers facteurs physico-chimiques (d'après GELINAS 1984)

Il existe enfin certains cas particuliers comme l'acide undécylénique qui augmente l'activité du bromure de domiphène sur Candida albicans et Trichophyton mentagrophytes. Appliqué sur les bactéries, il provoque un antagonisme comme tous les acides gras (KULL 1961). Certaines compositions thérapeutiques associent des ammoniums quaternaires avec de l'ADN (FLECCHIA 1985). Ce mélange aurait des propriétés à la fois bactéricides et cicatrisantes.

5.4) Conclusions

Comparativement aux autres désinfectants, les ammoniums quaternaires résistent bien aux divers effets neutralisants que nous venons de voir. Le tableau -VIII- est un classement établi par GELINAS (1984) sur huit désinfectants représentatifs des principaux groupes.

Les ammoniums quaternaires doivent donc être utilisés en prenant certaines précautions d'usage :

- Tenir compte du taux de matière organique dans la préparation des solutions désinfectantes.
- Rincer abondamment les surfaces qui ont été en contact avec des savons.
- Utiliser des produits complémentaires en association (tuberculocides, sporicides).

II. LES BIOTEXTILES

Notre propos est ici d'introduire, d'une part, certaines notions propres à l'industrie textile et, d'autre part, de faire l'état des principaux procédés de fabrication des textiles antimicrobiens. Ces procédés font souvent appel aux techniques dites d'ennoblissement textile. Nous avons donc choisi de présenter d'abord le coton qui constitue le support de fixation de nos ammoniums quaternaires. Nous présenterons ensuite les principales méthodes d'ennoblissement textile en nous servant du coton comme exemple. Ces deux premiers chapitres serviront de base à la présentation des biotextiles en général et du procédé de fabrication sur lequel nous avons travaillé en particulier.

1) Le coton

1.1) La production du coton

Le coton est la plus importante fibre textile utilisée sur Terre. Sur les 30 millions de tonnes de fibres produites en 1980, le coton occupe 40 % du marché et ses dérivés chimiques (viscose, rayonne) 21 %. Il est de très loin la plus importante source de fibres végétales.

Le cotonnier est probablement originaire des Indes d'où ils s'est répandu progressivement dans les zones chaudes du globe en se diversifiant. Selon toute vraisemblance, les premiers utilisateurs du coton furent les égyptiens qui en faisaient des vêtements dès 3.000 ans avant J.C. Les cotonniers font partie de la famille des Malvacées où ils sont regroupés dans le genre Gossypium, qui compte 40 à 50 espèces dont quatre seulement sont utilisées dans l'industrie cotonnière.

Gossypium barbadense est originaire d'Amérique du Sud. De cette espèce, qui a surtout été développée en Egypte vers 1850, ont été tirées toutes les variétés modernes dites "longues soies". Elles fournissent un coton d'excellente qualité, qui sert à l'élaboration des tissus les plus fins.

Gossypium hirsutum a donné naissance au coton "Upland" dont dérivent toutes les variétés dites "moyenne soie". 80 % de la production mondiale de coton est fournie par cette espèce originaire d'Amérique Centrale. Gossypium hirsutum a surtout été développé dans le Sud des Etats-Unis. Il sert à la fabrication des articles textiles de qualité courante.

Gossypium arboreum et Gossypium herbaceum sont tous deux cultivés en Inde. Ils tendent actuellement à disparaître à cause de la faible longueur de leur fibres. Ce sont des cotons "courte soie", qui ne sont plus guère utilisés que dans la ouaterie.

La fibre de coton est constituée d'une unique cellule issue de l'épiderme de la graine. A maturité, cette cellule peut former un poil 2500 fois plus long que large. Chaque graine porte en moyenne 10.000 fibres. La cueillette consiste à récolter les capsules mures du cotonnier. Les capsules, qui renferment 7 à 9 graines, sont séchées puis égrénées mécaniquement. A la suite de l'égrénage, le coton brut est comprimé pour former des balles. La balle constitue l'unité de production ; elle équivaut à 216,8 kg. Les graines des quatre espèces de cotonnier portent également des poils très courts : les linters. Ceux-ci sont des sous-produits du coton que l'on utilise en industrie chimique comme source de cellulose (figure -11).

Les opérations fondamentales que subit le coton après l'égrénage sont : Le nettoyage (élimination de la poussière terrestre, des débris végétaux ou de coques), le démêlage ou cardage qui permet l'assemblage du coton en fibres parallèles (passage de la bourre au ruban) et enfin l'affinage (régularisation du ruban). Le coton peut être utilisé pour la fabrication d'articles non-tissés ou filé pour la fabrication de tissus (tissage ou tricotage).

Le principal critère de qualité du coton est la longueur de la fibre. Elle se mesure à 21°C et à 65 % d'humidité relative. Les soies dites "courtes" font moins de 2,5 cm de longueur, les soies "moyennes" doivent mesurer entre 2,6 et 2,8 cm, les soies "longues" ont plus de 2,85 cm de longueur. L'épaisseur moyenne d'une fibre est de 32 µm. Le coton constitue la source de cellulose la plus pure (95 % du poids sec). Les autres constituants du coton sont des substances pectiniques, des protéines, des sels minéraux et des cires.

Figure -11- : fibres
longues et courtes
(linters) de la graine
de coton
(d'après TURBAK 1982)

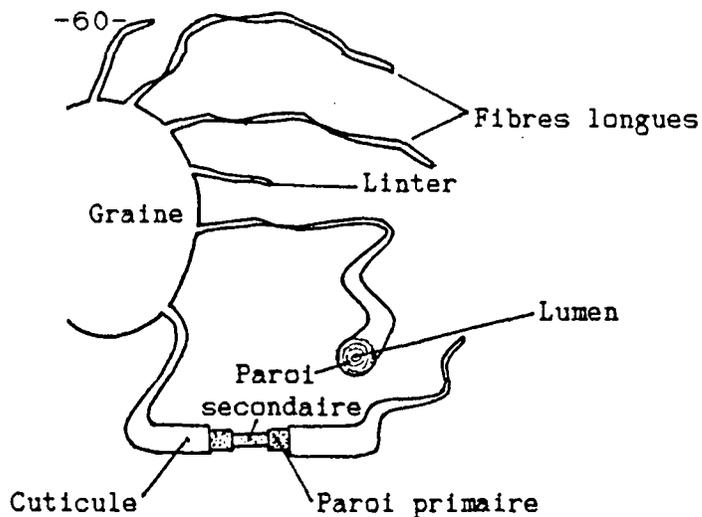


Figure -12- : Coupe d'une fibre
de coton
(in Encyclopaediae universalis 1985)

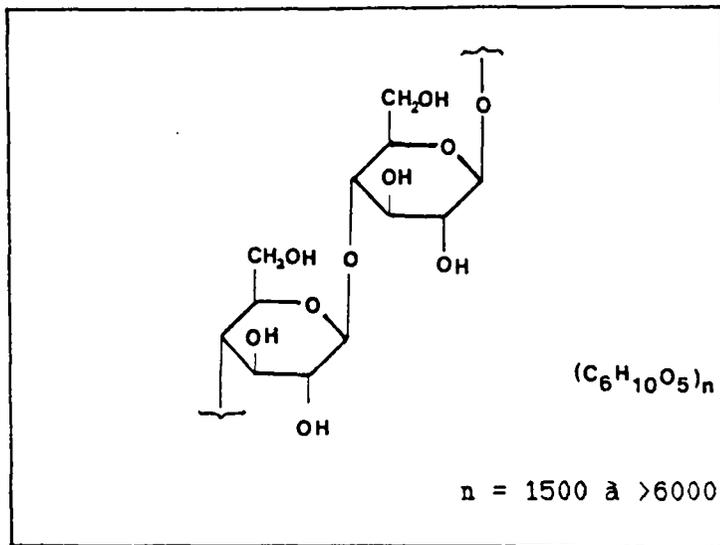
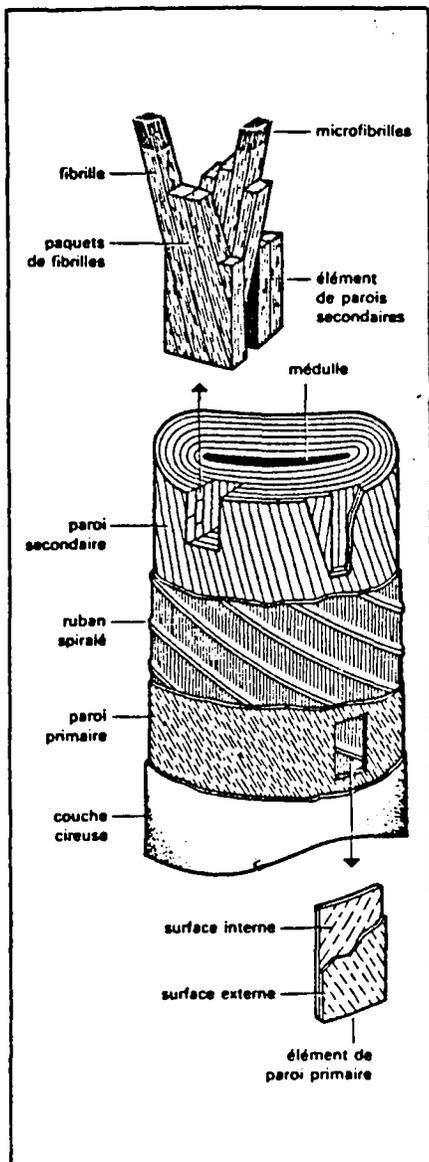


Figure -13- : Formule chimique
de la cellulose
(motif de β -cellobiose)

1.2) La structure du coton

La fibre est structurée en quatre couches (figure -12-). L'enveloppe la plus externe (cuticule) est essentiellement composée de cires et de pectines. La couche sous-jacente est une assise pectino-cellulosique dite "paroi primaire". Il s'agit de la première enveloppe synthétisée par la cellule. Le ruban spiralé est une couche unique plus interne, formée de paquets de fibrilles non orientées dans l'axe de la cellule. La structure la plus interne et la plus importante est la "paroi secondaire", constituée de cellulose pure. Au cours de sa maturité, la cellule dépose une couche de cellulose pure par jour. Au terme de cette évolution, la paroi secondaire forme un cylindre rigide de 20-50 couches de lamelles hélicoïdales. Le pas de cette structure s'inverse de temps à autre ; cela donne à la fibre une forme plus ou moins vrillée. Ce vrillement joue un grand rôle dans la cohésion des fibres entre-elles pour les opérations de filature. L'unité structurale de la paroi secondaire est la microfibrille qui fait 3 à 5 nm de diamètre pour 10 à 40 nm de long. L'unité moléculaire est un polymère non ramifié de β 1,4 D glucopyranoside (voir figure -13-).

2) L'ennoblissement textile

Outre les différentes opérations mécaniques, qui interviennent en cours de fabrication, les fibres peuvent subir un certain nombre de modifications par voie chimique. Ces traitements permettent de conférer à un fil ou à un tissu écriu des qualités décoratives ou d'usage recherchés par les utilisateurs : couleur, souplesse, résistance aux agents d'altération (lumière, lavage, microorganismes, feu). Ces opérations sont regroupées sous le terme d'ennoblissement textile.

2.1) L'affinage du tissu écriu

Le débouillissage fait disparaître les cires et les graisses du coton afin de le rendre plus hydrophile. Le traitement est réalisé par des lessives alcalines à 100°C ou plus grâce à des appareils autoclaves.

Le blanchiment élimine les impuretés qui altèrent la blancheur des fibres. Les principaux agents de blanchiment agissent par dégradation oxydative de la lignine. On utilise le chlore sous forme d'hypochlorite (eau de Javel) ou l'oxygène sous forme de peroxyde (eau oxygénée).

Le flambage consiste à détruire les duvets et fibrilles qui dépassent de la surface du tissu de coton. Avant le tissage, les fils de coton sont encollés avec des produits amylicés. L'opération a pour but d'empêcher l'éraillage des fibres durant le tissage, afin d'éviter que les machines s'obstruent et que les fils cassent. Après le tissage, il faut procéder au désencollage en faisant agir des diastases.

Le mercerisage est un traitement spécifique du coton destiné à lui donner un aspect brillant et soyeux et qui présente l'avantage supplémentaire d'accroître sa résistance mécanique. La fibre est traitée, sous tension constante, avec une solution de soude à froid ou à chaud. Un traitement plus poussé consiste à utiliser de l'ammoniac liquide. Le mercerisage donne une meilleure accessibilité à la cellulose, qui devient plus réactive. On parle de cellulose I pour la fibre naturelle débouillie, de cellulose II après traitement à la soude et de cellulose III après passage dans l'ammoniac liquide. Lorsque le coton n'est pas mercerisé sous tension constante, on obtient du "stretch coton" qui possède d'importantes propriétés élastiques mises à profit pour fabriquer des pansements.

2.2) Le finissage

Lorsque la fibre est suffisamment accessible et nettoyée, il est possible de procéder à de nouvelles opérations dites de finissage, qui ont pour but de renforcer certaines caractéristiques du textile ou de lui faire acquérir de nouvelles propriétés. On utilise, pour ce faire, des apprêts qui sont retenus par le textile par affinité électrostatique ou fixés par interaction chimique.

Les fonctions -OH en position 2,3 et 6, des unités de glucose de la cellulose, peuvent réagir et intervenir dans des réactions chimiques diverses. Ainsi, des réactions d'estérification sont possibles avec de nombreux acides inorganiques (nitrate, sulfate ou phosphate de cellulose) ou organiques (acétate de cellulose). Les phosphates de cellulose sont des apprêts ignifuges ou antipyrrogènes qui évitent ou freinent la propagation des flammes. L'acétylation donne au coton une grande tolérance aux hautes températures. Parmi les autres esters de cellulose, le sulfate de cellulose est très hydrophile tandis que les esters d'acides gras permettent d'obtenir un effet adoucissant ou hydrofuge. Certaines teintures sont fixées à la fibre en faisant réagir des groupements phosphoniques ou phosphoriques des colorants.

Le groupement méthylol ($-\text{CH}_2\text{OH}$) permet de réaliser des pontages entre les chaînes de cellulose. Le tissu offre une meilleure stabilité dimensionnelle (apprêt irretrécissable) et une plus grande résistance aux contraintes (ténacité). Ces agents de pontage ont deux ou plusieurs groupements méthylols (diméthylolurée, diméthylol alkylcarbamate, méthylolmélamine.. etc). Les aldéhydes ($-\text{CHO}$) peuvent former un réseau qui donne plus de souplesse au tissu (phénolformaldéhyde, amine-aldéhydes, formaldéhyde... etc). Les radicaux époxydes ($-\text{CH}-\text{CH}_2$), vinyl ($-\text{CH}=\text{CH}_2$) méthylsulfate ($-\text{CH}_2-\text{SO}_3\text{H}$) ou cyanoéthyl ($-\text{CH}_2=\text{CHCN}$) sont également très utilisés (teinture, pontage, apprêts hydrophiles ou hydrofuges). La cyanoéthylation et l'aminisation du coton permettent l'attachement de nombreux pigments acides. Le greffage radio-chimique utilise des radiations à haute énergie (rayons gamma) pour faire réagir des radicaux normalement inertes (acrylonitrile, styrène). Ce traitement possède en outre l'avantage d'augmenter le nombre de radicaux réactifs et d'obtenir un coton à la fois plus souple et plus hydrophile, en dépolymérisant légèrement la cellulose. Un effet similaire moins important est obtenu par les ultra-violets (325-400 nm).

Une autre catégorie d'apprêtage, consiste à imprégner les cotonnades avec des produits qui possèdent une affinité naturelle pour la cellulose. Nous trouverons dans cette catégorie la plupart des ammoniums quaternaires et des détergents non-ioniques utilisés dans le textile. Les principaux effets recherchés sont les effets adoucissants, assouplissants, antiseptiques, insecticides et colorants. Certains apprêts sont hydrofuges comme le stéarochlorure de chrome ou les sels pyridinium de composés stéariques.

Lorsque le produit, que l'on veut appliquer, n'a pas de fonctions réactives, ni d'affinité pour la cellulose, il est nécessaire de faire appel à des liants ou des résines pour les fixer mécaniquement. Les résines thermosensibles sont polymérisées dans le coton et peuvent piéger des composés très divers. Certaines résines forment un réseau en réagissant également avec les fonctions $-\text{OH}$ de la cellulose. Les résines fluorées sont des apprêts antitaches et oléfuges qui empêchent les salissures de toute nature d'être absorbées et retenues par les fibres. De nombreuses résines aminées et siliconées sont également utilisées (apprêts indéfroissables).

L'industrie cotonnière a cédé beaucoup de place aux fibres synthétiques. La part du marché de ces dernières est passé de 1 % en 1952 à 33 % en 1980, essentiellement au détriment du coton. L'ennoblissement textile des fibres naturelles offre de grandes possibilités d'avenir. Il permet une diversification plus grande de produits jusqu'à présent traditionnels. Les fibres sont plus faciles à usiner. L'un des effets de cette technologie, est le retour d'articles 100 % coton dans la mode et sur le marché.

3) Les textiles antimicrobiens

3.1) Textiles et microorganismes

Les matériaux textiles sont en contact permanent avec les microorganismes présents dans leur environnement. Bactéries et champignons se développent ou se maintiennent à la surface des textiles. La présence de cette flore devient indésirable quand elle altère et détruit les fibres textiles ou menace la santé de l'Homme. Des textiles à propriétés antiseptiques sont, depuis ces dernières décennies, activement recherchés et développés dans le but d'éviter les inconvénients qui viennent d'être évoqués.

Le pouvoir antimicrobien d'un textile est recherché à différents degrés qui correspondent à l'effet souhaité par l'utilisateur.

Le premier effet, qui a été recherché, est la protection des fibres naturelles. Certains agents biologiques dégradent la fibre ou le tissu, qui constituent leur source d'alimentation principale. Les deux principaux fléaux sont les champignons cellulolytiques et certains insectes (Mc LAREN 1984). La laine est attaquée par certaines bactéries du genre Pseudomonas (LONDON 1983). Les apprêts antifongiques et antimites, appliqués à des tissus, formèrent les premiers biotextiles. Parmi les utilisateurs, on trouve l'industriel soucieux de la préservation de ses stocks de fibres. Des apprêts antifongiques à base de sels de zinc furent employés dès le XIXe siècle. A l'usage, certains matériaux sont fortement éprouvés comme les tentes ou les moquettes. DAVID (1972) rapporte que l'armée U.S. perdait vingt millions de dollars par mois en matériel moisi (tentes, uniformes), pendant la guerre du Viet-Nam.

Une seconde étape fut franchie lorsque les études épidémiologiques ont mis en évidence le rôle important des vêtements dans les transmissions de maladie. Les tissus souillés peuvent servir de vecteurs directs de la maladie ou émettre dans l'air des particules contaminées (DANNA 1978, ISOARD 1983). L'effet recherché a donc été la diminution du risque épidémiologique, en réduisant le nombre de germes vivant à la surface des tissus. L'activité antiseptique minimale doit être bactériostatique pour éviter la prolifération des agents de contamination et, si possible, réduire la population microbienne présente au niveau des fibres.

Certains domaines d'application (chirurgie, désinfection) exigent une activité antiseptique intense. Le tissu doit pouvoir réagir rapidement et de manière efficace à toute contamination externe pour empêcher l'installation d'une flore pathogène. Le principe est celui d'une fibre dite 'autostérile', qui ne pourra pas être une source de contamination. Les matériaux utilisés sont très variés et s'étendent aux articles non-tissés. Certains traitements antiseptiques sont applicables à des matières plastiques.

Un dernier degré est franchi par l'utilisation de fibres qui vont agir sur la surface avec laquelle ils sont en contact. L'effet recherché n'est plus préventif mais curatif (désinfection de la peau, cicatrisation).

Outre leurs propriétés désinfectantes, les biotextiles doivent posséder d'autres qualités. L'apprêt antimicrobien ne doit pas altérer les propriétés intrinsèques de la fibre (souplesse, élasticité, ténacité, hydrophilicité...etc). Il faut rechercher la stabilité dans le temps et surtout que le tissu garde son pouvoir désinfectant après lavage.

Enfin pour qu'un tissu antiseptique soit développé, il faut souscrire à une série de contrôles inhabituels en industrie textile. On touche, en effet, au secteur médical où la législation impose des normes sévères en matière de toxicologie et d'allergologie. La composition exacte des produits, que l'on veut homologuer, est également exigée.

3.2) Principes généraux sur les biotextiles

Le textile antimicrobien possède, selon GAGLIARDI (1962), une fibre (F) associée à un antiseptique (A), qui réagit avec avec les bactéries (B). Trois types de comportement sont discernables :

- FB + A -----> F + BA ↓ Stérilisation (1)
- FA + B -----> F + BA ↓ Bactéricide (2)
- FA + B <-----> FA.B ↓ Bactériostatique (3)

Le modèle (1) est celui d'un tissu contaminé, qui est désinfecté (détergent, javel...etc). Il ne correspond pas à la notion de "fibre autostérile", au contraire des deux autres modèles. Toujours selon GAGLIARDI (1962), le modèle (2) correspond à une action bactéricide rapide où l'antiseptique se détache facilement de la fibre pour agir. Dans le modèle (3), les bactéries meurent au contact de la fibre, qui retient fortement le produit actif. Les cellules bactériennes doivent aller au contact de l'antiseptique. L'action antimicrobienne est donc plus lente (faible mobilité du désinfectant) et se rapproche d'un effet bactériostatique. Les modèles (2) ou (3) se définissent en fonction de la force des liaisons qui relie fibre et antiseptique :



(4) permet de définir une constante de dissociation K, qui définit les concentrations à l'équilibre les formes FA, A et F :

$$K = \frac{[F]. [A]}{[FA]}$$

Dans le modèle (2), A est la forme active. Si K est grand, nous obtenons un effet antibactérien marqué mais peu durable. Une faible résistance au lavage de tissus de ce type est prévisible car A est faiblement retenu. Cet inconvénient peut être en partie évité en utilisant un antiseptique efficace à de faibles concentrations. Une constante K petite est ainsi envisageable. Dans ce type de biotextile, le principe actif est dit à "labilité contrôlée" (CHATELIN 1983).

La force croissante de l'association fibre-antiseptique sera dans l'ordre : l'association par effet polaire (affinité), par échange d'ions, par complexation. Le modèle (3) suppose que A est encore actif après fixation ou que K est très petit. Ces tissus résisteront mieux au lavage ; ils sont dits à "bioactivité fixe".

Les qualités du biotextile (activité antimicrobienne et rémanence de cette activité) sont donc définies par le mode d'attachement de l'antiseptique à la fibre, le niveau d'activité de l'antiseptique et la forme sous laquelle ce dernier est actif (A ou FA). La résistance au lavage doit être définie rigoureusement. Certains détergents inactivent les antiseptiques associés à la fibre. Un textile peut subir des conditions de lavages éprouvantes en milieu alcalin à 100°C, suivi d'une opération de blanchiment par oxydation (eau de javel). La résistance au lavage déterminera les conditions d'utilisation du biotextile (usage unique ou répété, nécessité de recharger le tissu en antiseptique). Certains biotextiles exigent des conditions de lavage particulières.

3.3) Les principaux types de biotextiles

Les biotextiles sont classés selon la nature de la liaison F-A. Quand K est grand (forme dissociée majoritaire), l'antiseptique est retenu par simple affinité ou liaison électrostatique faible. Quand K est petit (forme dissociée minoritaire), la liaison est électrostatique forte ou covalente faible (liaison facilement hydrolysable). Avec les liaisons de covalence fortes, il n'y a plus de constante de dissociation. Nous décrirons les différents types de biotextiles en fonction de la nature de l'interaction qui associe fibre et antiseptique.

3.3.1) Association par interactions polaires

Nombre des apprêts antimicrobiens de ce type, sont utilisés dans des opérations de finissage pour rendre les fibres textiles inattaquables par les agents biologiques. Le principe simple consiste à tremper les tissus dans une solution d'antiseptiques. L'antiseptique s'adsorbe plus ou moins bien sur les fibres. Longtemps limité aux seuls apprêts antifongiques, ce système s'est développé avec la découverte du pouvoir antimicrobien des ammoniums quaternaires par DOMAGK (1935).

Mc NEIL (1961) rapporte l'utilisation de treillis imprégnés de chlorure de benzalkonium par les troupes allemandes pendant la seconde Guerre Mondiale. Les soldats ainsi équipés, ont été moins sujets aux infections secondaires à la suite de blessures. Dès 1955, BLOWERS recommande l'usage de draps imprégnés de cétrimide, à des fins prophylactiques. De nombreuses préparations sont apparues depuis à base de sels de salycilanilides, sulfate de néomycine, acétate de phényl mercurique, hexachlorophène et autres composés phénolés (GAGLIARDI 1962).

Les ammoniums quaternaires gardent cependant une place importante dans ce domaine. Ils possèdent en effet une affinité importante avec de nombreuses fibres naturelles telles la laine (LEAL 1983, Mc LAREN 1984) ou les matériaux cellulosiques (WHITE 1970, UETA 1984), ainsi que pour certaines fibres synthétiques comme les polypropylènes, polyesters et polyamides (GINN 1970). Le traitement de tissus de coton par le chlorure de benzalkonium est souvent appliqué (Mc NEIL 1963). De nombreuses préparations à base d'ammoniums quaternaires sont commercialisées pour la protection du coton (RIEDMANN 1984). Nous signalerons, par ailleurs, l'apparition récente des ammoniums quaternaires organosiliconés, qui possèdent une affinité remarquable pour la cellulose (EUDY 1981, SANYO 1985). Dans certains apprêts, on conjugue à la fois les pouvoirs adoucissants, antistatiques et antimicrobiens des ammoniums quaternaires (LION 1985). Pour les hôpitaux, des solutions désinfectantes et parfumantes sont proposées pour traiter les alèses après chaque lavage (BLUM 1985).

Le système de l'apprêt antimicrobien présente l'inconvénient d'être peu rémanent et l'avantage d'agir très rapidement. De plus, surtout en ce qui concerne les ammoniums quaternaires, les lessives comportent des substances inactivatrices comme les savons ou les polyphosphates (GAGLIARDI 1962). Les tissus doivent être rechargés régulièrement en antiseptique. La rémanence des apprêts antimicrobiens dépend de leur affinité avec le tissu. L'activité subsiste cependant rarement après 4-5 lavages par des lessives classiques. Des développements importants subsistent en usage unique (sans lavage). Le chlorure de benzalkonium sert ainsi à traiter certains pansements de stretch coton (OITA 1980) ou des filets de polyamide à usage chirurgical (PHARMACHIM 1979).

Il y a aussi des applications dans la confection de champs opératoires "autostériles" en non-tissé. Des sels d'ammoniums quaternaires sont parfois inclus dans certaines émulsions pour obtenir des peintures antifongiques, voire bactéricides (HOFFMAN 1955, BARRY 1978).

3.3.2) Association par interactions ioniques

Afin d'obtenir un pouvoir antiseptique qui résiste mieux aux lavages, il convient de retenir plus fortement les produits désinfectants. A ce niveau, interviennent toutes les opérations d'ennoblissement textile permettant le greffage de radicaux intéressants à la fibre. on obtient le système suivant :



R est une molécule qui possède un groupement capable de réagir avec la fibre F pour former une liaison stable. R possède en outre un radical ionisable qui retient l'antiseptique A de charge opposée.

Grâce aux interactions ioniques, on peut retenir des antiseptiques anioniques (hexachlorophène, bithionol, acide carbamique) par des fibres cationiques. Les fibres anionisées retiennent des antiseptiques cationiques (Métaux lourds, organométalliques, ammoniums quaternaires). Dans ce dernier groupe, on compte les biotextiles les plus efficaces comme les cotons anionisés et traités avec des sels de mercure, zinc ou argent. Leur action antifongique (Zn, Hg) ou bactériostatique (Ag, Hg) résiste à 10-15 lavages par un détergent anionique. Les ammoniums quaternaires sont évidemment très fortement retenus par les fibres anioniques. Par vinylation du coton, MUNE (1979) a obtenu des tissus capables de retenir assez d'ammoniums quaternaires pour inhiber des suspensions de 10^5 - 10^6 cellules bactériennes ou spores de champignons par cm^2 en 18 heures d'incubation. Ce tissu conserve son pouvoir après 720 lavages à l'eau claire avec un rapport de bain important (25 cm^2 de tissu pour 5 litres d'eau). Le brevet fait silence sur la durée du traitement après lavage avec des savons. En effet, malgré les interactions électrostatiques, les ammoniums quaternaires sont rapidement éliminés en présence de savon.

PAULUS (1971) l'a constaté avec des cotons anionisés par des dérivés acides de la triazine et traités au chlorure de benzalkonium. Après 5 lavages, il n'y a plus aucune activité. Dans les brevets récents, les iodures d'ammoniums quaternaires organosiliconés sont utilisés très souvent. Les tissus obtenus semblent moins neutralisables par les savons. On trouve ainsi des fibres de polyester carboxylées (TOYOBO 1984b) ou des acryliques (SHIGITA 1985b) qui ne perdent que 30 % de leur activité bactéricide après 20 lavages.

Les ammoniums quaternaires peuvent eux-mêmes servir d'ancrage à d'autres composés antimicrobiens. Le polytétrafluoroéthylène (PTFE) est par exemple très affine pour les détergents cationiques. HARVEY (1981) a pu fixer des antibiotiques (β -lactamines) à la surface d'objets en PTFE traités au chlorure de benzalkonium. Ce procédé est utilisé pour la fabrication de prothèses vasculaires capables de relarguer progressivement de la pénicilline G (GRECO 1985). le patient est ainsi protégé des risques d'infections secondaires post-opératoires .

3.3.3) Association par complexation

Parmi les biotextiles à labilité contrôlée, ceux qui possèdent des propriétés séquestrantes, résistent le mieux au lavage. L'association par complexation est très spécifique pour un élément donné (ex : le mercure avec l'urée-formaldéhyde, le cuivre avec le motif 8-hydroxy quinoléine). La complexation permet d'obtenir des textiles qui conservent leurs propriétés antimicrobiennes plus longtemps. Il existe deux façons de procéder.

La première méthode consiste à greffer, par estérification ou autre, des radicaux complexants sur la fibre (CHATELIN 1983). Le traitement du coton par un complexe de peroxyde de zinc diacétate, permet d'obtenir une activité antifongique après 50 lavages (DANNA 1978).

Le second moyen consiste à polymériser une résine autour de la fibre textile. Le réseau polymère est formé par des résines thermosensibles, en présence d'antiseptiques. Ceux-ci sont à la fois piégés et complexés par la résine. C'est le cas, par exemple, des gammes de textiles développées par Steri-septic (RADFORD 1973) ou Burlington (BALDWIN 1984a et 1984b).

Ces biotextiles, qui utilisent des ammoniums quaternaires, résistent à 50 lavages. Ils ont l'inconvénient d'être relativement coûteux et peu résistants aux hautes températures. Dans ces techniques, on retrouve les composés organosiliconés comme pour le procédé Burlington (BALDWIN 1984a) où une résine époxypolyalkylène-organosilicone sert à piéger des ammoniums quaternaires organosiliconés. Les résines thermosensibles complexantes peuvent, en outre, s'intégrer à des plastiques (SANYO 1983) ou à des membranes d'acétate de cellulose (MURATA 1985).

3.3.4) Les textiles à bioactivité fixe

Dans cette catégorie, on connaît peu d'exemples. Les seuls tissus connus sont ceux qui ont subi un traitement rendant les fibres inattaquables par les agents de dégradation biologique. L'estérification du coton par des diacétates diphenyl, rend la cellulose inattaquable par les cellulases fongiques ou bactériennes (PECHMEZE 1972).

Certains textiles agissent indirectement. L'une des causes importantes de contamination atmosphérique, est la dissémination de particules chargées de bactéries dans l'air. Les tissus peuvent émettre des "fibres nuclei", particules formées de débris textiles, dues à l'abrasion. Il existe ainsi tout un domaine de recherches visant à créer des fibres dites "non émissives", pour la confection de blouses utilisées dans les blocs opératoires ou les salles blanches. Le coton émet, par exemple, de nombreuses particules, tandis que les polyesters et acryliques ont une meilleure rétention (ISOARD 1983). Dans un domaine parallèle, on recherche également des tissus qui ne peuvent pas être traversés par un aérosol chargé de bactéries (HURREN 1983).

On ne connaît pas, à l'heure actuelle, de textiles à labilité fixe ayant des pouvoirs bactériostatiques ou bactéricides. Toutefois, il existe des antiseptiques peu ou pas solubles comme certains dérivés de l'acide hydroxybenzoïque : sels de salicylanilide ou paraben (GUMP 1982). Il existe, enfin, quelques références à l'activité antiseptique de polymères insolubles d'ammoniums quaternaires (ISQUITH 1983, IKEDA 1985, NAKAGAWA 1984a). Ces articles seront commentés dans la partie "discussion", en comparaison avec nos propres résultats. Nos travaux sont précisément basés sur l'étude du pouvoir antiseptique d'ammoniums quaternaires insolubilisés.

En effet, nous avons voulu créer un textile à bioactivité fixe grâce à un procédé qui permet de fixer, par liaisons de covalence, des ammoniums quaternaires à la cellulose de fibres de coton. Si l'on se réfère de nouveau aux modèles de GAGLIARDI (1962), l'action de ce textile devrait être semblable au type (3). Le procédé de fabrication et les spécifications du textile sont données dans la partie confidentielle.

3.3.5) Conclusions

A notre connaissance, il n'existe pas de biotextiles antimicrobiens satisfaisants. Souvent ils coûtent trop cher ou sont trop peu résistants aux lavages (VAIL 1982). Parfois, leur spectre d'activité antiseptique est trop étroit (uniquement antifongique ou uniquement bactéricide). Les textiles les plus intéressants, sont ceux qui possèdent la rémanence la plus importante et donc un pouvoir antimicrobien durable. La résistance au lavage n'est possible qu'avec des associations fibre-antiseptique fortes. Deux solutions sont possibles : celle d'un produit faiblement relargué par la fibre mais actif à de très faibles concentrations ; celle de produits capables d'agir en étant insolubles.

4) Méthodes d'étude du pouvoir antiseptique des biotextiles

Le principal problème rencontré, dans l'étude du pouvoir antiseptique de produits insolubles ou de surfaces "auto-stériles", est un problème de méthodologie. Le tableau -IX- illustre les deux principales facettes de l'évaluation quantitative du pouvoir antimicrobien de surfaces "auto-stériles".

Les bactéries doivent être mises en contact avec la surface à tester. Il convient donc de déterminer la méthode d'inoculation, en tenant compte de paramètres inhabituels comme le taux d'humidité relative de l'air. L'application des cellules bactériennes se fait par imprégnation de l'échantillon à tester (LASHEN 1971) ou en pulvérisant la suspension bactérienne (HURREN 1983). Parfois, les micro-organismes sont appliqués sous forme d'un aérosol (HOFFMAN 1955). La quantité de bactéries inoculées est variable. Cependant, dans la plupart des méthodes, on applique environ 10^3 à 10^4 germes par cm^2 .

Testing Self-Disinfecting Surfaces		
Application		Removal
1. Test organism	<div style="border: 1px solid black; padding: 10px; width: fit-content; margin: 0 auto;"> Surface A. Untreated B. Treated </div>	5. Nature of surface
a. Nature		a. Material
b. Conditions of growth		b. Cleanliness
c. Size of inoculum		6. Conditions of storage
2. Suspending medium		a. Time
3. Manner of application		b. Relative humidity
a. Gross		c. Temperature
b. Film		7. Method of removal
c. Spray		a. Swab
4. Conditions of application		b. Shaking in diluent
a. Time	8. Diluent	
b. Relative humidity	a. Nature	
c. Temperature	b. Temperature	
		c. Neutralizer
		9. Method of determining viability of recovered organisms
		a. Broth tubes
		b. Solid media

Tableau -IX- : Les principaux paramètres à considérer lors de l'évaluation du pouvoir antiseptique de surfaces dites "auto-stériles" (d'après HOFFMAN 1955).

Le second problème consiste à obtenir une estimation quantitative de la population microbienne. Cette évaluation est, jusqu'à présent, impossible à réaliser sans interrompre le test. Il faut donc prévoir deux échantillons (essai et témoin) pour chaque mesure intermédiaire. Pour effectuer, par exemple, une cinétique à 5 points (5 temps de contact différents), 10 échantillons et 10 mesures sont nécessaires.

En ce qui concerne l'évaluation du nombre de germes survivants, il est deux manières de procéder. On peut soit récupérer les cellules pour effectuer une numération, soit compter les bactéries directement sur le tissu. Dans le premier cas, il faut être sûr de détacher toutes les cellules de leur support solide, sans affecter leur viabilité. Cela s'effectue avec des milieux et des conditions particulières (WILLIAMSON 1965). A partir des travaux de Mc NEIL (1962), l'American Association of Textile Chemists and Colorists a adopté cette technique pour tester les textiles antimicrobiens (AATCC 1975).

L'autre méthode est basée sur l'utilisation de chlorure de triphényl tétrazolium (CTT). Au terme de l'expérimentation, l'échantillon est recouvert d'un milieu gélosé nutritif contenant ce produit. Chaque cellule se développe en formant un clone. Les deshydrogénases bactériennes réduisent le CTT, qui se transforme alors en un colorant rouge insoluble. Les microcolonies formées par les bactéries deviennent rapidement visibles et comptables au microscope optique, par leur coloration rouge. On considère alors que chaque colonie est issue d'une unique cellule, pour déterminer le nombre de bactéries survivantes. Ce système a été utilisé par BELLINGER (1967) et LASHEN (1971) dans l'étude de textiles antimicrobiens.

Enfin, dans le cas particulier des textiles, l'étude doit être complétée en déterminant la susceptibilité du traitement au lavage. Il faut notamment savoir si le traitement est inactivé, détruit ou emporté par les produits lessiviels.

MATERIEL ET METHODES

I. MATERIEL

1) Les souches microbiennes

1.1) Les souches des tests d'activité antiseptique

Une trentaine de souches ont été employées. Elles ont été obtenues auprès du Centre National de Collection Microbienne de l'Institut Pasteur de Paris (CNCM ou CIP) et du Centre Hospitalier Régional de Lille (CHR). Nous les avons référencées dans le tableau -X-. La totalité des souches a servi à effectuer un spectre d'activité antimicrobienne sur certains biotextiles. Pour les tests de routine, lors de la sélection des sels d'ammonium quaternaire ou de la mise au point des tissus, cinq souches ont été utilisées systématiquement. Ces souches servent couramment pour le contrôle de la sensibilité des germes infectieux aux antibiotiques et sulfamides selon les recommandations de l'Organisation Mondiale de la Santé (O.M.S. 1977) ou pour la recherche de l'activité des antiseptiques selon les normes de l'Association Française de Normalisation (AFNOR 1981). Les souches utilisées en routine sont marquées d'une astérisque dans le tableau -X-.

L'entretien des souches se fait sur bouillon nutritif de composition suivante (Institut Pasteur Production 1978) :

- Peptone 5 g
- Extraits de viande 1 g
- Extraits de levure 2 g
- Chlorure de sodium 5 g
- Eau distillée, qsp 1.000 ml pH 7,4

Pour les cultures sur milieu solide, Le même milieu additionné d'agar-agar à raison de 15 g par litre est utilisé.

Les souches peuvent être conservées 6 mois à -20°C dans le bouillon nutritif additionné de 20 % (V/V) de glycérol bidistillé.

BACTERIES A GRAM POSITIF :

<u>Staphylococcus aureus</u>	CIP 7625*
<u>Streptococcus faecalis</u>	CIP 5855*
<u>Listeria monocytogenes</u>	CHR
<u>Bacillus polymyxa</u>	CHR
<u>Bacillus subtilis</u>	CHR
<u>Corynebacterium pseudodiphtheriae</u>	CHR

BACTERIES A GRAM NEGATIF :

Enterobacteriaceae :

<u>Escherichia coli</u>	CIP 7624*
<u>Shigella sonnei</u>	CHR
<u>Salmonella paratyphi A</u>	CHR
<u>Salmonella paratyphi B</u>	CHR
<u>Salmonella typhimurium</u>	CHR
<u>Salmonella arizonae</u>	CHR
<u>Citrobacter freundii</u>	CHR
<u>Levinea malonatica</u>	CHR
<u>Klebsiella pneumoniae</u>	CHR
<u>Proteus vulgaris</u>	CHR
<u>Proteus mirabilis</u>	CHR
<u>Providencia stuartii</u>	CHR
<u>Serratia marcescens</u>	CHR

Pseudomonadaceae :

<u>Pseudomonas aeruginosa</u>	CIP 73344
<u>Pseudomonas aeruginosa</u>	CIP 73351
<u>Pseudomonas aeruginosa</u>	CIP 73388
<u>Pseudomonas aeruginosa</u>	CIP 73426
<u>Pseudomonas aeruginosa</u>	CIP 73433
<u>Pseudomonas aeruginosa</u>	CIP 76110*
<u>Pseudomonas aeruginosa</u>	CHR 461M
<u>Pseudomonas aeruginosa</u>	CHR 583M
<u>Pseudomonas aeruginosa</u>	CHR 693M
<u>Pseudomonas aeruginosa</u>	CHR 792
<u>Pseudomonas alcaligenes</u>	CHR
<u>Pseudomonas maltophilia</u>	CHR
<u>Alcaligenes liquefaciens</u>	CHR

LEVURE :

<u>Candida albicans</u>	CHR*
-------------------------------	------

Tableau -X- : Souches microbiennes utilisées pour l'évaluation du pouvoir antiseptique

* Souches utilisées en routine

1.2) Les champignons cellulolytiques

Les souches, choisies pour les tests de résistance aux agents cellulolytiques, sont celles recommandées par l'AFNOR dans la norme NF X 41-600 (1971a). La liste (tableau -XI-) est complétée par des espèces fongiques connues pour leur activité cellulolytique ou isolées au laboratoire à partir d'éponges cellulosiques ou de tissus moisissés. Les souches officielles proviennent de la Mycothèque du Muséum d'Histoire Naturelle (MMHN) de Paris.

=====

SOUCHES RECOMMANDEES PAR L'AFNOR (1971a):

<u>Aspergillus amstelodami</u>	MMHN 142
<u>Aspergillus favus</u>	MMHN 1990
<u>Aspergillus niger</u>	MMHN 521
<u>Chaetonium globosum</u>	MMHN 419
<u>Memnoniella echinata</u>	MMHN 2060
<u>Myrothecium verrucaria</u>	MMHN 811 bis
<u>Paecilomyces varioti</u>	MMHN 3210
<u>Penicillium funiculosum</u>	MMHN 3383
<u>Stachybotrys atra</u>	MMHN 3227
<u>Trichoderma viride</u>	MMHN 3209

AUTRES CHAMPIGNONS CELLULOLYTIQUES :

<u>Aspergillus versicolor</u>	MMHN 3140
<u>Cladosporium herbarum</u>	isolé sur éponges cellulosiques
<u>Penicillium species</u>	isolé sur tissu de coton
<u>Scopulariopsis brevicaulis</u>	isolé sur éponges cellulosiques
<u>Trichoderma harzianum</u>	MMHN non référencé

=====

Tableau -XI- : Souches fongiques utilisées pour l'évaluation de la résistance aux agents cellulolytiques

Les champignons sont cultivés sur gélose de Sabouraud pour conservation (peptone Chapoteaut 30 g.l⁻¹, gélose 20 g.l⁻¹, pH 6,5-6,7) ou sur milieu gélosé à l'extrait de malt (Extrait de malt 20 g.l⁻¹, gélose 20 g.l⁻¹, pH 5,5), de l'Institut Pasteur Production (1978). L'AFNOR (1971a) recommande l'utilisation de milieux non sucrés pour l'obtention des inoculats qui servent à éprouver la résistance des matériaux à la biodégradabilité.

2) Les sels d'ammoniums quaternaires

Les sels d'ammonium quaternaire qui ont été retenus pour les tests d'activité antiseptique et la fonctionnalisation de tissus de coton, sont au nombre de 19. Les formules chimiques et les voies de synthèse de ces sels sont indiquées dans la partie confidentielle. Certains font l'objet d'un dépôt de brevet (JOLY 1981).

Ils sont répartis en quatre groupes selon la nature de l'amine tertiaire d'origine. tous les sels sont des bromures.

- Groupe I : sels no 2, 29, 30, 32, 33 et 35
- Groupe II : sels no 26 et 28
- Groupe III : sels no 20, 21, 22, 23, 24 et 25
- Groupe IV : sels no 6, 8, 10, 36 et 37

Les préparations sont des poudres ou des gommes très hygroscopiques. Les sels sont conservés à l'abri de l'humidité de l'air dans une enceinte contenant de l'hydroxyde de potassium. Pour les tests d'activité antiseptique, ils sont dissous dans de l'eau physiologique à 9 g.l^{-1} de chlorure de sodium par litre d'eau distillée. Ils peuvent être conservés ainsi pendant plusieurs mois à température ambiante et à l'abri de la lumière.

3) Les échantillons de textiles

Plusieurs types de supports textiles 100 % coton ont été utilisés :

- Les tricots Jersey, qui ont servi dans la phase préliminaire de sélection des sels d'ammoniums quaternaires. Ils sont confectionnés par un petit métier à tisser de laboratoire. Les fils utilisés proviennent de la filature de la Gosse. Chaque échantillon pèse environ 13 mg/cm^2 .

- Les tissus, qui ont servi au stade pilote de production, sont de qualité courante. Ils proviennent de l'usine DESCAMPS d'Erquinghem et ont suivis les processus habituels de débouillissage, flambage, désencollage et blanchiment. Une partie de ces tissus ont subi une opération supplémentaire de blanchiment au Centre de Recherche Textile de Mulhouse (CRTM). Le poids moyen des tissus est de $13,5 \text{ mg/cm}^2$.

- Les bourres de coton sont de trois types. Le coton brut (utilisé en microbiologie pour obturer les tubes), est le produit obtenu après égrenage et nettoyage. La bluth est un coton cardé écru. Le coton de Californie est une bourre de coton brut qui a été débouillie et blanchie (opération dite de "décreusage"). Ce coton est beaucoup plus hydrophile que le précédent.

- Des membranes de cellulose pure de la marque Sartorius ont été traitées également. Ces filtres ont une porosité de 0,45 μm de diamètre. Les cellules bactériennes ne peuvent pas traverser cette membrane.

On appelle "charge", la quantité d'ammoniums quaternaires fixés sur le coton. Cette charge est exprimée en g de produit fixé par kg de coton.

II. LES METHODES DE DETERMINATION DES ACTIVITES ANTISEPTIQUES

1) Détermination des Concentrations Minimales Inhibitrices des sels libres

La Concentration Minimale Inhibitrice (CMI) est la plus faible concentration en antiseptique capable d'inhiber la multiplication d'une suspension d'environ 10^8 bactéries par millilitre dans des conditions optimales de croissance. Pratiquement, il faut réaliser une série de dilutions successives du produit à tester, à partir d'une solution mère ; la plus forte dilution n'ayant pas permis le développement des germes donnera la CMI. Cette technique présente l'avantage d'être miniaturisable et permet l'emploi, dans le milieu de culture, d'un indicateur coloré grâce auquel la lecture est facilitée.

1.1) Les milieux de culture

1.1.1) Le milieu au rouge de phénol

Composition :

- Peptone tryptique de caséine 10 g
- Extrait de viande de boeuf .. 1 g
- Chlorure de sodium 5 g
- Glucose 5 g
- Solution de rouge de phénol . 10 ml
- Eau distillée, qsp 1.000 ml

Solution de rouge de phénol :

- Rouge de phénol 0,18 g
- NaOH (0,1 N) 5 ml
- Eau distillée, qsp 100 ml

Le pH du milieu est ajusté à 7,2, sa couleur est alors rouge orangée. La stérilisation s'effectue à 121°C pendant 20 minutes. Les CMI sont recherchées avec ce milieu. La plupart des germes utilisent le glucose en acidifiant le milieu ; ils provoquent ainsi le virage au jaune de l'indicateur coloré ; c'est le cas d' Escherichia coli . Si le microorganisme n'acidifie pas (Candida albicans), il faut évaluer la croissance par le trouble du milieu de culture.

Si, enfin, la bactérie alcalinise le milieu de culture (Pseudomonas aeruginosa), celui-ci prend une teinte rouge violacée. Ce milieu est également utilisé pour étudier la fermentation des hydrates de carbone (Difco manual 1984).

1.1.2) Le milieu Tryptone Glucose Extract Agar

Composition :

- Peptone trypsique de caséine 5 g
- Extrait de viande de boeuf 3 g
- Chlorure de sodium 5 g
- Glucose 1 g
- Agar-agar 15 g
- Eau distillée, qsp 1.000 ml

Le pH final est de 7,0. La stérilisation se fait à 121°C pendant 20 minutes. Le milieu Tryptone Glucose Extract Agar (TGEA) sert à l'entretien des souches et au dénombrement des bactéries par numération (A.P.H.A. 1980).

1.2) Le protocole expérimental

Les solutions mères (SM) des sels d'ammonium quaternaire sont préparées dans de l'eau physiologique à 9 g.l⁻¹ de chlorure de sodium et stérilisées par filtration sur une membrane de 0,45 µm de porosité. Pour chaque sel, sont réalisées trois SM de valeurs différentes, de sorte que les concentrations finales, obtenues après dilution par moitié, soient complémentaires. Pour ce faire, nous utilisons des plaques de microtitration de dimension standard à 96 cupules d'une contenance de 300 µl chacune. La figure -14- montre comment sont réparties ces différentes SM.

La mise en oeuvre du test se fait en trois étapes :

1. Répartition de 100 µl de milieu au rouge de phénol par cupule.

2. Réalisation simultanée des dilutions à l'aide d'une pipette automatique à 8 canaux réglée à 100 µl. Les dilutions se font par moitié, selon une progression géométrique de raison 1/2, de la cupule no 1 vers la cupule no 12. La concentration la plus élevée correspond au 1/4 de la SM considérée (cupule no 1) et la plus faible au 1/8.192 de celle-ci (cupule no 12). Pour les lignes G et H, les SM sont remplacées par de l'eau physiologique.

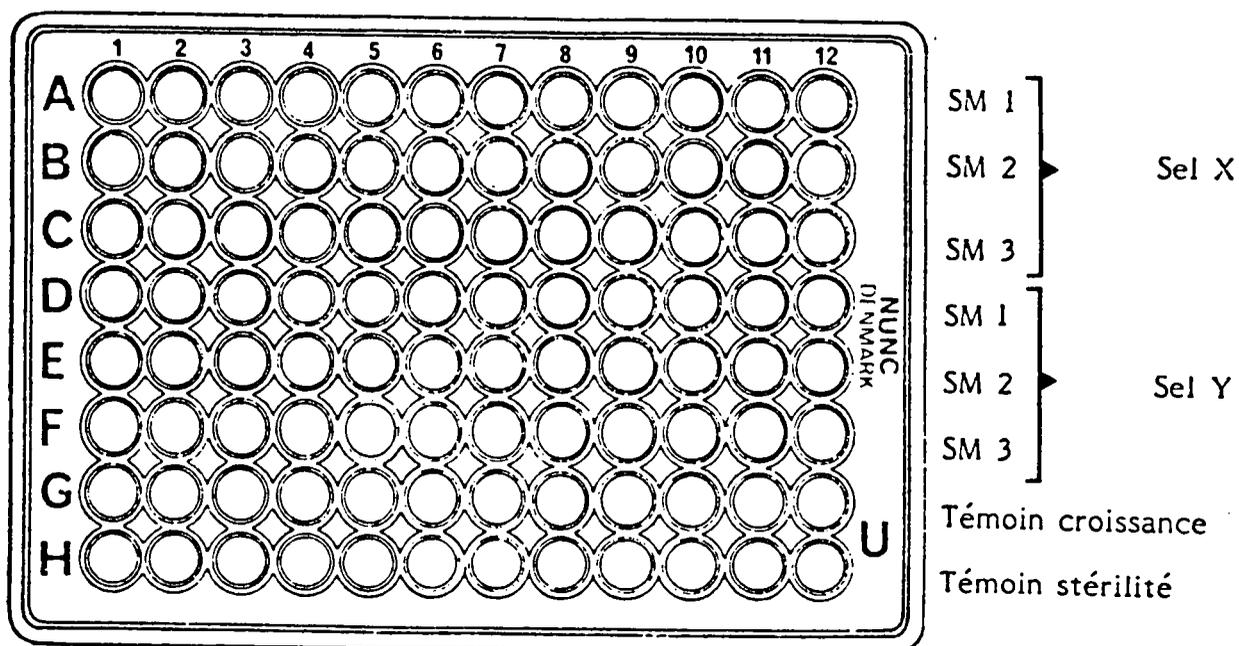


Figure -14- : Répartition des différentes solutions mères (SM) dans les plaques de microtitration

3. Répartition de 100 µl d'inoculum par cupule sauf pour la ligne H qui reçoit du milieu au rouge de phénol stérile.

Deux sels sont testés par plaque (lignes A, B et C pour le premier ; lignes D, E, et F pour le second). La ligne G est le témoin de croissance (milieu sans antiseptique) où l'on vérifie que les bactéries se sont bien développées (toutes les cupules positives). La ligne H est le témoin de stérilité où l'on vérifie que les différentes opérations se sont déroulées stérilement (toutes les cupules négatives).

L'inoculum est préparé à partir d'une culture pure de 18 heures dans le milieu au rouge de phénol. Une suspension d'environ 10^8 bactéries par millilitre est constituée dans du milieu neuf. L'inoculum est contrôlé par dénombrement sur TGEA. S'il est trop faible, l'essai n'est pas retenu.

2) L'étude de la stabilité chimique des sels libres

Cette étude a été réalisée en adaptant la méthode que nous venons de décrire à chaque cas de figure.

2.1) Influence du traitement thermique

Les SM subissent l'un des trois traitements suivants :

- 30 minutes au bain-marie à 75°C
- 30 minutes au bain-marie à 100°C
- 20 minutes à l'autoclave à 121°C

L'activité antiseptique de chacune des SM ainsi traitées est évaluée et comparée avec une SM filtrée sur membrane de 0,45 µm de porosité.

2.2) Influence du pH

Le milieu au rouge de phénol est ici remplacé par un bouillon peptoné tamponné au pH désiré à l'aide de solutions 0,2 molaire de phosphate monopotassique (KH_2PO_4) et de phosphate bipotassique (K_2HPO_4). Le milieu utilisé est celui de LURIA (1957). Il ne contient pas d'indicateur coloré ; la lecture des plaques est faite par évaluation du trouble causé par la croissance des bactéries.

composition :

- Peptone tryptique de caséine .. 10 g
- Extraits de levure 5 g
- Chlorure de sodium 5 g
- Eau distillée, qsp 1.000 ml

Le milieu est stérilisé à 121°C pendant 20 minutes.

2.3) Influence de la concentration en chlorure de sodium

Le milieu au rouge de phénol a été modifié dans sa composition à raison de 20, 40 et 60 g de chlorure de sodium par litre de milieu.

3) La méthode du contact agité

Le principe de cette méthode est de plonger un échantillon de tissu dans une suspension bactérienne. L'agitation est destinée à favoriser le contact des microorganismes avec la fibre du tissu. Le nombre de cellules survivantes est déterminé à intervalles réguliers (cinétique).

3.1) Les milieux de culture

Les bactéries sont cultivées dans le milieu de LURIA (1957), que nous avons décrit précédemment page 83.

3.1.1) Milieu de MUELLER-HINTON

composition :

- Hydrolysate acide de caséine 17,5 g
- Macération de viande de boeuf 300 g
- Amidon 1,5 g
- Agar-agar 15 g
- Eau distillée, qsp 1.000 ml

Le pH final est de 7,4. La stérilisation se fait à 121°C pendant 20 minutes. Ce milieu est utilisé pour les dénombrements par numération. Nous avons utilisé la formule de l'Institut Pasteur Production (1978).

3.1.2) Le tampon phosphate

Ce tampon constitue le milieu réactionnel où sont mises en contact les bactéries avec le tissu.

Composition :

- Phosphate bipotassique anhydre 18 g
- Phosphate monopotassique anhydre .. 2 g
- Eau distillée, qsp 1.000 ml

Le pH final est ajusté, si nécessaire, à 7,5 par H_3PO_4 3N ou NaOH 3N avant la stérilisation à 121°C pendant 20 minutes.

3.2) Protocole expérimental

Cette méthode n'a été utilisée qu'avec les tricots Jersey. Des échantillons de 3 cm x 1 cm pesant en moyenne 70 mg sont découpés et déposés dans un tube à vis contenant 4,5 ml de tampon phosphate. Les échantillons sont soit stérilisés à part, soit stérilisés dans le tampon.

Une culture pure de 18 heures est réalisée dans le milieu de LURIA (1957), de sorte que les bactéries soient en fin de phase exponentielle de croissance. La suspension obtenue est centrifugée 15 minutes à 4.000 g. Le culot est repris dans le même volume de surnageant avec le tampon phosphate. Cette opération a pour but d'éliminer le milieu nutritif et d'éviter ainsi la multiplication des bactéries. Une suspension d'environ 10^8 cellules par millilitre est ainsi obtenue.

L'inoculum est dilué en tampon phosphate pour avoir environ 10^8 bactéries par millilitre. 0,5 ml de cette suspension est ajoutée aux tubes contenant les tissus. Ces tubes sont mis en agitation constante pendant 6 heures ou 24 heures à 30°C. Un résumé du protocole expérimental est rapporté dans le tableau -XII-.

Le nombre de bactéries survivantes est déterminé par numération selon la technique bien connue de l'homme de main. Le principe consiste à inclure, dans une gélose nutritive, une partie aliquote de la solution à tester ou d'une dilution connue d'icelle. Les géloses sont mises en culture dans les conditions idéales de croissance des microorganismes. On considère qu'en se multipliant, une bactérie donne naissance à une colonie visible à l'oeil nu ; il s'agit du concept d'unité formant colonie (u.f.c.). Trois numérations sont effectuées :

- Directement sur la suspension initiale (N_0)
- Après 6 heures de contact (N_6)
- Après 24 heures de contact (N_{24})

N_0 , N_6 et N_{24} sont exprimés en u.f.c. par ml puis convertis en u.f.c. par cm^2 . Il est important d'avoir à l'esprit que le calcul de l'u.f.c. est une mesure par défaut, dans la mesure où les bactéries peuvent s'associer en paquet. Plusieurs bactéries, très proches l'une de l'autre, donnent alors une seule colonie. Cette erreur est plus ou moins importante selon la propension de l'espèce bactérienne considérée à s'associer en amas. En outre, le calcul de l'u.f.c. est un test statistique d'échantillonnage qui suppose une marge d'incertitude importante. La numération demeure néanmoins l'une des méthodes les plus précises pour déterminer le titre d'une solution bactérienne. Les résultats sont exprimés en puissance de 10 ou en logarithme décimal.

Culture microbienne
(fin de phase exponentielle de croissance)

⋮
V

Centrifugations
(Transfert des cellules dans un tampon pH 7,2)

⋮
V

Inoculation du tissu
(5 ml pour 3 cm² de tissu)

⋮
V

Incubation
(30°C, 6 ou 24 heures, agitation)

⋮
V

Dénombrement

Tableau -XII- : Détermination de l'activité antiseptique
des biotextiles par la méthode du contact agité

4) La méthode A.A.T.C.C.

Cette méthode de l'American Association of Textile Chemists and Colorists (AATCC 1975) est spécialement adaptée à l'étude des textiles antimicrobiens et plus particulièrement à tester les apprêts antimicrobiens à base d'ammonium quaternaire. Les microorganismes sont déposés sur le tissu. Après incubation, les germes survivants sont récupérés, pour dénombrement, grâce à un milieu spécial.

4.1) Les milieux de culture

Les cellules ont été obtenues par culture sur le milieu de LURIA (1957), décrit page 83. Les numérations ont été effectuées à l'aide du milieu gélosé de MUELLER-HINTON (Institut Pasteur Production) décrit page 84. Les tests sont arrêtés par l'adjonction de milieu lécithine-Tween. Ce milieu permet la croissance des microorganismes en présence d'ammoniums quaternaires. Sa composition est basée sur les travaux de QUISNO (1946) :

Composition :

- Bactopeptone 10 g
- Extraits de viande de boeuf 5 g
- Chlorure de sodium 5 g
- Polysorbate (Tween 80) 5 g
- Lécithine d'oeuf 0,7 g
- Eau distillée, qsp 1.000 ml

Après avoir été porté à ébullition pendant quelques minutes, le milieu est stérilisé pendant 20 minutes à 121°C. Le pH final est de 7,2. Il convient d'entreposer cette préparation à 4°C ; la durée de conservation n'excède pas trois semaines.

4.2) Le protocole expérimental

Un résumé du mode opératoire est présenté dans le tableau -XIII-. Les échantillons de tissu sont découpés ou pesés de telle sorte qu'ils puissent absorber 0,2 ml d'eau (10 cm² pour les tricots, 12 cm² pour les tissus ou 300 mg de bourre de coton). Ces échantillons sont imbibés par 0,2 ml d'une solution titrée de bactéries (inoculum).

Culture microbienne
(fin de phase exponentielle de croissance)



Centrifugations
(Transfert des cellules dans un tampon pH 7,2)



Inoculation du tissu
(0,2 ml par échantillon)



Incubation
(Temps de contact de 0 à 24 h)



Neutralisation - Suspension
(20 ml de milieu lécithine-tween)



Dénombrement

**Tableau -XIII- : Détermination de l'activité antiseptique
des biotextiles par la méthode A.A.T.C.C.**

L'inoculum est préparé à partir d'une culture pure, sur milieu de LURIA (1957), âgée de 18 heures. Si la souche possède une croissance lente, la culture est prolongée pour obtenir des cellules qui soient en fin de phase exponentielle de croissance. Le bouillon de culture est centrifugé à 4.000 g pendant 15 minutes. Le culot est remis en suspension dans un tampon. L'opération est parfois renouvelée afin d'éliminer le maximum d'éléments nutritifs, lorsque, par exemple, il est nécessaire d'obtenir une population stable (non-prolifération) pendant 6 heures. La suspension bactérienne est enfin amenée au titre désiré.

Plusieurs types de tampons ont été utilisés. Pour les tests de routine, nous nous sommes servis du tampon phosphate 0,2 M pH 7,2, décrit page 84. Ce choix est commenté dans la partie "Résultats" de ce mémoire. Certaines études (Influence du pH, du taux de matière organique, de la concentration en calcium et en magnésium ...etc) ont nécessité l'utilisation de milieux très divers, qui seront décrits cas par cas au début de chaque chapitre concerné de la partie "Résultats".

Les tissus sont mis en incubation, à l'abri de la dessiccation, dans un flacon de 125 ml bouché. La température d'incubation a été modifiée lorsque nous avons étudié son effet sur le pouvoir antiseptique des tissus. Dans tous les autres cas, les échantillons ont été déposés dans une étuve thermostatée à 37°C.

Lorsque le temps de contact prédéterminé s'est écoulé, le flacon contenant l'échantillon de tissu, reçoit 20 ml de milieu neutralisant lécithine-tween à 20°C. Ce milieu a un double rôle. Il permet d'abord la neutralisation des ammoniums quaternaires qui sont rendus inoffensifs dès l'adjonction du milieu par la lécithine et le tween 80. Il ne peut plus avoir d'activité résiduelle par la suite. Par ailleurs, le tween 80 confère au milieu un léger pouvoir détergent qui permet de détacher facilement les bactéries du tissu. Cette activité est étroitement liée au pH qui doit être ajusté soigneusement (WILLIAMSON 1965).

Le dénombrement des bactéries survivantes est effectué par numération du liquide surnageant (milieu lécithine-tween), après que le flacon ait été agité violemment pendant au moins une minute.

4.3) L'expression des résultats

Les résultats sont exprimés, de manière identique à la méthode précédente, en unité formant colonie (u.f.c.) par cm² ou par g de tissu :

- N₀ : Nombre de germes présents au temps initial.
- N_n : Nombre de germes survivants après n heures de contact.

Un indice S_n de survie est calculé à partir de ces données :

$$S_n = \frac{100 \times N_n}{N_0}$$

Si la population bactérienne reste constante, S_n sera voisin de la valeur 100. S'il y a prolifération, S_n sera supérieur à 100 et s'il y a inhibition, il sera inférieur à 100.

Une simplification de l'expression des résultats est parfois nécessaire. Nous avons donc établi le système de cotation expliqué par le tableau -XIV-. Pour établir cette cotation, nous n'utilisons que les valeurs S₆ et S₂₄, soit les indices de survie après 6 et 24 heures de contact.

Par exemple : si, pour une population initiale de 1.10⁸ bactéries par cm², il ne subsiste que 1.10³ cellules après 6 heures de contact et 10 après 24 heures, la valeur de S₆ sera égale à 1 et celle de S₂₄ à 0,01. Le tissu a donc une activité bactéricide moyenne : + +.

Chacune des expérimentations est effectuée au moins trois fois, pour vérifier que les phénomènes observés, sont reproductibles. Tous les essais où l'on a constaté, sur les témoins, une baisse importante de la population bactérienne, ne sont pas retenus. Il en est de même, lorsque les résultats obtenus sur l'ensemble des essais, sont inconstants (non reproductibilité de l'expérimentation).

S_6	S_{24}	Activité bactéricide	symboles
<0,1	<0,1	importante	+++
<0,1	0,1-100	faible	<u>±</u>
<0,1	>100	nulle	-
0,1-100	<0,1	moyenne	+ +
0,1-100	0,1-100	nulle	-
0,1-100	>100	nulle	-
>100	<0,1	moyenne	+
>100	0,1-100	faible	<u>±</u>
>100	>100	nulle	-

Tableau -XIV- : Tableau des cotations

S_6 et S_{24} : Indices de survie (%) après 6 et 24 heures de contact

5) La méthode HOFFMAN, YEAGER & KAYES (1955)

Cette méthode a été adoptée par l'Association of Official Analytical Chemists (AOAC) pour tester les surface dites "autostériles". Ce test prévoit d'une part l'évaluation et l'évolution d'une population microbienne déposée sur un support solide et d'autre part permet l'étude du pouvoir antiseptique en fonction de l'humidité relative de l'air. Nous avons préféré déposer les bactéries par imprégnation du tissu, plutôt que de procéder par pulvérisation. La quantité de bactéries déposées sur le tissu est ainsi plus facile à contrôler.

5.1) Les milieux de culture

Les cellules sont cultivées sur milieu de LURIA (1957), décrit page 83. Les numérations ont été effectuées avec le milieu de MUELLER-HINTON (Institut Pasteur Production) décrit page 84. Les bactéries sont récupérées à l'aide du milieu lécithine-tween.

5.2) Le protocole expérimental

Le principe consiste à pulvériser ou à déposer une suspension bactérienne sur un échantillon. Cet échantillon est ensuite séché puis incubé dans des enceintes où l'humidité relative de l'air est contrôlée.

Les bactéries sont très sensibles à la pulvérisation et à la dessiccation. Il convient donc de les protéger en les mettant en suspension dans des milieux protecteurs. Plusieurs supports de deshydratation ont été employés : Le lait écrémé reconstitué (100 g.l^{-1}), l'inositol et la malto-dextrine (solutions à 5 %).

Les cellules sont mises en suspension dans leur milieu protecteur après centrifugation (15 min, 4000 g). Si nécessaire, on procède à quelques dilutions pour obtenir environ 5.10^8 cellules par ml. Les échantillons de tissu (10 cm^2) sont imbibés par 0,2 ml de l'inoculum, puis introduits dans un dessiccateur contenant de l'anhydride phosphorique. L'opération a pour but de sécher rapidement les tissus.

Après 30 minutes, les échantillons sont transférés dans des enceintes où l'humidité relative de l'air est contrôlée par des solutions salines sursaturées. Les sels employés permettent l'obtention d'une humidité relative de l'air (H.R.) précise. Les valeurs d'H.R., obtenues pour chaque sel, sont indiquées dans le tableau -XV-.

Sels	H.R. de l'air en %
Bichromate de potassium	98,00
Chlorure de sodium	75,32
Nitrate de calcium	50,00
Chlorure de magnésium	32,73
Chlorure de lithium	11,15
Silicagel	0,06

**Tableau -XV- : Humidité Relative de l'air (H.R.) à 25°C
dans les enceintes contenant des solutions salines
sursaturées (d'après BIZOT 1978)**

Les morceaux de tissu sont maintenus dans les flacons à H.R. contrôlée pendant 5, 15, 30 et 60 minutes à 25°C. Le nombre de bactéries survivantes est déterminé selon le protocole de la méthode A.A.T.C.C. après avoir recouvert les tissus de 20 ml de milieu lécitine-tween.

6) L'étude de l'aptitude des biotextiles à la filtration de l'air

Pour cette étude, il a fallu mettre au point un système capable de générer un flux d'air chargé de particules contaminées par des bactéries. Deux montages ont été établis. Le premier montage comporte un générateur d'aérosol, qui a permis la nébulisation des bactéries dans une enceinte confinée. Dans le second montage, le flux d'air est enrichi en poussières chargées de bactéries, par l'intermédiaire d'un lit fluidisé.

6.1) Les milieux de culture

Les cellules sont cultivées sur le milieu de LURIA (1957) , décrit page 83. Le milieu lécithine-tween a servi à la récupération des bactéries. Ce milieu est décrit page 87. Les numérations sont poursuivies à l'aide du milieu de MUELLER-HINTON (Institut Pasteur Production), décrit page 84.

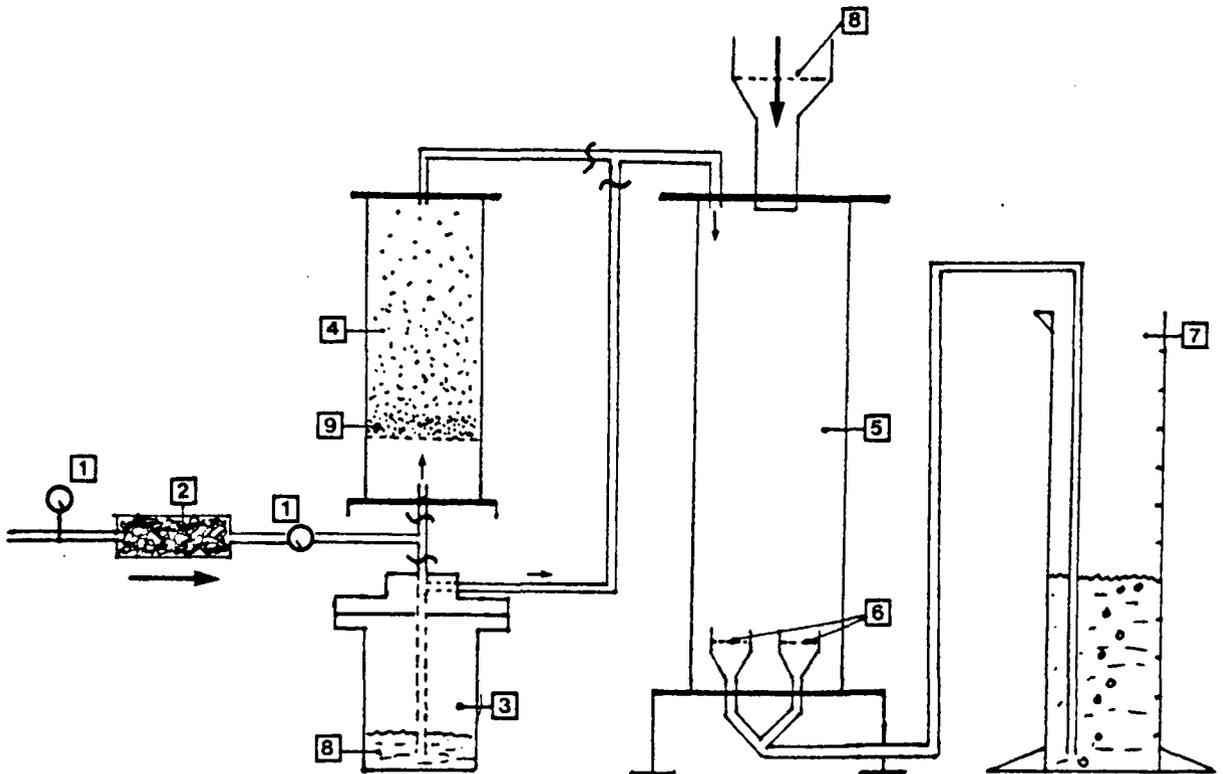
6.2) Protocoles expérimentaux

6.2.1) Filtration d'un aérosol

Un schéma de l'installation est proposé dans la figure -15-. Un flux d'air filtré, dont le débit est contrôlé par un manodétendeur, est envoyé dans un générateur d'aérosol (type "Collinson"). L'aérosol est formé à partir d'une préparation de bactéries mises en suspension dans du lait écrémé reconstitué (100 g.l^{-1}) ou dans une solution d'inositol à 5 %. Le mélange air/aérosol, chargé en bactéries, est injecté dans une chambre de nébulisation, où se trouvent les échantillons de tissus. Ceux-ci sont découpés et insérés dans un système de porte-filtres de 47 mm de diamètre. La chambre de nébulisation contient deux porte-filtres, un pour l'échantillon témoin et l'autre pour l'essai. Le flux d'air, chargé d'aérosol, passe obligatoirement à travers les tissus ; il est ensuite envoyé dans un liquide de barbotage (eau physiologique à 9 g.l^{-1} de NaCl) destiné à récupérer les bactéries survivantes. Le volume du liquide de barbotage doit être mesuré avec précision.

Les échantillons de tissu sont maintenus dans la chambre de nébulisation pendant 30 minutes puis récupérés. Parfois, ils sont transférés dans des enceintes à H.R. contrôlée selon la méthode HOFFMAN (1955) décrite précédemment. La quantité de bactéries pulvérisées est fonction de la pression d'arrivée de l'air. Nous avons utilisé des pressions de 2 à 4 bars.

Au terme des expérimentations, les échantillons de tissu ($7,38 \text{ cm}^2$) sont récupérés. Le nombre de bactéries survivantes est déterminé selon le protocole de la méthode A.A.T.C.C. avec 20 ml de milieu lécithine-tween. La quantité de bactéries présentes dans le liquide de barbotage, est déterminé directement par numération. Chaque expérience est menée en utilisant simultanément un tissu témoin non traité et le biotextile.



- 1- Manodétendeur
- 2- Filtre à air
- 3- Générateur d'aérosol type "Collinson"
- 4- Fluidiseur
- 5- Enceinte de mélange air-aérosol
- 6- Portes-filtres
- 7- Eprouvette graduée contenant le liquide de barbotage
- 8- Inoculum liquide
- 9- Inoculum poudre

Figure -15- : Schéma de l'installation utilisée pour tester la filtration d'aérosols ou de poussières par les biotextiles

6.2.2) Filtration de poussières

La mise en oeuvre de l'expérimentation, nécessite l'obtention préalable de bactéries deshydratées. Les bactéries sont cultivées sur fermenteur (milieu de LURIA) et deshydratées par le procédé d'atomisation mis au point au laboratoire (OCHIN 1980). Les supports d'atomisation sont le lait écrémé reconstitué (100 g.l^{-1}) et l'inositol à 5 %. Nous récupérons ainsi une poudre contenant en moyenne 10^4 à 10^5 bactéries revivifiables par gramme. Cette poudre est déposée dans un "fluidiseur". Cet appareil est conçu pour charger un flux d'air en particules de poussières.

Si l'on se réfère à la figure -15-, le générateur d'aérosol (4) est remplacé par le "fluidiseur" (9). Il est important d'admettre dans le fluidiseur un air très sec, afin que la poudre ne prenne pas en masse. A cet effet, l'air passe sur un lit de silicagel situé en amont du montage. Le mélange air/poussière est admis dans l'enceinte où ont été déposés les tissus. Les échantillons sont ainsi inoculés puis éventuellement transférés dans des enceintes où l'humidité relative de l'air est contrôlée.

7) La filtration continue en circuit fermé

Cette méthode a été développée pour simuler une situation de filtration continue d'un liquide, en circuit fermé. Ce système a servi à la filtration de solutions de gélatine contaminées par des bactéries (Bacillus sp). Le montage utilisé est indiqué en figure -16-.

Les tissus sont découpés et insérés dans des porte-filtres étanches et stérilisables de 47 mm de diamètre. Chaque porte-filtre est relié à un réservoir par l'intermédiaire de tubes 'versilic', pour former une boucle. le liquide circule dans les tubes grâce à une pompe péristaltique débitant 2 ml.min^{-1} . Les réservoirs et les porte-filtres sont plongés dans un bain-marie thermostaté à 50°C , pour maintenir la gélatine liquide. A intervalles réguliers, des prélèvements sont effectués au niveau des réservoirs pour réaliser un dénombrement de bactéries. Deux porte-filtres sont utilisés en parallèle, un pour le tissu témoin et l'autre pour le biotextile. Ce montage peut être adapté à tout type de liquide que l'on veut décontaminer.

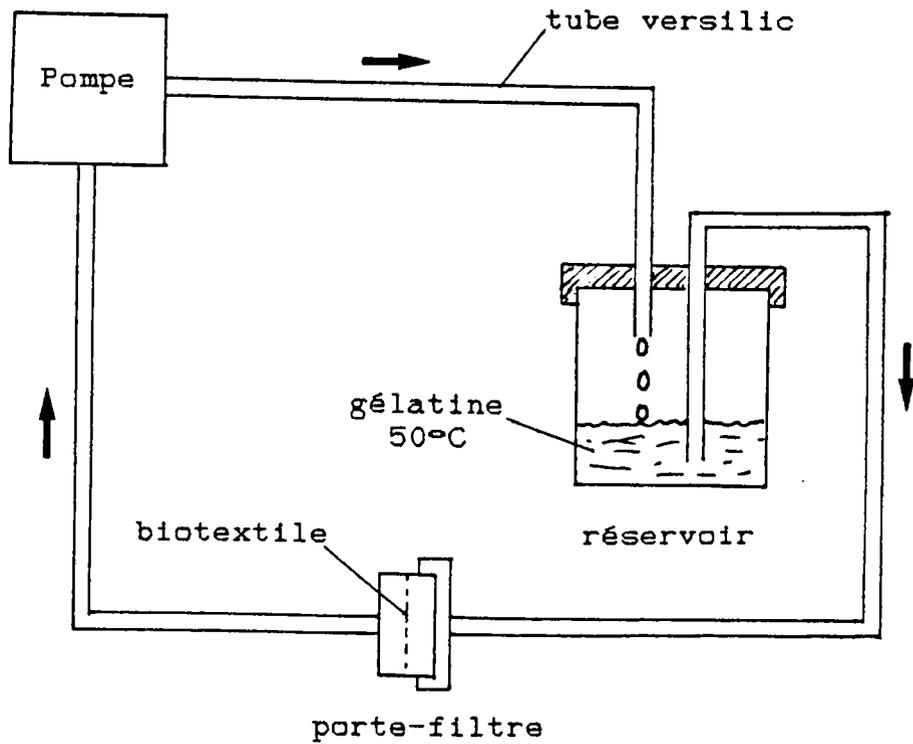


Figure -16- : Schéma du montage utilisé pour la filtration de solutions de gélatine en flux continu

8) L'étude de la résistance des tissus à l'exposition aux agents cellulolytiques

8.1) Principe de la norme NF X 41-600

Le comportement fongistatique du biotextile a été étudié vis-à-vis de différentes souches de champignons cellulolytiques. La méthode utilisée est décrite par l'AFNOR (1971a) dans la norme NF X 41-600 : "Essais de résistance aux microorganismes des textiles cellulosiques : Méthode par ensemencement mixte (spores/mycélium)".

Le principe consiste à imbiber une bande de tissu avec une suspension de spores et de mycélium. Le tissu ainsi inoculé est mis en incubation à 30°C pendant trois semaines. L'évaluation de la résistance aux agents antifongiques est ensuite appréciée selon deux critères :

- * L'estimation "de visu" du développement mycélien après trois semaines de culture.
- * La détermination de la résistance résiduelle du tissu à la traction (mesure de la force de rupture du tissu à l'aide d'un dynamomètre).

Ces critères sont évalués comparativement à un "Témoin d'Essai" (TE). Le TE est un biotextile qui subit les différentes opérations du test en ayant été préalablement saturé de chlorure mercurique pour inhiber toute croissance mycélienne. Le TE permet l'évaluation des pertes de résistance à la traction engendrées par le seul séjour de trois semaines à 30°C et à 100 % d'humidité relative. La mesure de la ténacité par dynamométrie est le critère le plus important car il donne une idée précise de la dégradation subie par les fibres cellulosiques lors de l'exposition fongique.

8.2) Expression des résultats

L'examen visuel du développement mycélien au terme des trois semaines est évalué puis noté de 0 à 4 selon la table de référence ci-après :

- 0 : Pas de développement de moisissure visible à l'oeil nu
- 1 : Développement très faible (colonies dispersées)
- 2 : Développement faible couvrant moins de 25 % de la surface
- 3 : Développement moyen couvrant 25 % à 50 % de la surface ou développement faible couvrant uniformément la surface
- 4 : Développement abondant couvrant plus de 50 % de la surface

La résistance aux microorganismes R1 est calculée de la manière suivante :

$$R1 = E/TE \times 100 \%$$



E est la résistance résiduelle à la traction du biotextile après l'exposition fongique. TE est la résistance résiduelle à la traction des Témoins d'Essai . Le rapport E/TE est exprimé en pourcentage, pour donner R1. Si le facteur R1 est proche de 100 %, le textile n'a pas subi de dégradations par les agents cellulolytiques. Un facteur R1 nul indique que les fibres ont été fortement altérées.

8.3) Choix de quelques paramètres expérimentaux

La norme NF X 41-600 prévoit l'utilisation d'un agent mouillant destiné à favoriser l'imbibition du tissu par l'inoculum. Deux produits ont été utilisés, d'une part le Sodium Dodécyl Sulfate (SDS) préconisé par la norme et d'autre part le Triton X-100 (un polyoxyéthylène éther). Le SDS présente l'inconvénient d'être un inhibiteur notable des ammoniums quaternaires et le Triton X-100 d'être toxique pour certaines souches fongiques.

Les expositions fongiques ont duré trois semaines à 30°C excepté celle de Cladosporium herbarum qui nécessite une température de 18°C pour croître. Dans ce cas, l'exposition a été poursuivie quatre semaines.

8.4) Protocole expérimental

L'inoculum est préparé à partir de 10 tubes de cultures âgées de deux semaines. Le milieu à l'extrait de malt, décrit page 77, sert à cette occasion.

La suspension spores/mycélium est effectuée dans 200 ml d'eau distillée contenant 0,1 g d'agent mouillant. Quelques millilitres de cette solution sont versés dans chaque tube de culture. Le mycélium est raclé soigneusement à l'aide d'une ôse. La suspension ainsi obtenue est filtrée à travers une gaze stérile. Les 200 ml d'inoculum doivent être préparés et utilisés rapidement.

Dix bandes de tissu de 150 mm x 20 mm sont découpées et stérilisées. Il faut 8 bandes de tissu traité (biotextile) et deux bandes de tissu non traité. Le milieu d'essai a la composition suivante :

- Nitrate d'ammonium 3 g
- Sulfate de magnésium 0,5 g
- Chlorure de potassium 0,25 g
- Phosphate monopotassique 1 g
- Agar-agar 15 g
- Eau distillée, qsp 1.000 ml pH 6,2-6,4

La gélose est répartie en boîte de Roux (150 ml par boîte), puis stérilisée pendant 20 minutes à 121°C. Après solidification du milieu, à plat, un rectangle de papier filtre blanc (Whatman no 3) est déposé sur la gélose. Le papier permet à la fois d'absorber l'excès de liquide et de servir de source de carbone pour les champignons.

Les échantillons de tissus sont déposés à la surface du papier (deux bandes par boîte), puis ensemencés avec 3 ml de la suspension de spores. Quatre bandes de biotextile, formant les TE, ont été au préalable immergées dans une solution à 1 % de chlorure mercurique pendant une heure. Les boîtes sont mises en incubation pendant trois semaines.

III. LES METHODES D'ETUDE DU MODE D'ACTION

Dans ce chapitre, nous avons rassemblé les différentes techniques, qui ont servi à mettre en évidence l'action du biotextile sur les enveloppes membranaires. Les deux premières techniques ont mis en évidence la modification de la perméabilité membranaire des cellules. Les deux dernières méthodes ont montré l'interaction des parois bactériennes avec les ammoniums quaternaires immobilisés.

1) Mesure de l'activité β -galactosidasique

L'activité β -galactosidasique a été mesurée sur des cellules récoltées en phase exponentielle de croissance (milieu de LURIA 1957). Ces cellules sont mises en suspension dans un tampon phosphate 12,5 mM pH 6,6. L'absorbance à 600 nm, des suspensions ainsi préparées, est d'environ 0,8. Le substrat choisi est le paranitrophényl- β -D-galactopyranoside (PNPG) qui permet de détecter des activités enzymatiques faibles (NIEL 1977). Les manipulations sont effectuées avec un volume fixe de 2 ml de suspension bactérienne. La réaction enzymatique est initiée par l'adjonction de 0,5 ml d'une solution de PNPG titrant 1 mg.ml⁻¹ et stoppée par 1 ml de tampon EDTA 2 %, Na₂CO₃ 0,25 M. La quantité de paranitrophénol libérée est évaluée par spectrophotométrie à 400 nm.

Les activités enzymatiques ont été mesurées en présence de 2 cm² de tissu traité ou non, ou en présence de sels d'ammoniums quaternaires. Dans ce dernier cas, 30 μ l d'une solution à 1 g.l⁻¹ est ajoutée à la suspension microbienne. Pour la mesure de l'activité enzymatique du milieu réactionnel, les suspensions bactériennes ont été filtrées sur membrane de nitrate de cellulose (0,45 μ m de porosité). 2 ml de filtrat servent à la mesure selon le protocole décrit dans le paragraphe précédent.

Chaque série d'expériences comporte un témoin de contrôle de l'activité enzymatique, qui est exprimée en nanomole de paranitrophénol total libéré par heure.

2) Mesure du relargage de phosphore inorganique

Les bactéries sont cultivées dans des fioles contenant un litre de milieu de culture (LURIA 1957). La culture est réalisée pendant 18 heures à 30°C sous agitation constante. Les cellules sont ensuite lavées cinq fois à l'eau distillée par centrifugations successives (4.000 g, 15 minutes). Lors de cette opération, 1 litre de culture est concentré dans 100 ml d'eau distillée. 2 ml de cette suspension sont mélangés, dans un tube à essai, à 0,4 ml d'une solution d'ammonium quaternaire à 1 g.l⁻¹ ou à 2-4 cm² de tissu. Le mélange est complété par de l'eau distillée pour obtenir un volume final de 4 ml.

La cinétique de relargage est suivie en utilisant un tube par temps de contact. Pour l'évaluation du taux de Phosphore inorganique relargué, les cellules sont éliminées par filtration à travers une membrane de 0,45 µm de porosité. La technique de dosage du phosphore inorganique (Pi) est celle de STANTON (1968). Le tableau -XVI- donne la première étape du dosage.

Réactifs	Blanc	Essai
Acide trichloroacétique 20 % (W/V)	2 ml	-
Filtrat	-	2 ml
Eau distillée	3 ml	3 ml
Molybdate d'ammonium, 4 H ₂ O (1,25 mg/100ml d'H ₂ SO ₄ 2,5 N)	1 ml	1 ml

Tableau -XVI- : Dosage du phosphore inorganique (réactifs)

Chaque tube est agité doucement pour assurer le mélange des réactifs. Lorsque cette opération est terminée, 0,25 ml d'une solution réductrice, composée de 1 mg de réactif de Fiske et Subbarow (acide 1-amino-2-naphtol-4-sulfonique) pour 6,3 ml d'eau distillée, est ajoutée à chaque tube. Il faut attendre 10 minutes avant d'effectuer une lecture de l'absorbance à 660 nm par spectrophotométrie. La gamme étalon est établie entre 0 et 4 mmole de Pi par litre. Pour les expériences de relargage de Pi, les résultats sont exprimés en µg de Pi libéré par mg de poids sec de bactéries.

3) Détection des mutants LPS déficients

La détection des mutants lipopolysaccharides déficients est faite par la méthode de KROPINSKI (1976). Une culture pure (5 ml) de 18 heures est entreprise à 30°C sous agitation constante. Les cellules de Pseudomonas aeruginosa sont récupérées par centrifugation (4.000 g, 15 minutes). Les culots de centrifugation sont repris dans 5 ml d'une solution d'acriflavine 0,2 % ou de chlorure de sodium 4 %. Les mutants "rough" de Pseudomonas aeruginosa sont agglutinés rapidement.

La quantité de LPS, rejetés par les bactéries dans le milieu de culture, a été déterminée par la méthode de JANDA (1971). Cette méthode, très spécifique, est basée sur l'utilisation d'un colorant : Le bromure de 1-éthyl-2-(3-(1-éthyl-naphto(1,2 d)-thiazoline-2-ylidène-2-méthylpropènyl)-naphto(1,2 d)-thiazolium (Sigma). Le colorant (10 mg) est dissous dans 20 ml d'un mélange, en parts égales, de 1,4 dioxane et de tampon acétate de sodium 0,03 M pH 4,05. La solution est ensuite complétée par 80 ml de tampon. La préparation est stockée à 2°C et à l'obscurité ; elle est ainsi stable quelques heures. Juste avant l'utilisation de la solution de colorant, 2 ml d'acide ascorbique 0,1 M sont ajoutés pour obtenir un pH final de 4,00. Le réactif coloré est prêt. Il doit être employé dans l'heure qui suit. Le dosage se fait en ajoutant dans l'ordre :

- 0,5 ml d'eau ou de tampon contenant 0,5 à 10 µg de LPS
- 0,2 ml de tampon
- 0,3 ml de colorant

Les tubes sont maintenus dans l'obscurité pendant 5-10 minutes. L'absorbance à 472 nm est mesurée par spectrophotométrie contre un blanc (eau distillée + tampon + colorant).

4) Les techniques de microscopie électronique

4.1) La méthode SIMMONS (1976)

Les bactéries sont cultivées sur milieu de LURIA (1957) pendant 18 heures. les cellules sont ensuite récoltées et mises en suspension dans un tampon phosphate 0,2 M pH 7,2. Les tissus sont inoculés et mis en incubation à 37°C, selon le protocole de la méthode AATCC.

La fixation des cellules est effectuée à température ambiante pendant 3 heures avec du glutaraldéhyde à 3 % dans un tampon cacodylate 0,1 M, pH 7,2. Les préparations sont ensuite rincées dans ce même tampon puis plongées dans un bain d'acide osmique 1 % dans du tampon cacodylate 0,2 M, pH 7,2, pendant une heure. Après cette nouvelle fixation, les échantillons sont deshydratés, par bains successifs de 30 minutes chacun, dans des solutions aqueuses à 20, 40, 60, 75, 90 et 100 % d'éthanol. Le bain à 100 % d'éthanol est renouvelé une fois. Une nouvelle série de bains à 30, 50, 70, 90 % d'acétone dans l'éthanol et 100 % d'acétone, est effectuée pour obtenir des échantillons plongés dans 100 % d'acétone. Des morceaux de tissu de 0,5 cm x 1 cm sont séchés au point critique en atmosphère de CO₂ et métallisés (or-palladium).

4.2) La méthode SEVIOUR (1984)

Les tissus sont inoculés par des bactéries suspendues dans un tampon phosphate 0,2 M, pH 7,2. Après l'incubation, les tissus sont fixés par un mélange composé de 6 volumes d'acide osmique (20 g.l⁻¹) et de un volume d'une solution aqueuse saturée de chlorure mercurique. Les échantillons sont maintenus dans le fixateur pendant 12-18 heures à 4°C. Au terme de cette opération, on effectue un rinçage à l'eau distillée. Les tissus sont deshydratés en deux étapes, en les plongeant dans un bain de 2-méthoxyéthanol pur (pendant 10 minutes) puis dans un bain d'acétone pur. Les échantillons sont maintenus dans l'acétone jusqu'au séchage par point critique en atmosphère de CO₂. Les tissu sont enfin métallisés par une couche d'or-palladium.

IV. LES METHODES DE DOSAGE DES AMMONIUMS QUATERNAIRES

1) Dosage des sels en solution aqueuse par l'éosine jaunâtre

Cette méthode est recommandée par l'AOAC (1970) pour le dosage des ammoniums quaternaires en solution aqueuse. On prépare les solutions suivantes :

- A- 25 mg d'éosine Y (Prolabo) sont dissous dans 50 ml d'eau distillée.
- B- 25 g d'acide citrique sont dissous dans 75 ml d'eau distillée. le pH est ajusté à 4,5 en utilisant une solution de NaOH 12,5 N (environ 13 ml).
- C- 100 mg de dioctyl sulfosuccinate de sodium est dissous dans 100 ml d'eau distillée.

La solution -C- doit être étalonnée de la façon suivante. Il faut prélever 2 ml d'une solution (1 mg.ml^{-1}) de l'ammonium quaternaire à doser dans un tube à vis contenant 2 ml de tétrachlorure d'acétylène, 2 ml de tampon -B- et 0,5 ml de -A-. On ajoute, à l'aide d'une burette, de petites quantités de -C- ; agiter violemment le tube pendant environ 30 secondes après chaque addition. Dès que le tube n'est plus agité, il se forme deux phases. La phase inférieure, initialement rose, devient progressivement incolore. Lorsque cet état est atteint, le volume de -C-, nécessaire pour neutraliser la coloration, est noté. La solution -C- est alors diluée de sorte que 1 ml de la nouvelle solution est équivalente à 0,1 mg d'ammonium quaternaire.

Pour le dosage proprement dit, 5 ml de la solution inconnue est introduite dans un tube à vis, contenant 2 ml de tétrachlorure d'acétylène, 2 ml de -B- et 0,5 ml de -A-. Le dosage s'effectue comme précédemment en utilisant la solution -C- étalonnée. Si V est le volume ajouté de -C- étalonné, nécessaire à la disparition de la coloration rose dans la phase inférieure, la concentration C_q , en ammonium quaternaire, est égale à :

$$C_q = V \cdot 0,1/5 \text{ mg.ml}^{-1}$$

Il est nécessaire d'avoir autant de solutions -C- étalonnées que d'ammoniums quaternaires différents à doser.

2) Le dosage par les ions picrates

Cette méthode permet d'établir la quantité d'ammoniums quaternaires fixés sur le coton. L'échantillon à doser est pesé précisément puis placé dans un volume choisi d'acide picrique de concentration connue (10^{-3} M en général). L'acide picrique est un colorant acide qui sera retenu proportionnellement à la quantité d'ammoniums quaternaires présents sur la cellulose. Cet échange d'ion est schématisé dans la figure -17-.

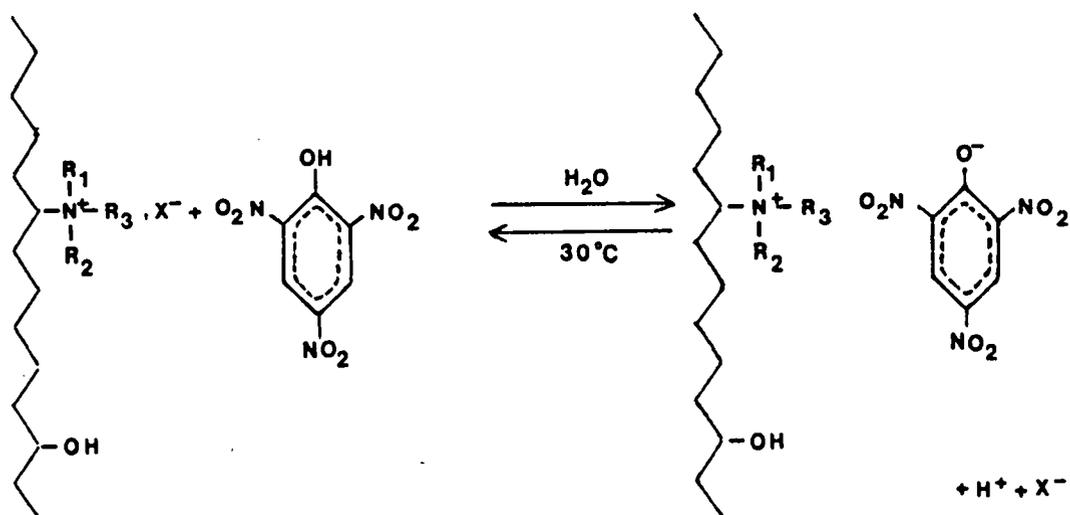


Figure -17- : Dosage des ammoniums quaternaires fixés par les ions picrates

Le dosage des ions picrates s'effectue directement par spectrophotométrie à 360 nm contre de l'eau distillée. La gamme étalon est établie entre $5 \cdot 10^{-6}$ M et 10^{-4} M). On réalise un dosage en retour sur la solution d'acide picrique où le tissu a été immergé pendant au moins 1 heure à $30^\circ C$ pour que l'échange d'ion soit terminé. Cette méthode a été mise au point au laboratoire de Chimie Organique III de l'université de Nancy par M. JOLY, en se basant sur les travaux de MONTANARI (1981).

soit :

- C_i : Concentration initiale en ion picrate (mole.l^{-1})
- C_f : Concentration finale en ion picrate (mole.l^{-1})
- V : Volume (ml) de la solution d'acide picrique, où le tissu est immergé.
- m : poids de l'échantillon testé (g)

X sera la quantité d'ions picrates échangés en milliéquivalent par kg de coton :

$$X = \frac{(C_i - C_f) \cdot V \cdot 10^{-3}}{m \cdot 10^{-3}}$$

La charge C en ammonium quaternaire est exprimée en g/kg de coton. Si P est le poids moléculaire du sel d'ammonium quaternaire fixé :

$$C = X \cdot P \cdot 10^{-3}$$

L'intervalle de confiance à accorder à chaque mesure, est de 1,2 meq. par kg de coton.

V. LES METHODES UTILISEES POUR LES TESTS DE TOXICOLOGIE

Les tests de détermination de l'Indice D'Irritation Primaire Cutanée (IIPC) et de tolérance cutanée aux applications itératives, ont été effectués au Laboratoire de Pharmacodynamie de la Faculté de Pharmacie de Lille, sous la direction de M. le professeur J.C. CAZIN. Les études d'allergénicité par patch-tests ont été entreprises au Centre Hospitalier Régional de Lille, dans le service de Dermatologie de M. le professeur BERGOEND, sous la direction du Dr MARTIN.

1) Détermination de l'Indice d'Irritation Primaire Cutanée

L'évaluation de l'indice s'effectue sur des lapins albinos mâles de 2,5 à 3,5 kg environ, selon la méthode officielle (J.O. 1976a).

1.1) La préparation des lapins

Il faut utiliser six lapins par test toxicologique. Chaque animal a le flanc rasé. Après 24 heures de repos, trois incisions sont pratiquées à l'aide d'un vaccinostyle, sur l'un des flancs de l'animal. Le test commence après 24 heures de repos, en appliquant deux carrés de gaze (3 cm x 3 cm), l'un sur la surface incisée et l'autre sur le flanc intact du lapin. 0,5 ml de la solution à tester sont déposés au centre de chaque carré, de façon à obtenir une tache d'environ 1 cm de diamètre. Pour tester les sels d'ammoniums quaternaires libres, des solutions aqueuses de 0,1 mg.ml⁻¹ ont été préparées et amenées à neutralité de pH. Lors des essais avec tissus, la gaze est remplacée par des échantillons (3 cm x 3 cm) de tissus traités ou non (témoin). L'ensemble est recouvert de sparadrap et laissé au contact de la peau. Les lectures sont effectuées après 24 et 72 heures de contact.

1.2) Lecture et expression des résultats

Une note de 0 à 4 est attribuée en fonction de la formation éventuelle d'érythèmes et d'œdèmes provoqués par les différents produits sur la peau. Les cotations sont les suivantes :

ERYTHEME ET FORMATION D'ESCARRES

* Pas d'érythème	0
* Erythème léger (à peine visible)	1
* Erythème bien visible	2
* Erythème modéré à important	3
* Erythème grave (rouge pourpre) avec formation de légères escarres (lésions profondes)	4

FORMATION D'OEDEME

* pas d'oedème	0
* Oedème très léger (à peine visible)	1
* Oedème léger (contours nets, gonflement apparent ..	2
* Oedème moyen (épaisseur environ 1mm)	3
* Oedème grave (plus de 1 cm d'épaisseur et plus de 1 cm ² de surface)	4

Les deux notes sont ajoutées l'une à l'autre pour obtenir une cotation variant de 0 à 8 par observation. Deux lectures (24 et 72 heures de contact) sur deux surfaces (incisée et non incisée) sont effectuées sur les 6 lapins. La moyenne des 24 notes obtenues donne la cotation finale. Les produits sont classés en fonction de la note finale, de la manière suivante :

- 0	Non irritant
- 0 à 2	Légèrement irritant
- 2 à 5	Moyennement irritant
- >5	Très irritant

La note finale constitue l'Indice d'Irritation Primaire Cutanée (IIPC).

2) Détermination de la tolérance cutanée aux applications itératives

Ce test est destiné à mesurer l'effet à long terme de produits appliqués à la peau. Les tests sont effectués avec des lapins albinos mâles de 2,5 à 3,5 kg environ. Il s'agit également d'une méthode officielle (J.O. 1976b). Nous avons employé ce test uniquement sur des tissus.

2.1) La préparation des lapins

Pour chaque tissu, trois animaux sont tondu sur une surface de 80 cm² (dos et flanc) par kg de poids vif. Une surface de 5 cm² est par ailleurs dégagée pour servir de témoin. Les textiles ont été cousus sous forme de manchon qui sont enfilés sur l'animal pour venir se plaquer au niveau des surfaces rasées. Le manchon est maintenu à l'aide d'un sparadrap externe n'ayant aucun contact avec la peau. L'animal ne peut ainsi se débarrasser du tissu en cours d'expérience. Le tissu est renouvelé deux fois par semaine. L'expérience dure 90 jours.

2.2) Lecture des résultats

Un certain nombre d'observations sont à effectuer :

- Le poids de chaque animal est mesuré chaque semaine. Les poils de la zone d'application sont tondu à cette occasion.

- L'aspect et la vitesse de repousse des poils est observée.

- L'épaisseur de la peau est mesurée à l'aide d'un palmer.

- La formation d'érythème et d'œdème est évaluée selon la cotation du test d'IIPC.

- Un examen histologique de la peau et une analyse de sang et d'urine sont effectués mensuellement.

Les différents résultats sont présentés sous la forme d'un bilan général en fin d'expérience.

3) Les patch-tests

L'étude a été menée sur 50 patients (23 hommes et 27 femmes). Le système de patch-test est utilisé dans les hôpitaux pour déterminer la cause des réactions allergiques développées par certains patients. Il se présente sous forme d'une bande adhésive comportant de petites pastilles imprégnées des produits suspectés. Plusieurs tests peuvent être effectués simultanément. Pour notre expérimentation quatre tests ont été effectués par sujet :

- Un avec le tissu témoin non traité.
- Un avec le sel no 6 dilué à 1 mg.ml^{-1} . La solution est amenée à neutralité de pH.
- Un avec du tricot (Jersey) comportant 50 g d'ammonium quaternaire fixé (sel no 6) par kg de coton.
- Un avec du tissu chargé à 15 g/kg de coton.

Les produits sont appliqués au contact de la peau (dégraissée à l'éther) pendant 48 heures. La lecture est effectuée une demi-heure après l'ablation des patch-tests. L'estimation se fait selon la cotation internationale :

- 0 = Pas d'effet
- + = Erythème
- ++ = Erythème et oedème
- +++ = Erythème, oedème et vésicules

A la lecture, on peut observer également des réactions non allergiques mais orthoergiques qualifiées d'effet desséchant ou d'effet savon.

PRESENTATION DU TRAVAIL

Nos travaux ont été entrepris dans une optique de recherches à la fois appliquées et fondamentales. La recherche appliquée a pour objectifs, la conception et la synthèse d'un nouveau textile antimicrobien (biotextile). Ce textile doit être basé sur le concept de "biotextile à labilité fixe", qui permet l'obtention d'un tissu capable de conserver ses propriétés après lavage. Ainsi, il est possible de concevoir un textile antimicrobien de faible coût, utilisable à grande échelle. L'aspect fondamental concerne les ammoniums quaternaires, dont il est intéressant d'étudier le comportement et le mode d'action, après fixation. Le biotextile présente, en effet, un concept nouveau de désinfection avec des produits insolubles.

Pour ces études, il faut, dans un premier temps, déterminer la formule chimique des sels d'ammoniums quaternaires destinés à la fonctionnalisation du coton. Ces sels doivent présenter des qualités diverses : faible coût de fabrication, bon rendement de fixation, activité antiseptique intense et un profil toxicologique acceptable. La mise en évidence du pouvoir antiseptique des sels choisis, après leur fixation doit être faite par une méthode fiable adaptée à nos besoins. Après la mise au point de cette méthode, nous pourrons déterminer les principaux paramètres du futur biotextile (choix du sel, de la charge en produits fixés).

Dans la phase suivante, nous devons accéder à un stade de pré-synthèse industrielle (stade pilote). La faisabilité du procédé de fabrication à l'échelon industriel doit être établie sur la base d'un textile dont les caractéristiques sont déterminées dans la phase initiale. Ce textile peut alors être étudié de manière plus approfondie : spectre d'activité antibactérienne et antifongique, utilisations du biotextile à des applications spécifiques, ne relevant pas du domaine de l'hygiène corporelle (filtration de liquides, d'air).

L'aspect fondamental de nos travaux est surtout axé sur la comparaison de l'activité antiseptique entre les ammoniums quaternaires insolubles (fixés) et les produits solubles (libres). Deux préoccupations motivent ces études : la détermination du mode d'action du biotextile et l'étude de l'influence de différents facteurs physico-chimiques sur l'expression du pouvoir antiseptique. Ce dernier aspect présente un intérêt quant aux conditions d'utilisation future du biotextile. Dans un premier temps, les interactions entre les ammoniums quaternaires fixés et les systèmes membranaires des cellules bactériennes, sont étudiées par diverses méthodes (étude de la perméabilité membranaire, de la résistance et de la sensibilité de certaines bactéries). Dans un second temps, les influences de la température, du pH, de la présence de substances interférentes et de l'humidité relative, sur le pouvoir antiseptique du biotextile, sont abordées.

RESULTATS
ET
COMMENTAIRES

I. ELABORATION ET CARACTERISATION DU BIOTEXTILE

Dans cette phase, nous avons établi les principaux paramètres du biotextile :

- La formule chimique des sels d'ammonium quaternaire greffés.
- Les techniques d'étude du pouvoir antiseptique des tissus.
- La quantité optimale de sel à fixer.

Les sels ont été synthétisés par M. JOLY (1982), au laboratoire de Chimie Organique III de l'Université de Nancy I. Le traitement des celluloses a été effectué à la Filature de La Gosse.

1) La sélection des produits de fonctionnalisation

La détermination des Concentrations Minimales Inhibitrices (CMI) et de la résistance physico-chimique des sels de fonctionnalisation, ont pour principal objectif de détecter et déterminer les meilleurs produits de greffage. Sur 50 composés, élaborés par M. JOLY, 31 ont été rapidement abandonnés en raison de leur instabilité chimique et de leurs faibles rendements de synthèse ou de fonctionnalisation. Le choix des sels dépend de trois autres facteurs : pouvoir antiseptique, analyses toxicologiques et prix de revient.

1.1) Activité antiseptique des sels d'ammoniums quaternaires

Le pouvoir antiseptique des 19 sels, pré-sélectionnés par M. JOLY, a été déterminé en utilisant le cétrimide comme élément de comparaison. Les tests ont été menés avec Staphylococcus aureus CIP 7625 (tableau -XVII-) et quatre autres souches appartenant aux principaux groupes de microorganismes pathogènes hospitaliers (tableau -XVIII-).

Les sels du groupe IV (no 6, 8, 10, 36 et 37) se distinguent nettement des quatorze autres formules par leur activité antiseptique importante (CMI faible). Les sels no 36 et 37 sont même plus efficaces que le cétrimide. Nous remarquons d'emblée la grande sensibilité des bactéries à Gram positif et notamment de Staphylococcus aureus. La bactérie la plus résistante est Pseudomonas aeruginosa, ainsi qu'il était prévisible. Enfin, nous notons le bon comportement des sels vis-à-vis de la levure Candida albicans. La relation structure chimique-pouvoir antiseptique est débattue dans la partie confidentielle.

A la lecture de ces résultats, nous avons décidé de suivre plus particulièrement les sels du groupe IV, à savoir les sels no 6, 8, 10, 36 et 37. Les tests suivants ont été menés avec la bactérie la plus sensible (Staphylococcus aureus), afin de mieux détecter les variations du pouvoir antiseptique des sels.

Sel no	CMI	Sel no	CMI
<u>2</u>	2250	<u>26</u>	93,75
<u>6</u>	0,07	<u>28</u>	562,5
<u>8</u>	0,37	<u>29</u>	562,5
<u>10</u>	0,15	<u>30</u>	187,5
<u>20</u>	375	<u>32</u>	234,38
<u>21</u>	117,19	<u>33</u>	140,63
<u>22</u>	93,75	<u>35</u>	750
<u>23</u>	117,19	<u>36</u>	0,04
<u>24</u>	70,31	<u>37</u>	0,04
<u>25</u>	234,38	Cétrimide	0,04

Tableau -XVII- : Détermination des Concentrations Minimales Inhibitrices (CMI en $\mu\text{g.ml}^{-1}$) des sels libres vis-à-vis de Staphylococcus aureus CIP 7625 (10⁸ u. f. c. /ml)

Sel no	A	B	C	D
<u>2</u>	3750	3750	3750	3750
<u>6</u>	1,76	1,46	2,34	0,15
<u>8</u>	2,93	3,52	18,75	0,37
<u>10</u>	2,93	1,46	23,44	0,07
<u>20</u>	3750	3750	3750	1875
<u>21</u>	3000	3750	3750	3750
<u>22</u>	3000	1875	3750	1875
<u>23</u>	3000	2250	3750	937,5
<u>24</u>	1875	2250	1500	937,5
<u>25</u>	3000	1500	2250	937,5
<u>26</u>	3000	3750	3750	3750
<u>28</u>	3750	3750	3750	1875
<u>29</u>	3750	3750	3750	3750
<u>30</u>	3750	3750	3750	3750
<u>32</u>	3000	3750	3750	1875
<u>33</u>	3000	3000	2250	750
<u>35</u>	3750	3750	3750	3750
<u>36</u>	0,44	0,22	1,17	0,04
<u>37</u>	0,44	0,22	1,46	0,04
Cétrimide	1,46	0,37	1,46	0,04

Tableau -XVIII- : Détermination des Concentrations Minimales Inhibitrices (CMI en $\mu\text{g.ml}^{-1}$) des sels libres vis-à-vis de (10^5 u.f.c./ml) :

- A) Escherichia coli CIP 7624
- B) Candida albicans CHR
- C) Pseudomonas aeruginosa CIP 76110
- D) Streptococcus faecalis CIP 5855

1.2) Etude de la stabilité chimique des sels libres

Nous avons voulu, par cette étude, répondre aux questions suivantes :

- Les sels peuvent-ils résister aux traitements à température élevée (stérilisation par autoclavage) ?
- Sont-ils très sensibles aux variations de pH ?
- Des concentrations importantes de NaCl, présent dans la sueur, peuvent-elles modifier notablement le pouvoir antiseptique ?

1.2.1) Influence du traitement thermique

Les résultats obtenus (tableau -XIX-) montrent que les sels du groupe IV (6, 8, 10, 36 et 37) peuvent supporter un traitement à l'autoclave de vingt minutes à 121°C. L'activité antiseptique n'est pas modifiée. Nous avons par ailleurs montré que les sels du groupe III (sels 22 à 25) sont également stables, tandis que les sels des groupes I et II perdent une notable partie de leur pouvoir antiseptique, comme par exemple le sel 33 (CMI multipliée par quatre). Nous pouvons envisager la stérilisation des échantillons de tissu par autoclavage pour les tests ultérieurs.

sel no	non traité	75°C	100°C	121°C
<u>6</u>	1,95	1,95	1,95	1,95
<u>8</u>	0,37	0,37	0,37	0,73
<u>10</u>	0,24	0,12	0,24	0,24
<u>22</u>	625,00	625,00	625,00	625,00
<u>23</u>	312,50	625,00	625,00	625,00
<u>24</u>	312,50	312,50	312,50	312,50
<u>25</u>	625,00	625,00	625,00	625,00
<u>33</u>	140,63	281,25	375,00	469,75
<u>36</u>	0,49	0,49	0,49	0,49
<u>37</u>	0,49	0,49	0,49	0,49

Tableau -XIX- : Influence d'un traitement thermique de 20 minutes sur l'activité antiseptique (CMI en $\mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$) des 10 meilleurs sels vis-à-vis de Staphylococcus aureus CIP 7625 (10^5 u.f.c./ml)

1.2.2) Influence du pH

Les sels du groupe IV (6, 8, 10, 36 et 37) semblent être, une fois de plus, les molécules les plus stables. Leur activité antiseptique intense n'a pas permis la détection de variations notables dues au pH. Les sels des autres groupes montrent à l'opposé un comportement prévisible : leur activité antiseptique est plus importante à pH basique qu'à pH acide (tableau -XX-).

Certains sels (no 33), déjà instables au traitement thermique, perdent beaucoup d'activité à pH 6. Le comportement des sels au pH est important en raison de la future utilisation de ces composés qui seront au contact avec la peau (pH acide).

sel no	pH 6	pH 7	pH 8
<u>6</u>	0,37	0,37	0,18
<u>8</u>	0,37	0,37	0,73
<u>10</u>	0,37	0,73	0,37
<u>22</u>	1875,00	937,50	468,75
<u>23</u>	1875,00	937,50	468,75
<u>24</u>	937,50	234,38	117,19
<u>25</u>	937,50	937,50	468,75
<u>33</u>	3750,00	1875,00	468,75
<u>36</u>	0,18	0,18	0,18
<u>37</u>	0,18	0,18	0,18

Tableau -XX- : Influence du pH sur l'activité antiseptique (CMI en $\mu\text{g.ml}^{-1}$) des 10 meilleurs sels vis-à-vis de Staphylococcus aureus CIP 7625 (10^8 u.f.c/ml)

1.2.3) Influence de la concentration en chlorure de sodium

Les résultats (tableau -XXI-) nous ont confirmé l'instabilité des sels des groupes I et II, ainsi qu'on peut le voir, avec le sel 33, que nous pris pour exemple. Cependant, les variations de CMI sont moins importantes que dans les cas précédents (traitement thermique, pH). Pour les autres composés, il n'existe aucune différence entre la CMI déterminée en présence de 20 g.l⁻¹ de NaCl et la CMI déterminée avec 60 g.l⁻¹.

sel no	20 g.l ⁻¹	40 g.l ⁻¹	60 g.l ⁻¹
<u>6</u>	0,18	0,18	0,18
<u>8</u>	0,37	0,18	0,18
<u>10</u>	0,37	0,37	0,18
<u>22</u>	468,75	468,75	468,75
<u>23</u>	468,75	468,75	468,75
<u>24</u>	117,19	234,38	117,19
<u>25</u>	468,75	468,75	234,38
<u>33</u>	937,50	234,38	234,38
<u>36</u>	0,18	0,18	0,18
<u>37</u>	0,18	0,18	0,18

Tableau -XXI- : Influence de la concentration en NaCl sur l'activité antiseptique (CMI en µg.ml⁻¹) des 10 meilleurs sels vis-à-vis de Staphylococcus aureus CIP 7625 (10⁸ u.f.c/ml)

1.3) Etude toxicologique des meilleurs sels

Nous avons complété notre étude par un test toxicologique. Les meilleurs composés (sels no 6, 8, 10, 36 et 37) ont donc subi un test toxicologique, pour déterminer leur Indice d'Irritation Primaire Cutanée (IIPC). Ces tests ont été effectués à la Faculté de Pharmacie de Lille sous la direction de M. le professeur J.C. CAZIN.

sel no	IIPC	conclusions
<u>6</u>	2,25	Moyennement irritant
<u>8</u>	2,62	Moyennement irritant
<u>10</u>	3,00	Moyennement irritant
<u>36</u>	1,37	Légèrement irritant
<u>37</u>	1,37	Légèrement irritant

Tableau -XXII- : Indice d'Irritation Primaire Cutanée ou IIPC, des solution aqueuses ($0,1 \text{ mg.ml}^{-1}$) des cinq meilleurs sels (groupe IV). Tests effectués sur la peau du lapin.

Les IIPC permettent de classer les sels en deux groupes (tableau -XXII-) :

- Sels légèrement irritants : no 36 et 37
- Sels moyennement irritants : no 6, 8 et 10

L'irritation légère ou moyenne provoquée par les solutions à $0,1 \text{ mg.ml}^{-1}$ des sels retenus est souvent observée pour des ammoniums quaternaires (CUTLER 1970).

1.4) Conclusions

Le choix des formules est simple. Seuls les composés du groupe IV présentent un intérêt pour nous. Nous avons cependant décidé l'abandon du sel no 10 qui est à la fois le sel le moins actif et celui qui possède le plus fort Indice d'Irritation Primaire Cutanée. Les quatre formules choisies (sels no 6, 8, 36 et 37) possèdent, en outre, un rendement de fixation acceptable (voir la partie confidentielle).

2) Le choix de la méthode de détermination du pouvoir antiseptique des celluloses fonctionnalisées

Les deux étapes suivantes de notre travail ont pour but :

- 1- De savoir si les sels d'ammoniums quaternaires sont encore actifs après la fixation sur le coton.
- 2- De choisir une méthode fiable pour déterminer cette activité antiseptique.

Ces deux points ont été traités simultanément. L'objectif visé est la mise au point du protocole expérimental permettant de mettre en évidence, de la manière la plus sûre possible, l'activité antiseptique des tissus traités.

2.1) Les tests préliminaires

Les premiers essais furent menés avec des échantillons de tricot Jersey fonctionnalisés par le sel no 8. Deux charges furent utilisées : 36 et 146 g/kg de coton.

Les techniques usuelles de détermination du pouvoir antiseptique (CMI, méthode des coefficients phénol) ne peuvent pas être appliquées à cause de l'immobilisation des molécules antiseptiques après le traitement. Nous avons pu constater qu'en présence d'un morceau de tissu traité, une culture bactérienne est simplement retardée (figure -18-). Le temps de latence est allongé mais la phase exponentielle de croissance n'est pas modifiée. Il semble que le tissu ait agi, sans toutefois éliminer toutes les bactéries présentes initialement. Les cellules, qui ne sont pas entrées au contact avec le tissu, ont subsisté et se sont reproduites. Cette simple expérience nous donne deux indications intéressantes :

- Les sels d'ammoniums quaternaires sont bien fixés et ne diffusent pas dans le milieu ambiant ; dans le cas contraire, les cellules auraient été inhibées rapidement. Le non-relargage d'ammoniums quaternaires par le tissu a pu être mis en évidence en s'inspirant de la méthode des antibiogrammes. Si un morceau de tissu est déposé à la surface d'une gélose nutritive ensemencée, il n'apparaît aucun halo d'inhibition autour du tissu après incubation.

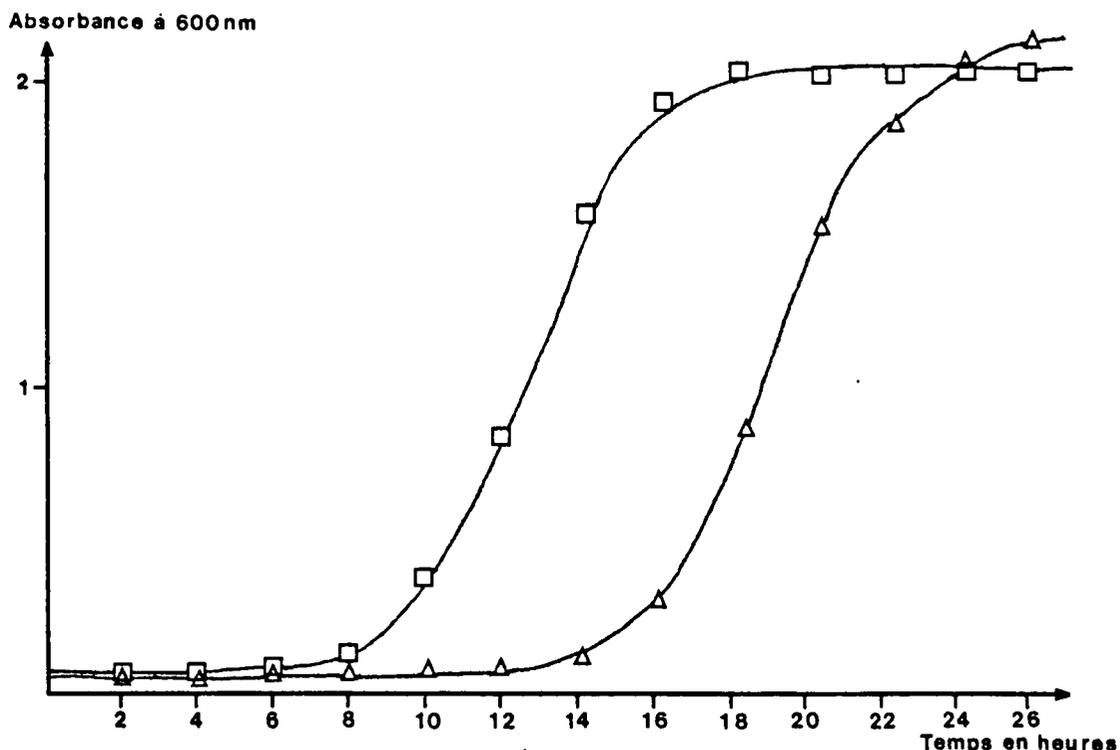


Figure -18- : Courbes de croissance d'une culture (5 ml) non agitée de Staphylococcus aureus sur milieu de LURIA à 37°C : (□) témoin sans tissu, (Δ) en présence d'un échantillon (5 cm²) de tissu traité avec le sel no 8 (36 g/kg de coton)

De même, des bactéries, mises en suspension dans une solution de NaCl à 9 g.l⁻¹ où a séjourné un échantillon de biotextile, ne sont pas inhibées.

- Il semble, par ailleurs, que les sites actifs du tissu se 'saturent' selon le modèle (3) de GAGLIARDI (1962), que nous avons évoqué page 66. Dans ce modèle (biotextile à labilité fixe), l'antiseptique fixé à la fibre ne peut agir qu'une fois. Si la population initiale de bactéries n'est pas inhibée rapidement, elles se développent et la capacité du biotextile est rapidement dépassée ; il devient totalement inactif. La croissance bactérienne se développe alors normalement. Si les sites ne s'étaient pas saturés, nous aurions probablement obtenu un effet bactéricide ou bactériostatique (population stable), ou encore des courbes de croissance plus étalées. Il est donc primordial que toutes les cellules entrent en contact avec le tissu lors des tests d'efficacité antimicrobienne.

Nous sommes donc confrontés au problème suivant : Tester à la fois le pouvoir antiseptique d'un désinfectant insoluble et d'une surface "auto-stérile. Pour solutionner ce problème, nous avons choisi deux méthodes simples où le contrôle de l'inoculum est aisé : La méthode du contact agité, où l'agitation favorise le contact des bactéries avec le tissu, et la méthode AATCC (1975), où le tissu est imprégné par une suspension bactérienne.

2.2) Comparaison entre la méthode du contact agité et la méthode AATCC

Les celluloses utilisées lors des essais, sont des tricots (jersey) traités à raison de 36 et 146 g de sel no 8 par kg de coton. Nous avons choisi Staphylococcus aureus CIP 7625, pour l'ensemble des tests. Nous avons rassemblé, pour chaque méthode, deux exemples où la population bactérienne initiale est sensiblement identique. Les essais effectués avec la méthode du contact agité sont rassemblés dans le tableau -XXIII- ; ceux effectués par la méthode de l'AATCC, dans le tableau -XXIV-

Comme on peut le voir sur les deux tableaux de résultats, les tissus greffés avec le sel no 8 possèdent une activité bactéricide. Dans certains cas, nous n'avons détecté aucune bactérie survivante après 6 heures de contact pour un inoculum initial de 10^4 u.f.c par cm^2 . Par ailleurs, une charge importante en ammonium quaternaire (146 g/kg de coton) ne semble pas plus active qu'une charge de 36 g/kg de coton. Nous retrouverons ce phénomène ultérieurement.

Le tableau -XXIII- montre que nous avons eu des problèmes de reproductibilité des résultats avec la méthode du contact agité. Les tissus traités montrent tantôt une activité bactéricide intense, tantôt une activité antiseptique faible. Dans certains cas, les bactéries ont été inhibées fortement dans le tube témoin. Plusieurs raisons peuvent expliquer ces écarts importants. D'abord l'agitation n'est peut être pas suffisamment homogène, malgré le système de tables tournantes dont nous disposons. D'autre part, la

charge	N ₀	N ₆	S ₆	N ₂₄	S ₂₄
<u>Exemple no 1</u>					
témoin	1,2.10 ⁴	8,7.10 ²	7,25	3,7.10 ³	30,8
36 g/kg	"	6	0,05	3	0,03
146 g/kg	"	33	0,28	1,1.10 ²	0,92
<u>Exemple no 2</u>					
témoin	1,4.10 ⁴	7,7.10 ²	5,54	3,3.10 ³	23,57
36 g/kg	"	0	0	0	0
146 g/kg	"	0	0	0	0

Tableau -XXIII- : Détermination, par la méthode du contact agité, de l'activité antiseptique de celluloses greffées avec le sel no 8, vis-à-vis de Staphylococcus aureus CIP 7625

N₀, N₆ et N₂₄ : u.f.c. par cm² de tissu après 0, 6 et 24 heures de contact

S₆ et S₂₄ : Indices de survie (%)

charge	N ₀	N ₆	S ₆	N ₂₄	S ₂₄
<u>Exemple no 1</u>					
témoin	1,2.10 ³	7,9.10 ²	65,8	1,7.10 ³	142
36 g/kg	"	63	5,25	4	0,33
146 g/kg	"	35	2,92	0	0
<u>Exemple no 2</u>					
témoin	1,3.10 ³	7,7.10 ²	59,2	2,5.10 ³	192
36 g/kg	"	61	4,69	13	1,00
146 g/kg	"	34	2,62	0	0

Tableau -XXIV- : Détermination, par la méthode AATCC de l'activité antiseptique de celluloses greffées avec le sel no 8, vis-à-vis de Staphylococcus aureus CIP 7625

N₀, N₆ et N₂₄ : u.f.c. par cm² de tissu après 0, 6 et 24 heures de contact

S₆ et S₂₄ : Indices de survie (%)

numération est faite sur une partie aliquote du tampon où plonge l'échantillon de tissu. Par conséquent, nous n'évaluons pas la quantité de bactéries présentes au niveau des textiles. Or, il est fort probable que les cellules bactériennes soient attirées vers les tissu traités, et peut-être vers les tissus témoins. La répartition des cellules ne serait pas homogène malgré l'agitation des tubes. Enfin, pour effectuer les prélèvements, les tubes doivent être sortis momentanément de la chambre chaude et l'agitation arrêtée. Ces manipulations sont une nouvelle source de variations et peuvent expliquer le fait qu'il ne subsiste que 5 à 7 % de la population initiale après 6 heures, dans les tubes témoins.

La méthode de l'AATCC est bien plus satisfaisante. La reproductibilité des résultats, telle qu'elle apparaît dans le tableau -XXIV-, n'est pas une exception. La tenue des témoins est meilleure puisque nous arrivons à maintenir la population initiale à un bon niveau de stabilité. Le problème principal est d'acquérir la certitude que toutes les bactéries, présentes sur le tissu, sont bien détachées par le milieu lécithine-tween. Nous avons suivi conjointement la survie de deux populations identiques de bactéries mises en suspension dans le tampon phosphate. L'une est demeurée dans un tube à essai, l'autre a été déposée sur un tissu témoin. La quantité totale de cellules survivantes a été déterminées après 0, 6 et 24 h d'incubation à 30°C (tableau -XXV-). Au temps initial, nous récupérons environ 83 % des bactéries inoculées sur tissu. Ces résultats sont en accord avec ceux de HOFFMAN (1955) et de WILLIAMSON (1965), qui estiment à 83-85 % le taux de récupération de cellules bactériennes déposées sur la peau et détachées selon une méthode similaire. Un taux identique de 83 % est obtenu, au temps initial (N_0), avec des textiles traités. Après 6 ou 24 h d'incubation, il n'est plus possible de calculer un pourcentage de récupération. Les conditions différentes d'incubation influent sur la survie des bactéries. Ainsi, les cellules au contact du tissu ont un meilleur taux de survie. L'explication de ce phénomène réside peut-être dans l'existence de matières nutritives au niveau des celluloses. Cependant, par microscopie électronique à balayage, nous avons pu constater, tant sur tissu traité que sur tissu témoin, l'absence quasi-totale de bactéries au niveau des fibres, après lavage au milieu lécithine-tween. Nous avons donc admis un taux de récupération de 83 % pour toutes les opérations de dénombrement de bactéries sur tissu.

	N_0	N_6	N_{24}
-A-	$6,0 \cdot 10^4$	$4,4 \cdot 10^3$	$1,9 \cdot 10^4$
-B-	$5,0 \cdot 10^4$	$6,0 \cdot 10^4$	$2,5 \cdot 10^4$

Tableau -XXV- : Survie de Staphylococcus aureus CIP 7625 en tampon phosphate 0,2 M pH 7,2 à 30°C : -A- sans tissu (1 ml) et -B- avec tissu (1 ml pour 60 cm² de tissu témoin). (N_0 , N_6 et N_{24} : u.f.c./ml après 0, 6 et 24 h)

Nous avons procédé à des tests statistiques afin d'évaluer la précision de la méthode AATCC. Le tableau -XXVI- rassemble 20 cinétiques de survie de Staphylococcus aureus sur tissu témoin. Nous avons estimé la précision de chaque mesure (N_0 , N_6 et N_{24}). A la moyenne m des n estimations de la mesure considérée, est assigné un intervalle de confiance pour un risque de 5 % :

$$m \pm \frac{t \cdot s}{\sqrt{n}}$$

s est l'écart-type estimé sur la mesure, et t la valeur donnée par la table de t pour le nombre de degrés de liberté ($n-1$) et le risque 5 %. Nous obtenons ainsi :

$$\begin{aligned} N_0 &= (1,6 \pm 0,2) \cdot 10^5 \text{ u.f.c./cm}^2 ; \log(N_0) = 5,025 \pm 0,053 \\ N_6 &= (1,1 \pm 0,3) \cdot 10^5 \text{ u.f.c./cm}^2 ; \log(N_6) = 5,002 \pm 0,105 \\ N_{24} &= (6,8 \pm 3,9) \cdot 10^4 \text{ u.f.c./cm}^2 ; \log(N_{24}) = 4,520 \pm 0,270 \end{aligned}$$

Les mesures N_0 et N_6 sont très précises ($\pm 0,1$ unité log). La comparaison de ces deux moyennes indique que N_0 n'est pas significativement différent de N_6 (risque de 5 %). La mesure de N_{24} est beaucoup plus fluctuante ($\pm 0,3$ unité log). Nous attribuons ce fait à l'hétérogénéité des tissus (impuretés, différentes qualités de coton). En moyenne, pour Staphylococcus aureus, la population décroît sensiblement. N_6 et N_0 sont, par ailleurs, significativement différents de N_{24} (risque de 5 %).

n	N_0	log	N_6	log	N_{24}	log
1	$1,2 \cdot 10^5$	5,079	$1,2 \cdot 10^5$	5,079	$8,8 \cdot 10^4$	4,944
2	$1,8 \cdot 10^5$	5,255	$1,3 \cdot 10^5$	5,114	$7,4 \cdot 10^4$	4,869
3	$1,5 \cdot 10^5$	5,176	$2,2 \cdot 10^5$	5,342	$3,6 \cdot 10^5$	5,556
4	$1,0 \cdot 10^5$	5,000	$6,2 \cdot 10^4$	4,792	$2,1 \cdot 10^4$	4,322
5	$1,6 \cdot 10^5$	5,204	$1,2 \cdot 10^5$	5,079	$8,7 \cdot 10^4$	4,940
6	$1,8 \cdot 10^5$	5,255	$1,0 \cdot 10^5$	5,000	$1,4 \cdot 10^4$	4,146
7	$1,9 \cdot 10^5$	5,279	$2,2 \cdot 10^5$	5,342	$1,1 \cdot 10^5$	5,041
8	$1,2 \cdot 10^5$	5,079	$7,0 \cdot 10^4$	4,845	$8,1 \cdot 10^4$	4,908
9	$2,3 \cdot 10^5$	5,362	$1,0 \cdot 10^5$	5,000	$1,3 \cdot 10^5$	5,114
10	$1,9 \cdot 10^5$	5,279	$1,7 \cdot 10^5$	5,230	$1,8 \cdot 10^5$	5,255
11	$2,0 \cdot 10^5$	5,301	$1,1 \cdot 10^5$	5,041	$6,2 \cdot 10^4$	4,792
12	$1,5 \cdot 10^5$	5,176	$1,5 \cdot 10^5$	5,176	$5,2 \cdot 10^4$	4,716
13	$2,1 \cdot 10^5$	5,322	$4,2 \cdot 10^4$	4,623	$7,6 \cdot 10^3$	3,881
14	$2,2 \cdot 10^5$	5,342	$5,8 \cdot 10^4$	4,763	$9,2 \cdot 10^3$	3,964
15	$2,0 \cdot 10^5$	5,301	$1,8 \cdot 10^5$	5,255	$2,5 \cdot 10^4$	4,398
16	$1,6 \cdot 10^5$	5,204	$6,8 \cdot 10^4$	4,833	$5,1 \cdot 10^3$	3,708
17	$1,5 \cdot 10^5$	5,176	$1,0 \cdot 10^5$	5,000	$6,4 \cdot 10^3$	3,806
18	$1,0 \cdot 10^5$	5,000	$5,2 \cdot 10^4$	4,716	$2,7 \cdot 10^4$	4,431
19	$1,1 \cdot 10^5$	5,041	$4,3 \cdot 10^4$	4,633	$1,3 \cdot 10^4$	4,114
20	$1,9 \cdot 10^5$	5,279	$1,5 \cdot 10^5$	5,176	$3,0 \cdot 10^4$	3,477
m	$1,6 \cdot 10^5$	5,025	$1,1 \cdot 10^5$	5,002	$6,8 \cdot 10^4$	4,520
s	$0,4 \cdot 10^5$	0,113	$0,6 \cdot 10^5$	0,224	$8,4 \cdot 10^4$	0,568
i	$0,2 \cdot 10^5$	0,053	$0,3 \cdot 10^5$	0,105	$3,9 \cdot 10^4$	0,270

Tableau -XXVI- : Estimation de la précision des dénombrements
(méthode AATCC) sur tissu témoin, avec
Staphylococcus aureus CIP 7625

n : numéro d'essai

N_0, N_6 et N_{24} : u.f.c./cm² de tissu après 0, 6 et 24 heures de contact

log : logarithme décimal de N_0, N_6 et N_{24}

m : Moyenne

s : écart-type

i : Intervalle de confiance pour un risque de 5 %
(t = 2,093)

Si nous nous référons de nouveau au tableau -XXV- en appliquant les intervalles de confiance, les dénombrements N_0 ne sont pas significativement différents. La méthode de récupération des cellules bactériennes par le milieu lécithine-tween est donc fiable.

2.3) Conclusions

La méthode du contact agité n'est pas fiable car elle est trop peu fidèle (non reproductibilité des résultats). Les témoins ne sont pas satisfaisants ; la survie des bactéries est précaire. Nous avons donc choisi la méthode de l'AATCC, qui ne présente aucun de ces inconvénients. Cette méthode permet, en outre, de traiter un nombre plus important d'échantillons dans une même expérimentation.

Nous avons pu prouver que le sel no 8 demeure actif après fixation grâce à la technique développée par l'AATCC. Cette dernière méthode a été adoptée définitivement comme test de routine pour éprouver l'efficacité bactéricide des tissus traités.

3) Le pouvoir antiseptique des celluloses fonctionnalisées

Jusqu'à présent, le choix du sel d'ammonium quaternaire, de la charge et de la taille de l'inoculum, ont été arbitraires. Ces paramètres ont été définis sur des échantillons de tricot (Jersey) traités par les sels retenus (no 6, 8, 36 et 37).

3.1) Activité antiseptique des sels fixés

Les celluloses ont été traitées à raison de 15 g de sel par kg de coton et éprouvées vis-à-vis de quatre souches bactériennes (tableau -XXVII-). Les tests ont été menés avec 10^3 u.f.c./cm² de tissu, sauf pour Pseudomonas aeruginosa, qui s'est rapidement avérée plus résistante que les autres souches.

Les quatre tissus ont réussi à inhiber les suspensions de Staphylococcus aureus, d'Escherichia coli et de Streptococcus faecalis. Après 6 heures de contact, il ne subsiste plus guère de germes revivifiables.

sel no	N ₀	N ₆	S ₆	N ₂₄	S ₂₄
<u>Staphylococcus aureus</u> CIP 7625					
témoin	5,3.10 ³	2,8.10 ³	52,8	4,8.10 ³	90,6
6	"	5	0,09	0	0
8	"	21	0,39	5	0,09
36	"	4	0,07	0	0
37	"	0	0	0	0
<u>Escherichia coli</u> CIP 7624					
témoin	3,8.10 ³	4,8.10 ³	126	1,4.10 ⁴	368
6	"	1	0,02	1	0,02
8	"	11	0,29	2	0,05
36	"	0	0	0	0
37	"	0	0	8	0,21
<u>Pseudomonas aeruginosa</u> CIP 76110					
témoin	5,4.10 ²	8,3.10 ²	154	4,6.10 ⁴	8518
6	"	8	1,48	17	3,15
8	"	5,0.10 ²	92,6	1,1.10 ⁵	20370
36	"	4,0.10 ²	74,2	5,4.10 ⁴	10000
37	"	1,4.10 ³	259	1,9.10 ⁵	35185
<u>Streptococcus faecalis</u> CIP 5855					
témoin	3,2.10 ³	7,5.10 ²	23,4	1,3.10 ³	40,6
6	"	5	0,16	0	0
8	"	9	0,28	3	0,09
36	"	75	2,34	0	0
37	"	0	0	10	0,31

Tableau -XXVII- : Activité antiseptique de celluloses fonctionnalisées par des sels d'ammoniums quaternaires (charge 15 g/kg de coton)

N₀, N₆ et N₂₄ : u.f.c./cm² de tissu après 0, 6 et 24 heures de contact

S₆ et S₂₄ : Indices de survie (%)

Avec Pseudomonas aeruginosa, seule la cellulose greffée avec le sel no 6 est active. Les autres tissus se comportent comme le tissu témoin (différences non significatives). Lorsque l'inoculum est augmenté (10^9 u.f.c./cm² de tissu), le tissu greffé au sel no 6 a un effet bactériostatique (nombre identique de bactéries après 24 heures).

Nous avons pu remarquer, que si les bactéries n'étaient pas totalement inhibées après 6 heures de contact, la population microbienne se reformait rapidement pour atteindre ou dépasser la quantité initiale de germes présents sur les tissus. Les bactéries survivantes se développent en utilisant les substances nutritives issues des cellules mortes et des minéraux apportés par les impuretés du coton. Nous observons souvent une baisse légère du nombre de bactéries sur les témoins après 6 heures de contact. Cette observation est imputable au stress causé par la préparation de l'inoculum (centrifugations, changement de milieu .. etc).

3.2) Détermination de la charge en ammonium quaternaire

Nous avons utilisé des celluloses greffées avec les formules qui ont montré la meilleure activité antiseptique, lors la détermination des CMI : Les sels no 36 et 37. Plusieurs taux de greffage, compris entre 1 et 50 g de sel par kg de coton, ont été testés vis-à-vis de Staphylococcus aureus et d' Escherichia coli. Les résultats sont rapportés dans le tableaux -XXVIII- (sel no 36) et le tableau -XXIX- (sel no 37).

Une charge de 5 g/kg de coton suffit à inhiber en 6 heures des suspensions de l'ordre de 10^4 u.f.c./cm² de Staphylococcus aureus (sels no 36 et 37). Les tissus chargés à raison de 1 g de sel par kg de coton sont rapidement saturés. Leur effet n'est que bactériostatique, car le taux d'ammoniums quaternaires fixés est trop faible pour inhiber la totalité des cellules. Les cellules survivantes ont donc pu de développer. L'hypothèse de la saturation des sites actifs se trouve de nouveau plus ou moins confirmée. Il conviendra ultérieurement de connaître le devenir de ces sites actifs pour savoir s'ils sont masqués ou consommés ; si la saturation est irréversible ou non.

charge	N ₀	N ₆	S ₆	N ₂₄	S ₂₄
<u>Staphylococcus aureus</u> CIP 7625					
témoin	1,9.10 ⁴	1,1.10 ⁴	57,9	2,1.10 ⁴	110,5
50	"	13	0,07	9	0,05
35	"	5	0,03	0	0
5	"	12	0,06	0	0
1	"	1,4.10 ²	0,74	2,5.10 ⁴	131,6
<u>Escherichia coli</u> CIP 7624					
témoin	7,1.10 ²	2,6.10 ²	36,6	5,0.10 ⁵	70422
50	"	0	0	0	0
35	"	0	0	0	0
5	"	0	0	0	0
1	"	1,4.10 ²	19,7	1,5.10 ⁵	21126

Tableau -XXVIII- : Influence de la charge (g/kg de coton)
 en sel no 36 sur le pouvoir antiseptique de
 celluloses fonctionnalisées

N₀, N₆ et N₂₄ : u.f.c./cm² de tissu après 0, 6 et 24 heures
 de contact

S₆ et S₂₄ : Indices de survie (%)

charge	N ₀	N ₆	S ₆	N ₂₄	S ₂₄
<u>Staphylococcus aureus</u> CIP 7625					
témoin	9,5.10 ³	1,8.10 ³	18,9	8,4.10 ³	88,4
50	"	0	0	0	0
35	"	0	0	0	0
15	"	4	0,04	0	0
5	"	0	0	0	0
1	"	2,4.10 ²	2,53	6,2.10 ³	65,3
<u>Escherichia coli</u> CIP 7624					
témoin	2,5.10 ³	8,8.10 ²	35,2	5,8.10 ⁴	2320
50	"	1,0.10 ²	4,0	0	0
35	"	0	0	21	0,84
15	"	0	0	0	0
5	"	0	0	0	0
1	"	2,7.10 ³	108,0	8,3.10 ⁵	33200

Tableau -XXIX- : Influence de la charge (g/kg de coton)
 en sel no 37 sur le pouvoir antiseptique de
 celluloses fonctionnalisées

N₀, N₆ et N₂₄ : u.f.c./cm² de tissu après 0, 6 et 24 heures
 de contact

S₆ et S₂₄ : Indices de survie (%)

Des résultats similaires sont observés avec la bactérie Escherichia coli pour des inoculum de l'ordre de 10^9 u.f.c. par cm^2 de tissu. Les sels no 36 et 37 ont une activité bactéricide très proche.

3.3) Détermination de l'activité antiseptique maximale

La quantité maximale de cellules bactériennes, pouvant être inhibées par cm^2 de tissu, a été déterminée en corrélation avec la charge en ammoniums quaternaires fixés. Notre propos est de déterminer le seuil de saturation des différents taux de greffages. Les essais ont été menés avec les sels 36 et 37 fixés à différents taux (50 à 1 g/kg de coton). Nous avons fait varier la taille de l'inoculum de 10^5 à 10^7 u.f.c./ cm^2 pour Staphylococcus aureus CIP 7625 et de 10^3 à 10^5 u.f.c./ cm^2 pour Escherichia coli CIP 7624. Afin de simplifier l'exposé des résultats, nous nous sommes servis du système de notation (tableau -XIV-, p. 91) en utilisant les symboles +/-.

Etant donné que les activités des sels 36 et 37 sont très proches (tableaux -XXVIII- et -XXVIX-), les résultats obtenus ont été considérés globalement et rassemblés dans le tableau -XXX-.

Vis-à-vis de Staphylococcus aureus, la quantité maximale de cellules inhibées en 6 heures a été de l'ordre de 10^6 u.f.c./ cm^2 de tissu. Le textile, qui a permis ce résultat, est greffé à raison de 15 g/kg de coton. Il est également le seul à pouvoir inhiber en 24 heures des suspensions bactériennes de l'ordre de 10^7 u.f.c./ cm^2 . Vis-à-vis d'Escherichia coli, la meilleure activité a été observée avec les celluloses traitées à 15 et 35 g/kg de coton. Ces tissus inhibent fortement en 6 heures, une suspension bactérienne de 10^4 u.f.c./ cm^2 .

Nous avons pu constater, que les tissus les plus rapidement saturés sont ceux qui possèdent la plus faible charge en ammoniums quaternaires (1 et 5 g/kg de coton). Par contre, le tissu ayant la charge la plus élevée (50 g/kg de coton) n'est pas celui qui possède la plus forte activité antiseptique. Nous avons déjà remarqué que le tissu traité au sel no 8 n'était pas plus actif à 146 g/kg de coton par rapport à une charge plus faible (36 g/kg).

charge en sels 36 ou 37 g/kg de coton	<u>Staphylococcus aureus</u>		
	u. f. c. /cm ²		
	10 ⁵	10 ⁶	10 ⁷
50	+++	++	+
35	+++	++	+
15	+++	+++	+
5	+++	+	-
1	-	-	-

charge en sels 36 ou 37 g/kg de coton	<u>Escherichia coli</u>		
	u. f. c. /cm ²		
	10 ³	10 ⁴	10 ⁵
50	++	+	+
35	+++	++	+
15	+++	++	+
5	+++	+	-
1	-	-	-

Tableau -XXX- : Activité antiseptique de celluloses fonctionnalisées en fonction de la charge en ammoniums quaternaires (g/kg de coton) et de la taille de l'inoculum

Deux raisons peuvent être avancées pour expliquer ce dernier phénomène. La fonctionnalisation apporte au tissu un nombre important de charges positives. La présence de ces charges électriques peut induire des effets électrostatiques importants (HERSH 1981). Par ailleurs, le traitement du coton par les sels du groupe IV augmente son hydrophobicité et le tissu s'imbibe moins d'eau. Le contact bactérie-tissu serait moins intime.

En conclusion, il existe une charge optimale en ammonium quaternaire où l'activité du biotextile est maximale. Cette charge se situerait entre 15 et 35 g/kg de coton.

3.4) Mise en évidence du masquage des sites actifs

Par une expérimentation simple, nous avons voulu savoir si les ammoniums quaternaires étaient consommés ou inhibés après avoir agi. Notre propos est ici de déterminer si le tissu est réutilisable. Les essais ont été menés avec des tricot jersey traités avec le sel no 6 à raison de 15 g/kg de coton.

Nous avons, dans un premier temps, laissé pendant 24 heures des échantillons de tissu au contact d'une suspension importante (10^8 u.f.c./cm²) de Pseudomonas aeruginosa ou de Staphylococcus aureus. Les échantillons ont été récupérés, puis stérilisés à 121°C pendant 20 minutes. Certains tissus ont ensuite subi successivement les traitements suivants :

-2 lavages rapides à l'eau de la ville.

-2 lavages dans l'alcool à 50 % (V/V) pendant une nuit à 30°C (dégraissage).

-5 rinçages à l'eau distillée.

Nous n'avons volontairement pas utilisé de détergents qui pourraient interagir avec les sels d'ammoniums quaternaires. Les tissus lavés et non lavés ont été de nouveau stérilisés.

L'activité antiseptique des tissus lavés a été éprouvée vis-à-vis d' Escherichia coli. Les résultats sont rassemblés dans le tableau -XXXI-.

L'apprêt antimicrobien ne semble avoir été altérés ni par le contact préalable avec les bactéries, ni par les lavages : les tissus conservent leur pouvoir antiseptique. Les biotextiles peuvent donc être réutilisés. Les ammoniums quaternaires sont cependant inactivés après avoir été au contact avec des cellules bactériennes. Mais si les sites actifs sont neutralisés après avoir agi, le masquage n'est pas irréversible. La raison de ce phénomène reste à déterminer. Enfin, nous avons pu remarquer que ni le traitement à l'alcool, ni surtout la stérilisation à 121°C, n'ont modifié l'activité antimicrobienne des tissus traités.

tissus	N ₀	N ₆	S ₆	N ₂₄	S ₂₄
<u>Celluloses non traitées</u>					
témoin	5,6.10 ³	4,8.10 ²	8,6	1,4.10 ³	25
S	"	8,9.10 ⁵	15892	2,0.10 ⁶	35714
S lavé	"	4,7.10 ²	8,4	4,0.10 ⁴	714
P	"	2,3.10 ⁵	4107	3,1.10 ⁶	55357
P lavé	"	4,8.10 ²	8,6	3,8.10 ⁴	678
<u>celluloses traitées (sel no 6 à 15 g/kg)</u>					
témoin	5,6.10 ³	1	0,02	0	0
S	"	1,5.10 ⁴	268	5,2.10 ⁵	9386
S lavé	"	0	0	0	0
P	"	3,6.10 ⁴	643	4,3.10 ⁵	7678
P lavé	"	20	0,36	0	0

Tableau -XXXI- : Recouvrement de l'activité antiseptique de celluloses ayant été au contact avec des cellules bactériennes vivantes
(Tests effectués avec Escherichia coli CIP 7624)

P : tissu ayant été préalablement mis au contact avec Pseudomonas aeruginosa

S : tissu ayant été préalablement mis au contact avec Staphylococcus aureus

Lavages : 2 fois à l'eau claire.
2 fois à l'alcool (50 % V/V)
5 fois à l'eau distillée

N₀, N₆ et N₂₄ : u.f.c./cm² de tissu après 0, 6 et 24 heures de contact.

S₆ et S₂₄ : Indices de survie (%)

4) L'étude toxicologique des tissus traités

4.1) Détermination de l'Indice d'Irritation Primaire Cutanée

Cinq déterminations ont été effectuées avec une cellulose témoin et quatre tissus traités à 15 g/kg de coton par les sels no 6, 8, 36 et 37 (tableau -XXXII-).

Les IIPC des tissus traités sont proches de celui du tissu témoin (100 % coton). La cellulose greffée avec le sel no 37 n'est même que très légèrement irritante. Ces résultats ne sont pas étonnants ; on compte parmi les ammoniums quaternaires d'excellents adoucissants. Nous remarquons enfin que les sels fixés sont beaucoup moins irritants que les sels libres (tableau -XXII-). La raison probable est qu'ils ne peuvent pas pénétrer dans l'épiderme. Pour cette même raison, les études de mutagénèse (tests de AMES) et de toxicité cellulaire ne peuvent pas être envisagés (absence de diffusion des molécules greffées).

sel no	I. I. P. C.	conclusions
6	0,50	Légèrement irritant
8	0,41	Légèrement irritant
36	0,64	Légèrement irritant
37	0,16	Très légèrement irritant
témoin	0,50	Légèrement irritant

Tableau -XXXII- : Indices d'Irritation Primaire Cutanée de celluloses fonctionnalisées à 15 g/kg de coton Tests effectués sur la peau du lapin

4.2) Etude de la tolérance cutanée aux applications itératives

Les tests ont été suivis avec une cellulose traitée par le sel no 6 à raison de 50 g/kg de coton. Les résultats de ce test ont démontré l'innocuité des tissus traités après 90 jours de contact itératif sur la peau de lapins. Il n'a été décelé :

- Aucune influence sur l'évolution pondérale normale des animaux ;
- Aucune altération de l'épaisseur de la peau ;
- Aucune influence ni sur la croissance, ni sur l'aspect et la structure des poils ;
- Aucun érythème, ni oedème ;
- Aucune influence sur les principaux paramètres sanguins et urinaires ;
- Aucune altération de la structure histologique de la peau.

4.3) Tests d'allergénicité

Les tests ont été menés sur 50 patients avec un tissu témoin (100 % coton), deux tissus traités au sel no 6 à 15 et 50 g/kg de coton, et une solution de sel no 6 à 1 mg.ml⁻¹.

Les quatre tests ont été négatifs chez 47 patients. Un effet desséchant a été observé chez une patiente avec la solution d'ammonium quaternaire. Cet effet n'est pas de nature allergique. Il s'agit d'une réaction observée de manière non rarissime avec les ammoniums quaternaires. Deux patients (sur 50) ont présenté des tests nettement positifs (tableau -XXXIII-).

Le premier cas est troublant. Selon toute évidence , le sujet présente une sensibilité au tissu lui-même ou vraisemblablement à un apprêt. Cet apprêt n'est pas le sel no 6 puisque ce test est négatif. Le second cas indique une sensibilisation au sel no 6 fixé et libre. Ce dernier sujet appartient à un groupe de patients polysensibles. Sur les 50 patients inclus dans l'étude, 24 présentaient une ou plusieurs réactions positives sur d'autres tests. Ce fait mérite d'être signalé.

sexe	témoin	15 g/kg	50 g/kg	sel 6	autres tests
M	++	++	+++	0	cétrimide +++
M	0	++	+++	+	PPD +, Hg +++ Thiomersal +++

Tableau -XXXIII- : Tests positifs de l'étude d'allergénicité
(résultats de 2 patients atypiques)

5) Conclusions, choix des paramètres du biotextile

Les ammoniums quaternaires ne doivent pas être nécessairement solubles pour agir efficacement. Nous avons mis en évidence cette activité antiseptique grâce à une méthode développée par l'AATCC et adaptée à nos besoins. Nous avons vu que les tissus sont inactivés après avoir agi sur les cellules bactériennes, de sorte qu'ils peuvent être saturés rapidement en présence de forts inoculum. L'activité des textiles peut être retrouvée après lavage. Les quatre sels (no 6, 8, 36 et 37) sélectionnés pour leur activité antiseptique (CMI), se sont avérés actifs après leur fixation sur coton.

Les résultats obtenus jusqu'à présent (activités antiseptiques et analyses toxicologiques), nous ont incités à poursuivre l'étude et pour accéder à un stade pilote de synthèse industrielle. Pour ce faire, nous devons sélectionner un sel d'ammonium quaternaire. Notre choix s'est porté sur le sel no 6, qui est le seul à avoir arboré une activité antiseptique vis-à-vis de Pseudomonas aeruginosa après fixation. De surcroît, le coût de fabrication de ce sel est le plus faible des quatre. La charge en ammonium quaternaire du biotextile a été fixée à 15 g/kg de coton. De la sorte, le prix de revient du traitement ne dépasse pas celui d'une teinture.

II. ACTIVITE ANTISEPTIQUE DES CELLULOSES FONCTIONNALISEES PAR UN SEL DE SYNTHESE INDUSTRIELLE

Les résultats rapportés dans ce chapitre ont trait à l'activité antiseptique de tissus de coton dont la gènèse est décrite dans la partie confidentielle. Plusieurs préparations du sel no 6 ont servi à traiter le coton. Nous avons nommé 6₁, le sel qui a été préparé au laboratoire de Chimie Organique III de Nancy par M. JOLY et qui a servi jusqu'à présent. Les celluloses fonctionnalisées par le sel 6₁ ont la même origine. Les sels 6₂ et 6₃ sont des produits de synthèse à l'échelon industriel, fabriqués par ICMD (Industrie Chimique Mulhouse Dornach). Les celluloses, qui ont été fonctionnalisées par le sel 6₂, proviennent de la Filature de la Gosse. La fonctionnalisation par le sel 6₃ a été réalisée grâce à un petit appareil pilote sur des draps de coton, qui ont été fournis par l'usine DESCAMPS d'Erquinghem. Ce traitement (stade pilote, sel 6₃) a été réalisé au Centre de Recherche Textile de Mulhouse.

1) Spectre d'activité antimicrobienne des biotextiles

Nous avons effectué un spectre d'activité antimicrobienne de celluloses traitées avec les différentes préparations de sel no 6. Les textiles traités avec les sels 6₁ et 6₂ sont des tricots (jersey). Le sel 6₃ a servi au traitement de draps de coton. La totalité des souches bactériennes du tableau -X- et des souches fongiques du tableau -XI- ont servi à cette occasion.

1.1) Activité bactériostatique

Les bactéries à Gram positif sont les souches les plus sensibles aux biotextiles (tableau -XXXIV-). Il s'agit là d'une des caractéristiques de l'activité antiseptique des ammoniums quaternaires (PETROCCI 1977). La bactérie Listeria monocytogenes est, entre-autre, particulièrement sensible. Un inoculum de 10⁷ u.f.c./cm² est inhibé en moins de 6 heures de contact. Il est peu probable que les formes sporulées des Bacillus sp. soient détruites. Le biotextile doit agir au moment de leur germination. Les trois préparations de sel no 6 se sont avérées efficaces.

Souches bactériennes	lots de sel no 6		
	6 ₁	6 ₂	6 ₃
<u>Staphylococcus aureus</u> CIP 7625	+++	+++	+++
<u>Streptococcus faecalis</u> CIP 5855	+++	+ +	+++
<u>Listeria monocytogenes</u> CHR	+++	+++	+++
<u>Bacillus polymyxa</u> CHR	+++	+++	+++
<u>Bacillus subtilis</u> CHR	+ +	+ +	+ +
<u>Corynebact. pseudodiphtheriae</u> CHR	+++	+++	+++

Tableau -XXXIV- : Activité antiseptique de celluloses traitées à 15 g/kg de coton par différentes préparations de sels no 6, vis-à-vis de plusieurs souches de bactéries à Gram positif (inoculum de 10^4 u.f.c./cm² de tissu)

CIP : Collection de l'Institut Pasteur

CHR : Souche du Centre Hospitalier Régional de Lille

Les Enterobacteriaceae sont globalement plus résistantes que les bactéries à Gram positif (tableau -XXXV-). L'activité antiseptique des tissus reste néanmoins intéressante. Parmi les 13 souches étudiées, Providencia stuartii a présenté une résistance importante aux biotextiles. Cette bactérie est par ailleurs bien connue pour ses multiples résistances aux antibiotiques. Les bactéries les plus sensibles sont les Salmonella sp. et Escherichia coli. L'activité antiseptique des échantillons de tissus traités avec la préparation industrielle 6₂ est faible (six souches y sont résistantes). La préparation industrielle 6₃ donne des résultats satisfaisants.

Les Pseudomonadaceae en général et Pseudomonas aeruginosa en particulier, sont intéressantes à étudier car nombre d'entre elles présentent des résistances importantes aux ammoniums quaternaires (tableau -XXXVI-). De fait, c'est avec cette catégorie de bactéries, que nous avons enregistré les activités antiseptiques les plus faibles. Sur les 13 souches étudiées, nous avons trouvé 4 souches sensibles, 4 souches résistantes et 5 souches intermédiaires avec le sel 6₁. Le sel 6₂ est moins efficace : 3 souches sensibles, 1 intermédiaire et 9 résistantes. Avec le sel 6₃, nous avons obtenu une activité moyenne avec 4 souches sensibles, 3 intermédiaires et 6 résistantes. Pseudomonas maltophilia est la bactérie la plus sensible. Nous avons pu remarquer l'existence de deux souches de Pseudomonas aeruginosa très sensibles au biotextile (souches CIP 73344 et CIP 73351). Leur sensibilité est extrême puisque des inoculum de 10⁶ u.f.c/cm² de tissu, sont inhibées en 6 heures. Nous verrons par la suite que cette particularité est due à une déficience en lipopolysaccharides pariétaux. Pseudomonas maltophilia possède une sensibilité analogue au biotextile.

En résumé les différents niveaux de sensibilité observés, sont caractéristiques des ammoniums quaternaires. Ces observations laissent présager que les ammoniums quaternaires fixés agissent selon un mode d'action similaire aux ammoniums quaternaires libres. Le procédé de fabrication aboutissant à la préparation 6₂ a été abandonné au profit du sel 6₃. Les différences observées entre les différents lots de sel no 6, nous ont amené à entreprendre une étude plus systématique (voir partie confidentielle).

Souches bactériennes	lots de sel no 6		
	6 ₁	6 ₂	6 ₃
<u>Escherichia coli</u> CIP 7624	+++	+++	+++
<u>Citrobacter freundii</u> CHR	+++	+++	+++
<u>Levinea malonatica</u> CHR	+ +	-	+
<u>Klebsiella pneumoniae</u> CHR	+++	-	+ +
<u>Serratia marcescens</u> CHR	+ +	-	+ +
<u>Shigella sonnei</u> CHR	+++	+	+++
<u>Salmonella paratyphi A</u> CHR	+++	+++	+++
<u>Salmonella paratyphi B</u> CHR	+++	+++	+++
<u>Salmonella typhimurium</u> CHR	+ +	-	+
<u>Salmonella arizonae</u> CHR	+++	+++	+++
<u>Proteus vulgaris</u> CHR	+ +	+	+ +
<u>Proteus mirabilis</u> CHR	+++	+ +	+++
<u>Providencia stuartii</u> CHR	-	-	-

Tableau -XXXV- : Activité antiseptique de celluloses traitées à 15 g/kg de coton par différentes préparations de sels no 6, vis-à-vis de plusieurs souches de bactéries à Gram négatif de la famille des Enterobacteriaceae (inoculum de 10³ u.f.c./cm² de tissu)

CIP : Collection de l'Institut Pasteur

CHR : Souche du Centre Hospitalier Régional de Lille

Souches bactériennes	lots de sel no 6		
	6 ₁	6 ₂	6 ₃
<u>Pseudomonas aeruginosa</u> CIP 73444	+++	+++	+++
<u>Pseudomonas aeruginosa</u> CIP 73351	+++	+++	+++
<u>Pseudomonas aeruginosa</u> CIP 73388	+	-	-
<u>Pseudomonas aeruginosa</u> CIP 73426	-	-	-
<u>Pseudomonas aeruginosa</u> CIP 73433	-	-	-
<u>Pseudomonas aeruginosa</u> CHR 461 M	-	-	-
<u>Pseudomonas aeruginosa</u> CHR 583 M	+	-	-
<u>Pseudomonas aeruginosa</u> CHR 693 M	+	-	+
<u>Pseudomonas aeruginosa</u> CHR 792	+	-	+
<u>Pseudomonas aeruginosa</u> CIP 76110	-	-	-
<u>Pseudomonas alcaligenes</u> CHR	+	-	+
<u>Pseudomonas maltophilia</u> CHR	+++	+++	+++
<u>Alcaligenes liquefaciens</u> CHR	+++	+	+++

Tableau -XXXVI- : Activité antiseptique de celluloses traitées à 15 g/kg de coton par différentes préparations de sels no 6, vis-à-vis de plusieurs souches de bactéries à Gram négatif de la famille des Pseudomonadaceae (inoculum de 10³ u.f.c./cm² de tissu)

CIP : Collection de l'Institut Pasteur

CHR : Souche du Centre Hospitalier Régional de Lille

1.2) Activité antifongique

Nous avons rassemblé, dans le tableau -XXXVII-, l'activité antiseptique des textiles greffés par les diverses préparations de sel no 6, vis-à-vis de la levure pathogène Candida albicans. Les tests ont été effectués avec la méthode AATCC. Le niveau d'activité est de l'ordre de 10^2 u.f.c. inhibées par cm^2 en 6 heures. Nous savons par d'autres essais, que les sels no 36 et 37 ont une activité similaire au sel no 6, tandis que le sel no 8 est un peu moins actif. On remarquera qu'à partir de 10^4 u.f.c./ cm^2 , les textiles sont complètement saturés. Nous attribuons ce phénomène à la taille plus importante des cellules de levures par rapport aux bactéries. Pour détruire une cellule de levure, les contact avec le tissu doivent être plus nombreux.

La norme NF X 41-600 (AFNOR 1971a) n'est pas une évaluation directe de l'activité antifongique des textiles. On mesure par cette méthode, soit une activité antifongique directe qui détruit la flore inoculée, soit une résistance du tissu aux enzymes cellulolytiques. Toutefois, si l'activité est directe, on ne devrait observer l'installation d'un mycélium à la surface des tissus. Les essais ont été menés avec des échantillons de draps de coton écrus, traités par le sel 6₃ à 15 g/kg de coton (tableaux -XXXVIII- et -XXXIX-).

=====			
inoculum	lots de sel no 6		
	6 ₁	6 ₂	6 ₃
=====			
10^2 u.f.c./ cm^2	+++	+++	+++
10^3 "	+++	++	+++
10^4 "	-	-	-
=====			

Tableau -XXXVII- : Activité antiseptique de celluloses traitées à 15 g/kg de coton par différentes préparations de sels no 6, vis-à-vis de Candida albicans

Souches fongiques	tissu traité		témoin	
	Dev	R1 (%)	Dev	R1 (%)
<u>Aspergillus flavus</u>	0	99,5	4	22,8
<u>Aspergillus niger</u>	3	95,0	4	61,9
<u>Aspergillus versicolor</u>	1	93,1	3	0
<u>Paecylomyces varioti</u>	1	96,6	4	3,5
<u>Trichoderma harzianum</u>	0	100,0	4	48,7
<u>Trichoderma viride</u>	1	98,4	4	7,6
<u>Scopulariopsis brevicaulis</u>	1	97,8	4	43,1
<u>Cladosporium herbarum</u> *	0	99,4	1	72,5
<u>Penicillium species</u> *	0	93,3	2	63,4

Tableau -XXXVIII- : Résistance de tissus traités et non traités à quelques champignons cellulolytiques (charge : sel 6₃ à 15 g/kg de coton)

Dev : Développement mycélien (noté de 0 à 4)

R1 : % de résistance aux microorganismes (norme NF X 41-600)

* : L'agent mouillant est le SDS au lieu du triton X-100

Le tissu traité possède une résistance à la traction de 21,4 kg (mesures effectuées sur des bandes de tissu de 150 x 20 mm). Le tissu non traité a une résistance moyenne de 19,3 kg. Il a servi de témoin pour vérifier l'agressivité des souches fongiques sur un tissu de coton. Rappelons que plus le facteur R1 de résistance aux microorganismes est faible, plus le tissu est attaqué. Un facteur R1 de valeur nulle définit les tissus qui n'ont pu être extraits des fioles de Roux sans les déchirer.

Dans le tableau -XXXVIII-, nous avons indiqué les valeurs de R1 trouvées avec 9 souches connues pour leur activité cellulolytique importante. Dans l'ensemble, le tissu traité s'est très bien comporté. La plus grande perte de résistance à la traction n'a été, en effet, que de 7 % avec Aspergillus versicolor, qui a été la souche la plus agressive sur le tissu témoin. Certaines souches comme Aspergillus niger, Cladosporium herbarum ou Penicillium species qui sont capables d'attaquer le papier, se sont révélées faiblement actives sur les fibres cellulosiques du coton (facteur R1 du tissu témoin supérieur à 50 %). Il ne s'est pratiquement jamais développé de réseau mycélien important sauf dans le cas d' Aspergillus niger. Celui-ci a totalement recouvert les bandes de tissus sans en attaquer les fibres (R1 = 95 %).

=====					
Agent mouillant	tissu traité			témoin	
	Dev	R1 (%)	Dev	R1 (%)	
=====					
Triton X-100	0	98,4	4	0	
S.D.S.	0	88,2	4	0	
=====					

Tableau -XXXIX- : Résistance de tissus traités et non traités à l'attaque simultanée de 10 souches fongiques (charge : sel 6₃ de 15 g/kg de coton)

Dev : Développement mycélien (noté de 0 à 4)

R1 : % de résistance aux microorganismes (norme NF X 41-600)

Dans le tableau -XXXIX- sont indiqués les facteurs R1 trouvés à la suite de l'exposition des tissus pendant trois semaines à l'attaque conjuguée de 10 souches cellulolytiques recommandées par l'AFNOR (voir tableau -XI-). La résistance du biotextile a été importante en présence d'une activité cellulolytique intense (R1 = 0 % sur tissu témoin). Les pertes de résistance à la traction ont été de 1,6 et 11,8 %. La perte la plus importante a été enregistrée en présence de SDS, qui est un inhibiteur notoire des ammoniums quaternaires. A l'occasion de cette expérimentation, nous avons pu constater l'absence totale de relargage des produits de fonctionnalisation. sur la photographie -1-, on peut voir que le mycélium s'est développé sur le papier filtre, sans envahir les fibres du biotextile. Il n'y a pas de halo d'inhibition. La photographie -2- représente le tissu témoin totalement recouvert de mycélium. Cet échantillon a perdu toute résistance à la traction.

En conclusion, nous avons pu montrer in vitro que les celluloses fonctionnalisées par le sel 6₃ possèdent une bonne activité antifongique. Cette activité est fongicide vis-à-vis de Candida albicans. L'activité contre les champignons cellulolytique est probablement due à la fois à un pouvoir antifongique direct et à une résistance aux cellulases. Le greffage de radicaux atypiques, comme les ammoniums quaternaires, peut rendre le tissu réfractaire aux enzymes qui dégradent habituellement la cellulose. Cette série d'expériences a apporté, enfin, la confirmation de l'efficacité du traitement qui interdit tout relargage d'ammoniums quaternaires.

2) **Activité antiseptique dans des conditions particulières**

2.1) Activité antiseptique de bourres de coton traitées

Nous avons étudié le pouvoir bactéricide de bourres de coton traitées avec le sel no 6₃. Deux types de bourres ont servis : la bluth (coton cardé écru) et le coton de Californie (coton cardé, débouilli et blanchi). Le coton de Californie est beaucoup plus hydrophile que la bluth. Ces essais ont été entrepris dans l'optique d'un traitement éventuel, par notre procédé, de bourres de coton à usage chirurgical.



PHOTO -1-

Tissu traité
sel 6% à
15 g/kg de
coton

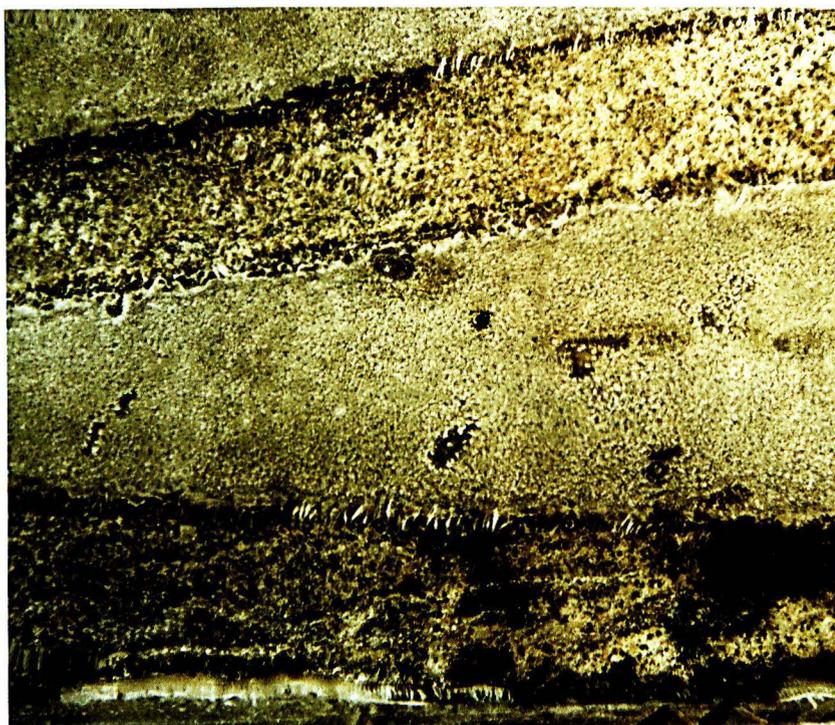


PHOTO -2-

Tissu témoin

ECHANTILLONS DE TISSUS APRES TROIS SEMAINES D'EXPOSITION
A DES CHAMPIGNONS CELLULOLYTIQUES
(NORME NF X 41-600)

Il arrive, en effet, que des infections secondaires surviennent dans le cas de fractures ouvertes, après que le patient ait été plâtré. Les médecins sont alors obligés de casser le plâtre et d'intervenir une seconde fois pour désinfecter. L'emploi d'une bourre de coton "autostérile" peut donc être fort intéressante. Nous avons testé les cotons traités avec trois souches bactériennes, comme on peut le voir sur le tableau -XL-).

La meilleure activité antiseptique a été obtenue avec le coton de Californie. Pour convertir les u.f.c./cm² de tissu en u.f.c./g de coton, il faut multiplier par 70 les mesures en cm². Si l'on compare l'activité antiseptique des bourres de coton de Californie traitées avec celle des biotextiles, on s'aperçoit que les premières ont une activité antiseptique analogue à celle des seconds. Vis-à-vis de Pseudomonas aeruginosa, les bourres de coton de Californie traitées sont même plus actives (10⁴ u.f.c./g inhibées en 24 heures contre 10³ u.f.c./g).

Souches bactériennes	coton	
	ufc/g	bluth cal
<u>Staphylococcus aureus</u> CIP 7625	10 ⁵	+++ +++
	10 ⁶	+++ +++
	10 ⁷	± +++
<u>Escherichia coli</u> CIP 7624	10 ⁴	+++ +++
	10 ⁵	+ + +++
	10 ⁶	± +
<u>Pseudomonas aeruginosa</u> CIP 76110	10 ³	± +++
	10 ⁴	- +
	10 ⁵	- -

Tableau -XL- : Activité antiseptique de bourres de coton traitées au sel 6₃ (charge non déterminée).

Cal : Coton de Californie

La bluth traitée est beaucoup moins active. La cellulose du coton de Californie est, en effet, plus accessible parce que les fibres ont été en grande partie dégraissées et débarrassées de leur cuticule. La quantité d'ammoniums quaternaires fixés, qui n'a malheureusement pas pu être déterminée, devait être plus importante. Par ailleurs, l'hydrophilite du coton de Californie est favorable au contact bactérie-fibre.

2.2) La filtration d'aérosol

Ces essais ont été entrepris pour savoir si le procédé de fonctionnalisation permet la confection de filtres qui seraient employés à l'assainissement de grands volumes d'air. Les filtres absolus qui agissent mécaniquement n'autorisent pas, en effet, des débits élevés.

Nous nous sommes servis, dans un premier temps, de tissus traités avec la préparation 6₃ à raison de 5 et 15 g/kg de coton. Les tissus ont été exposés à un flux d'air chargé d'un aérosol artificiel de bactéries, pendant 30 minutes. Nous avons dénombré la quantité de germes survivants, au niveau des tissus, et le nombre de cellules qui sont passées à travers sans subir de dommages. Ces dernières cellules sont récupérées par un système de barbotage. Les résultats sont présentés dans le tableau -XLI-. Les tissus n'ont pas retenu la totalité des cellules bactériennes : leur texture trop lâche, ne se prête pas à la filtration. Le tissu greffé à 5 g/kg de coton a toutefois réduit notablement la proportion de germes retrouvés à sa surface et dans le liquide de barbotage. Le tissu à 15 g/kg de coton s'est révélé bien moins actif.

L'étude a été poursuivie en utilisant des celluloses plus aptes à la filtration de l'air. C'est ainsi que les porte-filtres de l'expérience précédente ont été remplacés par un cylindre en verre que nous avons rempli avec de la bourre de coton.

Les essais ont été menés avec les bourres de coton (bluth et coton de Californie) décrites dans le paragraphe précédent. Comme témoin nous avons employé le coton brut usuellement utilisé en microbiologie pour réaliser les filtres et bouchons nécessaires au maintien de l'aseptie des milieux de culture et pour éviter les contaminations externes. Ce coton est proche de la bluth.

textiles	Nt	Nb
témoin	$1,3 \cdot 10^7$	$1,4 \cdot 10^7$
sel G_3 à 5 g/kg	$2,6 \cdot 10^4$	$4,6 \cdot 10^4$
sel G_3 à 15 g/kg	$4,0 \cdot 10^6$	$9,0 \cdot 10^6$

Tableau -XLI- : Filtration d'un aérosol de bactéries
(Escherichia coli 7624) par des tissus
traités et non traités.
(nombre de bactéries pulvérisées : $4,0 \cdot 10^8$ u.f.c.)

Nt : u.f.c. récupérées sur les tissus.

Nb : u.f.c. récupérées dans le liquide de barbotage.

bourres de coton	Nc	Nb
Coton brut (témoin)	$1,4 \cdot 10^4$	0
Bluth traitée	$3,0 \cdot 10^2$	$4,0 \cdot 10^5$
Coton de Californie traité	$4,0 \cdot 10^5$	$5,0 \cdot 10^6$

Tableau -XLII- : Filtration d'un aérosol de bactéries
(Escherichia coli 7624) par des bourres de coton
traitées (sel G_3) et non traitées.
(Nombre de bactéries pulvérisées : $2,2 \cdot 10^9$ u.f.c.)

Nc : u.f.c. récupérées sur les bourres de coton.

Nb : u.f.c. récupérées dans le liquide de barbotage.

Les résultats (tableau -XLII-) montrent que si le coton brut a bien rempli son office, les bourres traitées ont permis le passage d'un nombre important de bactéries. Ces résultats sont dus à la trop grande hydrophilité des bourres traitées. Celles-ci se sont rapidement gorgées d'eau, y compris la bluth rendue hydrophile par le traitement. Par son caractère plus hydrofuge, le coton brut arrête en effet les aérosols. Lorsque le coton est trop humide, il devient lui-même une source d'aérosol et ne peut plus empêcher le passage des bactéries. On remarquera que des deux bourres traitées, la plus hydrophobe (bluth) est celle où nous avons retrouvé le moins de bactéries. Cette situation est donc l'inverse de ce que nous avons rencontré auparavant (tableau -XL-). Dans un cas le caractère hydrophile favorise l'action bactéricide, dans l'autre cas les ammoniums quaternaires ne peuvent pas agir car les bactéries ne sont pas retenues suffisamment longtemps.

En conclusion, la filtration stérilisante de l'air avec des celluloses fonctionnalisées par des ammoniums quaternaires, est limitée. La raison essentielle est que leur pouvoir antiseptique ne s'exerce pas suffisamment rapidement. Cependant, la faible quantité de germes vivants retrouvés au niveau des filtres, nous a donné l'idée de concevoir des filtres "autostériles".

2.3) Les filtres "autostériles"

Nous avons traité avec le sel 6₃ des filtres antibactériens absolus, qui agissent mécaniquement grâce à leur faible porosité (diamètre des pores de 0,45 μm). Les cellules bactériennes ne peuvent les traverser en raison de leur taille (1-5 μm). Notre objectif est d'obtenir un filtre pouvant détruire la flore piégée, de sorte qu'il ne devienne pas une source de contamination. Le risque de contamination peut intervenir au moment du remplacement des filtres ou, dans les systèmes de filtration discontinue, lorsque l'aération est remise en marche. Nous avons choisi pour ces essais, des membranes de cellulose pure (Sartorius de 0,45 μm de porosité), qui ont été traitées par le sel 6₃ (15 g/kg de coton). Le traitement n'a pas altéré leur pouvoir filtrant. Ces filtres devant fonctionner dans une ambiance à 75 % d'humidité relative, le système d'aérosol, trop humide, a été abandonné au profit d'un autre système, qui reproduit plus fidèlement les conditions réelles d'emploi.

L'efficacité des filtres a ainsi été étudiée à l'aide d'un appareil permettant de fluidiser des poudres deshydratées sur lesquelles sont fixées des bactéries. L'air chargé de ces poussières a été filtré par ces membranes, qui ont été maintenues dans une enceinte où l'air était à 75 % d'humidité relative. Le dénombrement des germes survivants a été effectué après 0, 6 et 24 heures de contact (tableau -XLIII-). La bactérie utilisée est un Bacillus species isolé à partir de l'air ambiant du laboratoire. Les cellules ont été deshydratées par atomisation, en utilisant du lait écrémé reconstitué comme support.

Ces expériences ont permis de mettre en évidence une activité antiseptique des ammoniums quaternaires à 75 % d'humidité relative. Cette propriété permet d'envisager l'utilisation des ammoniums quaternaires fixés en atmosphère ambiante. L'activité antiseptique semble toutefois assez faible. Il conviendrait de faire des essais en vraie grandeur pour avoir une certitude. Nous avons, par ailleurs, entrepris l'étude de l'influence de l'humidité relative de l'air sur le pouvoir antiseptique des biotextiles. Les résultats sont présentés page 180.

filtres	N ₀	N ₆	N ₂₄
témoin	1,5.10 ²	76	70
sel 6 à 15 g/kg	1,4.10 ²	12	2

Tableau -XLIII- : Activité antiseptique de filtres de cellulose pure fonctionnalisée par le sel 6₃, vis-à-vis de cellules de Bacillus species desséchées par atomisation

N₀, N₆ et N₂₄ : u.f.c/cm² après 0, 6 et 24 heures de contact à 75 % d'humidité relative.

2.4) La filtration de solutions de gélatine

L'expérimentation que nous avons entreprise avec la gélatine répond à un besoin très spécifique. La réglementation interdit en effet toute adjonction d'additifs (conservateurs ou autres) à la gélatine alimentaire. Cette gélatine doit en outre présenter des conditions sanitaires strictes (AFNOR 1982). Si la contamination par des germes pathogènes est très rare, il arrive que des Bacillus thermophiles se développent en altérant la qualité des gélatines. La filtration des bains de gélatine par nos tissus, susceptibles de les désinfecter sans relargage d'antiseptique, a ainsi été tentée.

Nous avons utilisé le tissu greffé à raison de 15 g/kg de coton (sel 6₃). Une solution de gélatine à 10 %, particulièrement contaminée (10⁸ u.f.c./g), a été filtrée en continu. L'opération s'est déroulée à 50°C ; 150 ml de la solution de gélatine a été filtrée sur environ 100 cm² de tissu.

Les résultats obtenus sont satisfaisants (tableau -XLIV-) puisque la gélatine est totalement débarrassée des bactéries après 24 heures de filtration. Cette stérilité se maintient par la suite. Nous n'avons détecté aucune trace d'ammonium quaternaire dans la solution, à l'issue de la filtration.

tissu	N ₀	N ₆	N ₂₄	N ₇₂
témoin	10 ⁸	10 ⁸	10 ⁸	10 ⁸
biotextile	"	10 ²	0	0

Tableau -XLIV- : Filtration de gélatine sur celluloses fonctionnalisées au sel 6₃ : évolution de la population de Bacillus thermophiles à 50°C.

N₀, N₆, N₂₄ et N₇₂ : u.f.c./ml après 0, 6, 24 et 72 heures de filtration.

3) Conclusions

Les celluloses fonctionnalisées par un sel de synthèse industrielle (6₃) présentent une activité antiseptique importante. Nous n'avons cependant jamais retrouvé avec le sel 6₃, un pouvoir antimicrobien similaire à celui des celluloses traitées avec le sel 6₁, confectionné en laboratoire.

Les tissus traités avec le sel 6₃ conservent leur pouvoir antiseptique après 30 lavages à 95°C par une lessive classique du commerce (voir partie confidentielle). L'activité de ce biotextile, tant sur les bactéries à Gram positif que sur les Enterobacteriaceae et les champignons, ouvre des possibilités considérables dans le domaine de l'hygiène corporelle. Les risques de contamination, par le biais de linges souillés, sont ainsi fortement diminués. En outre la biodégradabilité du coton par les agents cellulolytiques est faible. Nous avons vu que le biotextile peut servir à des applications plus inattendues de filtration. Les textiles peuvent permettre, en outre, l'assainissement de liquides divers sans adjonction de désinfectant, puisque les ammoniums quaternaires ne sont pas relargués dans le milieu externe.

L'hydrophilie du coton, qui traduit l'accessibilité de la cellulose au traitement, est importante pour obtenir une fonctionnalisation efficace. Le spectre d'activité antimicrobienne des ammoniums quaternaires fixés, semble indiquer que leur mode d'action n'a pas été fondamentalement modifié. Les germes les plus sensibles au tissu sont les bactéries à Gram positif, tandis que les plus résistants appartiennent aux Pseudomonadaceae. Enfin, les celluloses traitées sont capables d'agir à des taux d'humidité relative de l'ordre de 75 % et en présence de gélatine.

III. ETUDE DU MODE D'ACTION DU BIOTEXTILE

D'un point de vue fondamental, l'étude de l'activité antiseptique des celluloses fonctionnalisées par des ammoniums quaternaires, présente un intérêt considérable car elle est le fait de molécules insolubles et immobiles. Nous savons que les ammoniums quaternaires interagissent avec les systèmes membranaires des cellules. Il est donc essentiel d'étudier le mode d'action des biotextiles en commençant par cette approche.

Nous avons ainsi voulu, dans un premier temps, obtenir un faisceau de preuves concordantes qui met en évidence l'interaction importante des biotextiles avec les membranes bactériennes. Dans la mesure du possible, nous avons effectué des comparaisons entre l'activité antimicrobienne des ammoniums quaternaires solubles et celle des composés insolubilisés.

Dans un second temps, l'étude de différents paramètres physico-chimiques, susceptibles de modifier l'action antiseptique des ammoniums quaternaires, a été entreprise. Cette étude possède, à la fois, un intérêt fondamental et pratique. Fondamental car certaines études, comme l'influence de la température ou des ions accompagnateurs, ont révélé certains aspects du mode d'action. Pratique parce que nous avons pu définir certaines conditions extrêmes d'utilisation du biotextile comme, par exemple, en présence de substances interférentes. Nous avons également essayé d'établir, lors de ces essais, une comparaison entre ammoniums quaternaires solubles et insolubles.

La finalité ultime de l'étude du mode d'action du biotextile est de mieux comprendre les mécanismes du pouvoir antiseptique. Il serait ainsi possible de modifier le biotextile pour qu'il soit plus actif ou que son activité soit plus complète. Nous pourrions alors concevoir de nouvelles molécules, plus efficaces ou plus stables. La totalité des expériences a été menée avec un tissu greffé à raison de 15 g/kg de coton (sel 6₃).

1) Modifications de la perméabilité membranaire

Les travaux de SALTON (1951a), NEWTON (1958), HUGO (1965), LAMBERT (1973) et KUCZERA (1985) ont montré que la première manifestation du pouvoir bactéricide des ammoniums quaternaires, est la perte du caractère semi-perméable des membranes plasmiques. Nous avons voulu déceler un phénomène analogue, de manière directe (perte de constituants cellulaires) et indirecte (modification d'une activité enzymatique).

1.1) Relargage de phosphore inorganique

Nous avons choisi de suivre le relargage du phosphore inorganique (Pi), dont le dosage est facile à réaliser en présence de matières organiques (STANTON 1968). Des cellules d' Escherichia coli ont été mises en contact en milieu liquide avec du sel 6 (100 µg/ml), du tissu traité (0,5 cm²/ml), ou du tissu non traité (témoin : 0,5 cm²/ml). La cinétique de relargage a été suivie pendant 3 heures (figure -19-).

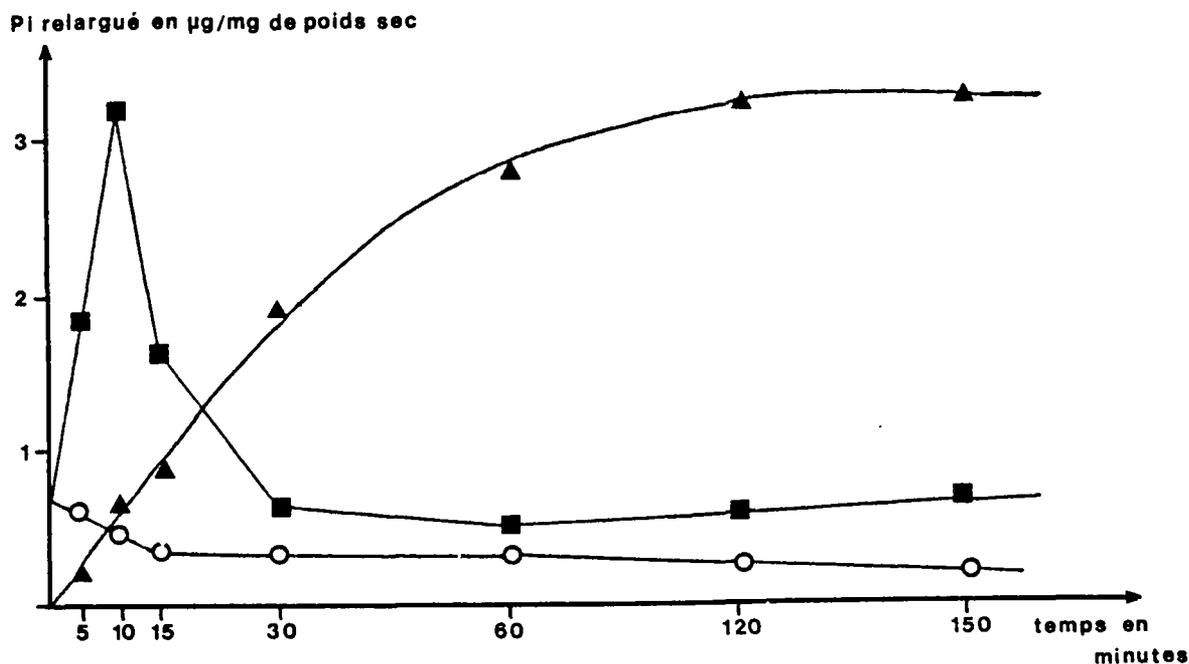


Figure -19- : Relargage de phosphore inorganique en présence de sel 6 (▲), de tissu traité (sel 6) à 15 g/kg (■), et de tissu non traité (O), par Escherichia coli CIP 7624 à 37°C (10¹⁰ u.f.c./ml)

1 cm² de tissu pèse environ 14 mg. Il y a environ 200 µg de sel 6 greffé par cm² de tissu, lorsque la charge est de 15 g/kg de coton. La concentration en ammonium quaternaire fixé a donc été identique à la concentration en ammonium quaternaire soluble (100 µg/ml). Etant donné la quantité importante de cellules en présence (10¹⁰ u.f.c./ml), il s'agit là d'une concentration sous-inhibitrice.

Nous avons pu constater deux comportements différents. Un pic de phosphore inorganique relargué a été détecté quelques minutes après le contact avec le biotextile. Par la suite, la concentration externe en phosphore inorganique demeure très faible et peu différente de celle observée avec le tissu témoin. En présence d'ammonium quaternaire libre, le relargage est progressif. Un taux important de phosphore inorganique se maintient dans le milieu extérieur par la suite. Cette dernière observation est conforme aux travaux de SALTON (1951a) et LAMBERT (1973, figure -7-, p. 38), en ce qui concerne le relargage de la plupart des constituants cytoplasmiques de faible poids moléculaire.

La cinétique de relargage, observée avec le biotextile, indique une réabsorption rapide du phosphore inorganique, soit par les bactéries survivantes, soit par le biotextile lui-même (interaction électrostatique) et probablement par les deux à la fois. Lorsque les ammoniums quaternaires sont solubles, ils s'intègrent, en partie, aux membranes cytoplasmiques qu'ils distendent, selon le modèle d'ISOMAA (1984, figure -8-, p. 41). Il s'agit d'un modèle dynamique d'échanges constants, qui entraînent l'augmentation du taux de phosphore inorganique externe par l'établissement d'un nouvel équilibre. Les cellules ne sont pas lysées. Dans le cas du biotextile, le phénomène intéressant est la relative soudaineté du relargage, qui semble dû à une lyse brutale des cellules bactériennes au contact avec les ammoniums quaternaires fixés. En raison de la quantité importante de cellules, les sites actifs du tissu sont saturés et inactivés rapidement ; il n'y a plus ensuite de relargage possible.

Le biotextile semble agir plus rapidement que nous le pensions. Pourtant, il faut près de 6 heures à 200 µg de sel 6 fixé pour inhiber 10⁴ u.f.c. d' Escherichia coli (tissu à 15 g/kg). Nous avons pu montrer, par ailleurs, qu'une quantité similaire de sel 6 soluble y arrive en 30 minutes.

1.2) Modification de l'activité β -galactosidasique

La β -galactosidase est une enzyme cytoplasmique dont l'activité dépend d'une perméase. Le transport de ses substrats (galactosides comme le lactose) est actif. Sans la perméase, ils ne peuvent traverser les membranes cellulaires. Si la perméabilité des membranes est simplement augmentée en présence des ammoniums quaternaires fixés, le substrat peut entrer passivement à l'intérieur des cellules. L'activité enzymatique est donc augmentée. Il en est de même en cas de lyse des bactéries ; les enzymes libérées disposent de tout le substrat présent à l'extérieur des cellules. Dans cette dernière hypothèse, cependant, une certaine activité β -galactosidasique doit être trouvée dans le milieu externe. C'est ce que nous avons voulu faire.

Une suspension de cellules bactériennes (Escherichia coli CIP 7624) a été mise en présence de tissu traité et non traité (1 cm²/ml), ou en présence de sel 6 soluble. L'activité β -galactosidasique est mesurée en nanomoles de PNP libéré par heure et par millilitre (tableau -XLV-). Pour la mesure de l'activité enzymatique du milieu externe, les cellules bactériennes sont éliminées par filtration sur des membranes de 0,22 μ m de porosité.

Essais	act. enzymatique	
	nmole.h ⁻¹ .ml ⁻¹	
	cellules	filtrat
suspension bactérienne	143,0	0,2
+ tissu témoin (1 cm ² /ml)	138,0	1,6
+ tissu traité (1 cm ² /ml)	182,0	1,5
+ sel no 6 (15 μ g/ml)	311,0	54,3

Tableau -XLV- : Activité β -galactosidasique en présence de sel 6, de tissu traité (sel 6) à 15 g/kg ou de tissu témoin, de cellules d' Escherichia coli CIP 7624 (10⁸ u.f.c./ml).

L'activité β -galactosidasique est exaltée en présence d'ammoniums quaternaires solubles et insolubles. Avec le sel 6 soluble, cette activité est même doublée. Avec le biotextile, l'augmentation de l'activité enzymatique est plus faible et atteint 32 %, bien qu'il y ait théoriquement "200 μ g de sel 6 par ml". Il y a donc bien interaction entre les membranes et les ammoniums quaternaires fixés. Les cellules ne semblent pas lyser au contact avec le biotextile, car on ne détecte pas d'activité enzymatique dans le milieu extérieur. L'adjonction d'ammoniums quaternaires solubles a, par contre, entraîné la lyse d'une partie des cellules, puisque nous avons retrouvé 1/6ème de l'activité enzymatique dans le milieu externe.

Le contact entre les cellules bactériennes et les fibres traitées du biotextile, semble provoquer des lésions au niveau des membranes. Ces lésions ne sont toutefois pas suffisamment importantes pour entraîner la lyse des cellules.

2) Importance de la paroi dans la résistance au biotextile

Chez les bactéries, la première enveloppe cellulaire qui entre en contact avec le biotextile est la paroi. Elle représente l'obstacle le plus important à la pénétration des agents antiseptiques (EAGON 1984). Le rôle de barrière osmotique est joué par la membrane plasmique sous-jacente à la paroi. Pour que les ammoniums quaternaires fixés provoquent des modifications de la perméabilité membranaire, ils doivent d'abord interagir avec les systèmes pariétaux des bactéries. Nous avons voulu savoir dans quelles mesures la paroi conditionne la résistance des bactéries aux ammoniums quaternaires fixés.

2.1) Influence des ions Calcium et magnésium

Les ions bivalents Ca^{++} et Mg^{++} sont des facteurs importants de la cohésion de la paroi bactérienne. L'adjonction de ces ions dans le milieu extérieur ou inversement leur complexation par un chélateur (Ethylène-DiamineTétraAcétate ou EDTA) entraîne une résistance ou une sensibilité accrue des bactéries à Gram négatif vis-à-vis des ammoniums quaternaires (BROWN 1965). Nous avons donc mis des cellules bactériennes en présence du biotextile et de concentrations croissantes en ions Ca^{++} ou Mg^{++} , en EDTA et en complexes EDTA:Mg ou EDTA:Ca (tableau -XLVI-).

mM	Ca ⁺⁺	Mg ⁺⁺	EDTA	EDTA -Ca	EDTA -Mg
<u>Staphylococcus aureus</u> CIP 7625					
0	+++	+++	+++	+++	+++
5	+++	+++	+++	+++	+++
10	+++	+ +	+++	+++	+++
20	+ +	+ +	+++	+++	+++
50	+ +	+ +	+++	+++	+++
<u>Escherichia coli</u> CIP 7624					
0	+ +	+ +	+ +	+ +	+ +
5	+ +	+ +	+++	+ +	+ +
10	+ +	+ +	+++	+ +	+ +
20	<u>+</u>	+ +	+++	+ +	<u>+</u>
50	<u>+</u>	<u>+</u>	+++	+++	+ +

Tableau -XLVI- : Influence des ions Ca⁺⁺ et Mg⁺⁺ sur la résistance d' Escherichia coli (10⁴ u.f.c./cm²) et de Staphylococcus aureus (10⁵ u.f.c./cm²) au tissu traité (sel no 6₃, 15 g/kg de coton)

Ca⁺⁺ et Mg⁺⁺ apportés respectivement par CaCl₂ et MgCl₂.

Nous avons choisi une bactérie à Gram négatif, qui doit être sensible à l'apport d'ions bivalents et une bactérie à Gram positif, qui ne doit pas réagir à cet apport. Les bactéries ont été mises en suspension dans de l'eau physiologique ($\text{NaCl } 9 \text{ g.l}^{-1}$) additionnée de CaCl_2 , MgCl_2 , EDTA sodique, EDTA calcique ou EDTA magnésien. Les solutions ont été amenées à la neutralité auparavant.

La bactérie à Gram négatif Escherichia coli est devenue plus résistante au biotextile, lorsque le milieu a été enrichi en calcium ou en magnésium. L'influence de l'ion Ca^{++} semble plus importante que celle de l'ion Mg^{++} . L'apport massif de l'un ou l'autre de ces ions n'a, cependant, jamais entraîné une résistance totale au biotextile. Nous avons pu remarquer que l'adjonction de fortes quantités d'EDTA (20 et 50 mM), ont provoqué une mortalité importante sur les tissus traités, mais également sur les tissus témoins. Par contre, les complexes EDTA:Ca et EDTA:Mg se sont avérés peu toxiques pour les témoins. Ainsi l'EDTA a provoqué la fragilisation des parois en complexant les ions bivalents. Lorsque l'EDTA a été complexé par ces ions, il est devenu inoffensif pour les bactéries. On remarquera, que la résistance acquise, lors de l'enrichissement du milieu en ions Ca^{++} et Mg^{++} , est perdue en présence d'EDTA.

Staphylococcus aureus réagit peu à l'apport d'ions Ca^{++} ou Mg^{++} et pas du tout à la présence d'EDTA (tissus témoins et traités).

Comme prévu, la paroi joue un rôle important dans la résistance au biotextile. Les bactéries à Gram positif ont une paroi moins épaisse et surtout moins riche en lipide, que les bactéries à Gram négatif. C'est pourquoi elles sont plus sensibles au biotextile. Lorsque la paroi est fragilisée, la sensibilité au biotextile est accrue. L'EDTA est un ion accompagnateur intéressant à étudier.

2.2) Rôle des LPS dans la résistance au biotextile

Les ions Ca^{++} et Mg^{++} rendent la paroi des bactéries à Gram négatif plus cohésive en s'associant avec les lipopolysaccharides (LPS) pariétaux (NIKAIDO 1985). Pseudomonas aeruginosa est connu pour sa résistance aux ammoniums quaternaires (PETROCCI 1977). Cette résistance est en grande partie due à la richesse de sa paroi en LPS (KROPINSKI 1978).

Sur les dix souches de Pseudomonas aeruginosa que nous avons testées, deux présentent une grande sensibilité au biotextile (Tableau -XXXVI-). Nous avons vérifié si cette hypersensibilité est due à une déficience en lipopolysaccharides. Ainsi, nous avons défini, pour chaque souche, leur appartenance aux types "rough" (rugueux : LPS de petites tailles) ou "smooth" (lisse : LPS de grandes tailles) par la méthode de KROPINSKI (1976). Nous avons effectué les tests d'activité antiseptique en présence et en absence de LPS (tableau -XLVII-). Les LPS ont été extraits par nos soins, à partir de la souche CIP 76110, en utilisant la méthode de WESTPHAL (1965).

Les souches CIP 73344 et CIP 73351 se sont avérées être de type "rough". Ces deux souches sont également très sensibles au biotextile. L'adjonction de LPS inhibe en partie l'activité antiseptique du biotextile. KROPINSKI (1978) a déjà fait état de la sensibilité particulière aux détergents des souches de Pseudomonas aeruginosa de type "R". D'après (EL-FAHALA 1983), les ammoniums quaternaires ont plus facilement accès à la membrane cytoplasmique. Pour notre part, il semble que les LPS agissent en neutralisant les ammoniums quaternaires fixés de manière non spécifique. On sait que, généralement, l'augmentation de la résistance des bactéries aux ammoniums quaternaires est en corrélation avec un enrichissement des parois en lipide (SULING 1977). Les composants lipidiques des parois se fixent probablement sur les ammoniums quaternaires qui sont alors neutralisés. Nous trouvons ici une explication du phénomène de saturation des sites actifs du biotextile, étant donné la très grande affinité des ammoniums quaternaires pour les composés lipidiques. Nous avons pu constater, par ailleurs, que des souches très résistantes comme CIP 76110 ou CIP 73433, sont capables de relarguer dans le milieu de 20 à 30 µg de LPS par ml après 18 heures de culture. Les souches les plus sensibles aux ammoniums quaternaires solubles sont aussi les souches les plus sensibles aux ammoniums quaternaires fixés. Nous n'avons, par ailleurs, trouvé aucune résistance croisée avec d'autres antibiotiques cationiques comme la polymyxine B et la collistine. La souche CHR 693 M résistante à la gentamicine, la carbénicilline et aux sulfamides, n'est pas particulièrement résistante au biotextile. La souche CIP 73351 présente une polysensibilité à de nombreux antibiotiques (aminoglycosides et tétracyclines surtout).

souches	type	biotextile		CMI sel 6 ₃ ug/ml
		sans	+ LPS	
CIP 73344	"rough"	+++	±	0,73
CIP 73351 ^a	"rough"	+++	±	0,44
CIP 73388	"smooth"	-	-	1,76
CIP 73426	"smooth"	-	-	2,34
CIP 73433	"smooth"	-	-	2,34
CHR 461 M	"smooth"	-	-	2,93
CHR 583 M	"smooth"	-	-	2,34
CHR 693 M ^b	"smooth"	±	-	1,76
CHR 792 ^c	"smooth"	±	-	1,17
CIP 76110	"smooth"	-	-	2,34

Tableau -XLVII- : Activité antiseptique du sel 6₃ fixé (15 g/kg de coton) et non fixé, vis-à-vis de diverses souches de Pseudomonas aeruginosa (10⁸ u.f.c./cm²), en absence et en présence de LPS (10 g.l⁻¹).

- a : souche polysensible (Clt^r, Oxt^r, Kan^r, Neo^r, Str^r, Pip^r)
 b : souche multirésistante (Gen^r, Carb^r, Suf^r)
 c : souche Clt^r

CMI : Concentration Minimale Inhibitrice.

2.3) Observations en microscopie électronique

Les ammoniums quaternaires fixés semblent donc interagir avec les parois bactériennes. L'observation en microscopie électronique à balayage, a permis de visualiser l'érosion des systèmes pariétaux des bactéries mises en contact avec le biotextile.

Les photographies de la page suivante montrent une cellule de Staphylococcus aureus après une heure de contact avec le tissu témoin (photographie -3-) et le biotextile (photographie -4-). Les cellules prennent un aspect granuleux caractéristique de l'action des ammoniums quaternaires (RICHARDS 1980). Il semble que la dégradation des systèmes pariétaux soit dû à des chocs successifs survenus entre la bactérie et le biotextile. Nous avons pu remarquer que le tissu traité se constelle de petits granules après avoir été mis en contact avec des cellules bactériennes (photographie -5-). Il est possible que ces granules soient des fragments de paroi arrachés aux bactéries.

3) Influence de quelques facteurs physico-chimiques sur le pouvoir antiseptique du biotextile

3.1) Influence de la température

La température influe souvent sur le pouvoir antimicrobien des antiseptiques. Les ammoniums quaternaires n'échappent pas à cette règle. Cependant ils demeurent encore très actifs à basse température (GELINAS 1984). Nous avons effectués des tests d'activité antiseptique du biotextile à 5, 20, 30 et 37°C (tableau -XLVIII-).

Nous avons constaté que le sel 6_3 fixés perd une notable partie de son activité antibactérienne à 5°C, tant vis-à-vis de Staphylococcus aureus que d' Escherichia coli . Dans le premier cas, l'activité n'a été que bactériostatique avec 10^4 u.f.c./cm². Il en a été de même avec Escherichia coli (10^9 u.f.c./cm²). Dès 20°C le biotextile semble aussi actif qu'à 37°C. Selon KOURAI (1985a) l'adsorption des ammoniums quaternaires aux cellules bactériennes, est régie par une loi thermodynamique fortement influencée par la température où s'effectue le contact. Dans notre cas la situation est inversée, ce sont les bactéries qui s'adsorbent sur le biotextile.



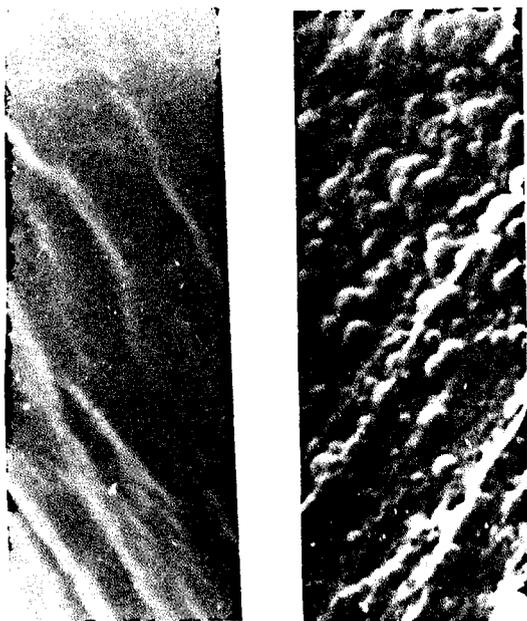
PHOTO -3-

0,5µm



PHOTO -4-

CELLULES DE STAPHYLOCOCCUS AUREUS APRES UNE HEURE DE CONTACT AVEC LE TISSU TEMOIN (photo -3-) ET LE TISSU TRAITE AVEC LE SEL 6₃ A 15 g/kg (photo -4-)



-A-

0,5µm

-B-

PHOTO -5-

Fibres cellulosiques
du tissu traité
(sel 6₃, 15 g/kg)

- A- Avant contact avec des cellules bactériennes
- B- Après contact avec Staphylococcus aureus

temp.	<u>Staphylococcus aureus</u>			<u>Escherichia coli</u>		
	u.f.c./cm ²			u.f.c./cm ²		
	10 ⁴	10 ⁵	10 ⁶	10 ³	10 ⁴	10 ⁵
5°C	±	±	±	±	±	±
20°C	+++	++	±	+++	++	±
30°C	+++	+++	±	+++	++	±
37°C	+++	+++	±	+++	++	±

Tableau -XLVIII- : Influence de la température sur le pouvoir antiseptique de tissu greffé à 15 g/kg de coton (sel 6₃), vis-à-vis de Staphylococcus aureus CIP 7625 et Escherichia coli CIP 7624

Nous avons pensé que ce mécanisme était retardé à basse température. Cependant, après 48-72 heures d'incubation, il s'est avéré que l'activité antimicrobienne ne se manifeste pas et que les populations microbiennes évoluent de manière identique à celles du tissu témoin. Il semble donc que l'activité antiseptique des ammoniums quaternaires fixés soit presque totalement annulée à 5°C. Les raisons de cette inactivation pourraient être, d'une part, dues à la non-adsorption des cellules au tissu : l'énergie d'activation de la réaction serait trop importante ; d'autre part, il se peut que les bactéries soient plus résistantes. L'action du biotextile serait, par exemple, plus efficace sur des bactéries en période de division. Certains auteurs ont décrit l'importance considérable de certains phospholipides dans la croissance et la duplication des bactéries (PIERUCCI 1985). Les ammoniums quaternaires pourraient bloquer certains mécanismes en fixant les phospholipides avec lesquels ils ont une forte affinité.

En conclusion, les ammoniums quaternaires fixés du biotextile sont considérablement moins efficaces à basse température que leurs homologues solubles. Toutefois, cela ne constitue pas, selon nous, un handicap important pour les applications futures du textile antimicrobien.

3.2) Influence du pH

Les ammoniums quaternaires sont plus efficaces à pH alcalin qu'à pH acide. Il s'agit d'un trait commun à tous les détergents cationiques antiseptiques (HUGO 1976). Selon KOSTENBAUDER (1977) le pH agirait sur la concentration en formes actives libres dans un sens ou dans l'autre.

Nous avons utilisé trois tampons phosphate de potassium 0,2 M de pH 6, 7 et 8. Des essais entrepris avec des tampons à pH 5 et 9 n'ont pas été retenus en raison de la mauvaise tenue des témoins. Les résultats sont rassemblés dans le tableau -XLIX-. Nous constatons que le biotextile n'est pas particulièrement influencé par les conditions ambiantes de pH. Cette constatation a été faite tant sur Staphylococcus aureus que sur Escherichia coli. Le pH ne peut évidemment pas agir sur la solubilité des composés fixés. Il ne semble pas modifier l'adsorption des cellules au biotextile. Le modèle de KOSTENBAUDER se trouve ainsi plus ou moins confirmé. L'action antiseptique du biotextile ne devrait donc pas être perturbée par le PH acide de la peau. L'alcalinité résiduelle des eaux de lavage ne devrait pas non plus le gêner.

pH	<u>Staphylococcus aureus</u>			<u>Escherichia coli</u>		
	u.f.c./cm ²			u.f.c./cm ²		
	10 ⁴	10 ⁵	10 ⁶	10 ³	10 ⁴	10 ⁵
6	+++	++	±	+++	++	±
7	+++	+++	±	+++	++	±
8	+++	+++	±	+++	+++	±

Tableau -XLIX- : Influence du pH sur le pouvoir antiseptique de tissu greffé à 15 g/kg de coton (sel 6₃), vis-à-vis de Staphylococcus aureus CIP 7625 et Escherichia coli CIP 7624

3.3) Influence de la matière organique

Nous avons vu dans les généralités que les matières organiques interagissent et inhibent la plupart des désinfectants (GELINAS 1983b, LONCIN 1986). Nous avons voulu voir dans quelles mesures, le biotextile peut être lui même neutralisé. Nous avons choisi plusieurs substances appartenant à des catégories différentes : acides aminés et peptides de faible poids moléculaire (extraits de levure, milieu de LURIA), protéines (caséine, sérum albumine bovine, lait), polysaccharides (malto-dextrines, inositol) et composés lipidiques (phospholipides, LPS). Les solutions de ces composés sont amenées à pH neutre. Les activités ont été comparées à celle trouvée en présence d'eau physiologique ($\text{NaCl } 9 \text{ g.l}^{-1}$), vis-à-vis de Staphylococcus aureus. Les résultats sont présentés dans le tableau -L-.

En présence d'un milieu riche en acides aminés et petits peptides, l'activité antibactérienne du biotextile diminue : la quantité de cellules inhibées après 6 heures de contact, passe de 10^5 u.f.c./ cm^2 à 10^3 u.f.c./ cm^2 en présence de milieu de LURIA. Si nous utilisons des extraits de levure (10 g.l^{-1}), l'activité n'est plus que de 10^3 u.f.c./ cm^2 inhibées en 24 heures. En présence de protéines de haut poids moléculaire (caséine, sérum albumine bovine), l'activité devient encore plus faible. Le lait écrémé constitue un milieu particulièrement inhibiteur puisqu'il est à la fois riche en protéine et en calcium. Pourtant, le biotextile possède une activité importante en présence de gélatine à 10 % (tableau -XLIV-, p. 156), probablement en raison de la température élevée (50°C) où s'est effectué l'expérimentation. Les polysaccharides gênent peu ou pas l'activité antiseptique. Au contraire des composés lipidiques constituent des inhibiteurs les plus importants.

Les substances connues pour leur affinité avec les ammoniums quaternaires (protéines, composés lipidiques) inhibent fortement l'activité antiseptique du biotextile. Il est fort probable que leur présence entraîne ce que nous appelons un "masquage" des sites actifs du tissu. Selon nous, ces produits entrent en compétition avec les cellules bactériennes pour s'adsorber sur les ammoniums quaternaires fixés. Les relations, qui s'établissent entre la bactérie et le biotextile, seraient comparables à celles d'une résine cationique échangeant des anions avec le milieu environnant.

matières organiques	u. f. c. /cm ²		
	10 ³	10 ⁴	10 ⁵
eau physiologique (NaCl 9 g.l ⁻¹)	+++	+++	+++
milieu de Luria	+++	±	-
extraits de levure (10 g.l ⁻¹)	+ +	±	-
caséine (10 g.l ⁻¹)	+ +	-	-
sérum albumine bovine (10 g.l ⁻¹)	±	-	-
lait écrémé (100 g.l ⁻¹)	±	-	-
malto-dextrines (50 g.l ⁻¹)	+++	+++	+ +
myo-inositol (50 g.l ⁻¹)	+++	+++	+++
phospholipides (1 g.l ⁻¹)	±	-	-
lipopolysaccharides (10 g.l ⁻¹)	±	-	-

Tableau -L- : Influence de la matière organique sur le pouvoir antiseptique de tissu traité à 15 g/kg de coton avec le sel 6₃, vis-à-vis de Staphylococcus aureus CIP 7625

L'activité antiseptique des ammoniums quaternaires fixés en présence de matière organique, demeure assez satisfaisante en regard avec les quantités de bactéries (10^3 u.f.c./ cm^2), appliquées dans les normes AATCC (1975) et AOAC (1970), aux surfaces "autostériles" et tissus, pour évaluer leur pouvoir antiseptique.

3.4) Influence de l'ion accompagnateur

L'ion accompagnateur ou contre-ion neutralise la charge positive des ammoniums quaternaires. Théoriquement cet ion est un chlorure (voir partie confidentielle). En pratique, au cours du procédé de fabrication, le tissu subit différents traitements, de sorte qu'il est difficile de connaître l'ion majoritaire final. En principe, un ion facilement mobilisable doit permettre une meilleure efficacité antiseptique dans l'hypothèse où le biotextile fonctionne vis-à-vis des cellules comme un échangeur d'ions. Certains ions sont capables, en outre, augmenter l'activité antiseptique du biotextile comme par exemple l'EDTA (KENWARD 1979) et l'iode (EUDY 1981).

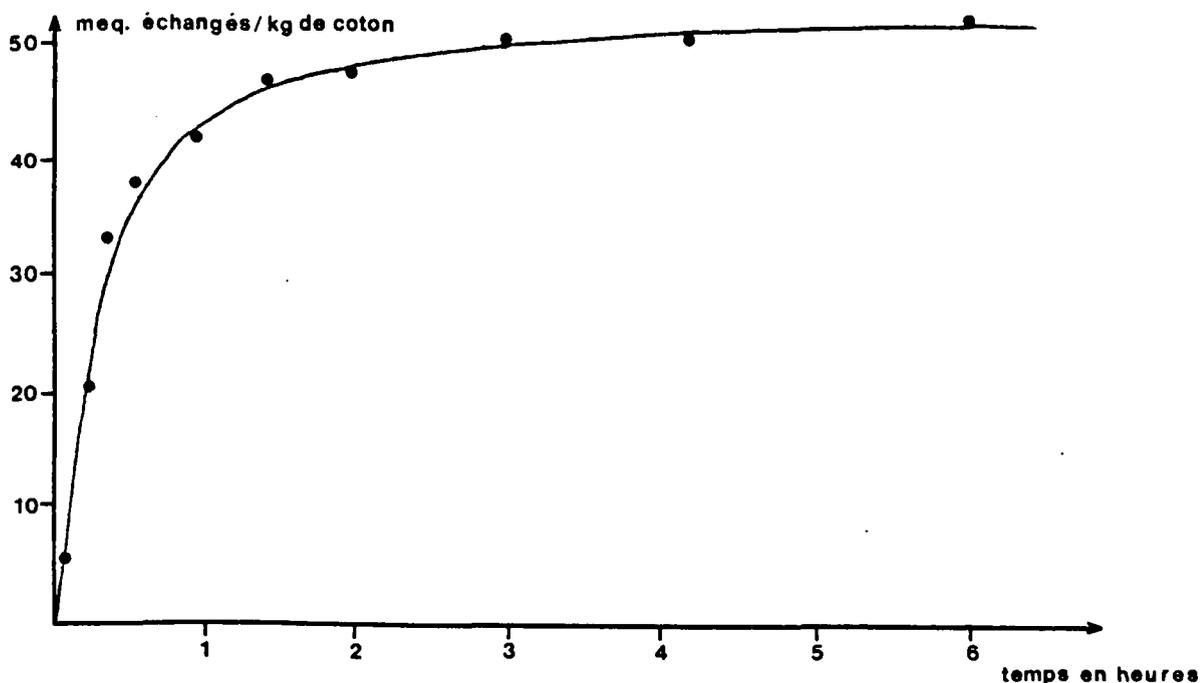


Figure -20- : Cinétique d'échange d'ions picrates entre un tissu chargé à 15 g/kg de coton (sel 6₃) et une solution de picrate de potassium (10^{-3} M)

La figure -20- illustre ce phénomène d'échange d'ion effectué entre une solution 10^{-3} M de picrate de potassium et un échantillon de tissu greffé à 15 g/kg de coton. La quantité d'ions picrates échangés a été trouvée égale à 53,2 meq./kg de coton, soit une charge d'environ 16,3 g de sel 6 par kg de coton. Après une heure de contact 82 % de l'échange est effectué. La cinétique est stabilisée après 6 heures.

Nous avons effectué plusieurs échanges d'ions avec divers sels minéraux ou organiques. Les tissus (biotextile et témoin non traité) ont été plongés pendant 24 heures dans des solutions salines concentrées afin d'établir un échange d'ion entre les tissus et la solution saline. Nous avons utilisé les solutions suivantes :

- | | |
|-------------------------------------|--|
| - CH_3COONa 1 M | - Na_2CO_3 1 M |
| - NaNO_3 1 M | - Na_2SO_4 1 M |
| - Na_2HPO_4 0,5 M | - $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7$ (solution saturée) |
| - NaCl 1 M | - NaBr 1 M |
| - KI 1 M | - NaOH 0,5 M |
| - EDTA:Na 0,1 % | - SDS 0,1 % |
| - Picrate de potassium 0,1 M | |
| - Eau distillée (à titre de témoin) | |

Après avoir trempé dans les solutions salines, les échantillons de tissu sont lavés cinq fois à l'eau distillée avec un rapport de bain de 1/200 (1 g de tissu pour 200 g d'eau). Ils sont ensuite séchés à l'air ambiant. Leur activité antimicrobienne est enfin testée vis-à-vis de Staphylococcus aureus. Le tableau -LI- résume les activités obtenues en fonction de l'ion accompagnateur majoritaire qui neutralise la charge des ammoniums quaternaires fixés.

Les ions halogènes (Cl^- , Br^- et I^-), de même que les ions OH^- , SO_4^{2-} , EDTA et picrates, ne gênent pas l'activité antiseptique du tissu. Ces ions sont facilement mobilisables. Par ailleurs, nous avons constaté que les ions I^- et EDTA confèrent au biotextile une activité légèrement supérieure vis-à-vis de Pseudomonas aeruginosa. Les ions NO_3^- et PO_4^{3-} retardent l'effet antiseptique du tissu (activité bactéricide en 24 h au lieu de 6 h). Les ammoniums quaternaires fixés, contrebalancés par les ions CH_3COO^- et CO_3^- , n'ont qu'un effet bactériostatique.

ion majoritaire	Act.	ion majoritaire	Act.
acétate	±	chlorure	+++
carbonate	±	bromure	+++
nitrate	+ +	iodure	+++
sulfate	+++	hydroxyde	+++
phosphate	+ +	E. D. T. A.	+++
borate	+ +	S. D. S.	-
picrate	+++	eau dist.	+++

Tableau -LI- : Influence de l'ion accompagnateur sur le pouvoir antiseptique de tissu greffé à 15 g/kg de coton (sel 6₃), vis-à-vis de Staphylococcus aureus CIP 7625 (10⁸ u.f.c./cm²)

Act. : Activité antiseptique

EDTA : Ethylène Diamine Tétra Acétate

SDS : Sodium Dodécyl Sulfate

Nous avons obtenu, avec ces quatre derniers ions, des proliférations importantes de cellules bactériennes sur les tissus témoins. GEFTIC (1979) avait déjà fait état de la perte d'activité antiseptique d'ammoniums quaternaires associés avec des ions susceptibles de constituer un nutriment pour la bactérie (acétates et nitrates). Le biotextile est totalement neutralisé par le détergent anionique (SDS). Cette dernière constatation laisse présager des problèmes de masquage des sites actifs par les produits lessiviels. La question a été abordée dans la partie confidentielle.

Les résultats du tableau -LI- montrent la grande importance des ions accompagnateurs. Dès lors, la composition du milieu, où sont effectués les contacts bactéries-tissu, revêt une grande importance. Ainsi, l'utilisation du tampon phosphate 0,2 M est sujette à caution. Pour résoudre ce problème, nous avons alors établi des comparaisons entre plusieurs milieux. Nous n'avons constaté aucune différence d'activité antiseptique entre les tests où les cellules étaient en suspension dans de l'eau physiologique ($\text{NaCl } 9 \text{ g.l}^{-1}$), le tampon phosphate 0,2 M et l'eau distillée (tableau -LII-). Les ions PO_4^{3-} n'ont notamment pas généré les interactions membranes bactériennes-ammoniums quaternaires fixés.

Il semble donc que, pour obtenir une bonne efficacité antibactérienne, un échange de molécules s'établit entre la fibre et la bactérie. L'ion accompagnateur est probablement mobilisé par certains composants membranaires indispensables à la survie de la bactérie. Si le contre-ion ne peut pas être mobilisé, en raison de son affinité particulière pour les ammoniums quaternaires, la réaction ne se fait pas. On obtient alors le phénomène de "masquage" des sites, qui rend le biotextile inactif.

3.5) Influence des détergents non-ioniques

Nous avons déjà évoqué dans les généralités le cas particulier des agents mouillants non-ioniques. Ceux-ci favorisent l'adsorption des ammoniums quaternaires par les membranes bactériennes à faible dose (100 $\mu\text{g/ml}$) et inhibent ces mêmes ammoniums quaternaires à plus forte concentration (30 mg/ml). Les agents mouillants sont également intégrés dans certains produits détergents dont ils facilitent l'action (INTERKEMIA 1985).

tissus	N_0	N_6	S_6	N_{24}	S_{24}
<u>NaCl 9 g.l⁻¹</u>					
témoin	$9,9 \cdot 10^4$	$9,4 \cdot 10^4$	94,9	$7,5 \cdot 10^4$	75,7
biotext.	"	63	0,06	13	0,01
<u>Tampon phosphate 0,2 M</u>					
témoin	"	$5,2 \cdot 10^4$	52,5	$2,7 \cdot 10^4$	27,3
biotext.	"	5	0,00	0	0
<u>Eau distillée</u>					
témoin	"	$5,5 \cdot 10^4$	55,5	$3,0 \cdot 10^4$	30,3
biotext.	"	2	0,00	0	0

Tableau -LII- : Influence du milieu de suspension des cellules sur l'activité antiseptique du biotextile greffé à raison de 15 g/kg de coton (sel 6₃) vis-à-vis de Staphylococcus aureus CIP 7625 (10⁸ u.f.c./cm²)

N_0 , N_6 et N_{24} : u.f.c. par cm² de tissu après 0, 6 et 24 heures de contact

S_6 et S_{24} : Indices de survie (%)

Nous avons incorporé à l'inoculum bactérien des concentrations croissantes de polysorbate 80 (tween 80) et de polyoxyéthylèneglycol (triton X-100), variant de 0 à 1 mg/ml. Le tween 80 est souvent utilisé pour neutraliser les ammoniums quaternaires (REYBROUCK 1979) et nous nous en servons pour nos essais (milieu lécithine-tween). Son étude a donc été particulièrement intéressante. Le triton X-100 est recommandé par l'AATCC dans les cas où le tissu absorbe mal l'inoculum bactérien. Sa toxicité pour les cellules bactériennes est néanmoins beaucoup plus importante que celle du tween 80. Les essais ont été menés avec Staphylococcus aureus et Escherichia coli. Les résultats sont rassemblés dans le tableau -LIII-.

Le triton X-100 a augmenté l'activité antiseptique du biotextile aux concentrations 0,1 et 0,3 mg/ml. L'activité initialement bactériostatique à 10^6 u.f.c./cm² (Staphylococcus aureus) et 10^8 u.f.c./cm² (Escherichia coli), est devenue bactéricide en 24 heures. Les résultats obtenus avec 0,6 et 1 mg/ml ne peuvent pas être retenus. En effet, l'action toxique du triton X-100 s'est manifestée à ces concentrations et le taux de survie des bactéries sur les tissus témoins s'est avéré trop faible. Il est par conséquent difficile de définir si l'activité antiseptique, observée à ces concentrations, a un effet de synergie.

Le tween 80 augmente également l'activité antiseptique du biotextile lorsqu'il est présent à raison de 0,2 mg/ml. Si la concentration est augmentée, l'activité antibactérienne diminue progressivement pour être nulle à la concentration de 1 mg de tween 80 par ml. L'effet neutralisant du tween 80 sur les ammoniums quaternaires s'est donc manifesté rapidement.

Il existe un effet de synergie entre les agents mouillants (tween 80 et triton X-100) à faible concentration et les ammoniums quaternaires fixés. La présence des agents mouillants permet, en effet, aux échantillons de tissu d'absorber plus facilement l'inoculum, de sorte que le contact bactéries-fibres est favorisé. Un effet comparable est obtenu avec les cotons hydrophiles. L'activité supérieure des cotons de Californie par rapport à la bluth, est certes due à un meilleur rendement de fonctionnalisation mais, aussi à une bonne absorption de l'inoculum, qui a favorisé l'action des ammoniums quaternaires fixés. Ces essais corroborent les observations de RICHARDS (1980) à propos du tween 80.

agents mouillants	mg. ml ⁻¹	<u>S. aureus</u>		<u>E. coli</u>	
		u.f.c./cm ²		u.f.c./cm ²	
		10 ⁵	10 ⁶	10 ⁴	10 ⁵
Triton X-100	0	+++	<u>±</u>	+ +	-
	0,1	+++	+ +	+++	+ +
	0,3	+++	+ +	+++	+ +
	0,6	+++	+++	+++	+ +
	1,0	+++	+++	+++	+++
Tween 80	0,2	+++	+ +	+++	+ +
	0,4	+++	<u>±</u>	+ +	<u>±</u>
	0,6	<u>±</u>	-	-	-
	1,0	-	-	-	-

Tableau -LIII- : Influence d'agents mouillants non-ioniques sur le pouvoir antiseptique de tissu greffé à 15 g/kg de coton (sel 6₃), vis-à-vis de Staphylococcus aureus CIP 7625 et de Escherichia coli CIP 7624

3.6) Influence de l'humidité relative de l'air

L'humidité relative de l'air joue un rôle important dans le pouvoir stérilisant des surfaces "autostériles" (HOFFMAN 1955). L'activité antiseptique doit pouvoir se manifester aux taux d'humidité relative de l'air ambiant. Sous nos climats, l'humidité relative varie en général entre 60 et 80 %, à l'extérieur. Dans les habitations, et notamment en hiver, l'humidité relative peut parfois descendre à 20 % sous l'effet du chauffage.

Les essais en humidité relative contrôlée, ont été réalisés avec deux tissus traités à raison de 5 et 15 g/kg de coton (sel 6₃) et la bactérie Escherichia coli. La méthode que nous avons utilisée prévoit l'utilisation du lait écrémé pour protéger les bactéries de la dessiccation. Il est apparu que ce support de déshydratation ne pouvait convenir à ces essais, car il diminue considérablement l'action désinfectante des biotextiles. Le lait possède un pouvoir neutralisant des ammoniums quaternaires trop important (tableau -L-). Nous avons adopté la malto-dextrine (PM moyen d'environ 1000 d), qui protège la bactérie de la déshydratation sans trop altérer l'activité antiseptique des biotextiles. L'inositol a un effet semblable, sans toutefois égaler la malto-dextrine dans son effet protecteur. Les bactéries ont donc été mises en suspension dans des solutions de malto-dextrine de 50 g.l⁻¹. Les échantillons de tissus ont été testés à 6 taux d'humidité relative (98, 75, 50, 33, 11 et 0 % d'H.R.). La survie des populations bactériennes est suivie pendant une heure, après que les échantillons aient été mis à sécher à 0 % d'humidité relative (figure -21-).

A 98 % d'H.R., seul le tissu à 15 g/kg présente une activité antiseptique significative après 1 heure de contact. L'action du tissu traité à raison de 5 g/kg de coton est plus lente.

A 75 et 50 % d'H.R. les deux biotextiles ont réduit la population bactérienne de plus de 99 %. Après une heure de contact, nous ne détectons pas de différence d'activité entre eux. A 75 comme à 98 % d'H.R. la protection contre la déshydratation est totale (taux de mortalité nul sur les tissus témoins).

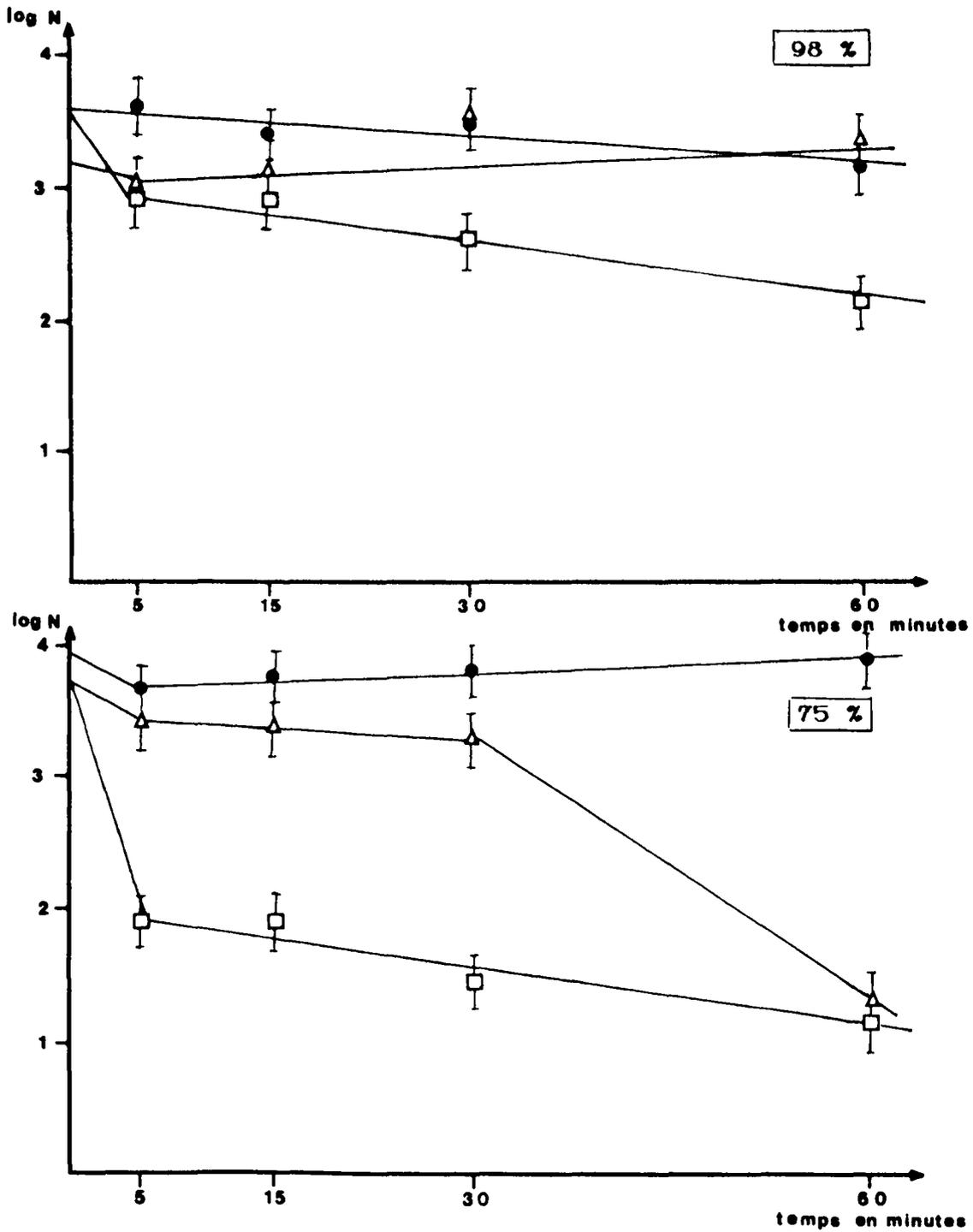


Figure -21- : Influence de l'humidité relative de l'air sur l'activité antiseptique de tissus greffés par le sel 6₃, vis-à-vis de Escherichia coli CIP 7624

ACTIVITE A 98 % ET 75 % D'HUMIDITE RELATIVE

(●) témoin (Δ) 5 g/kg (□) 15 g/kg
N : log du nombre de bactéries par cm².

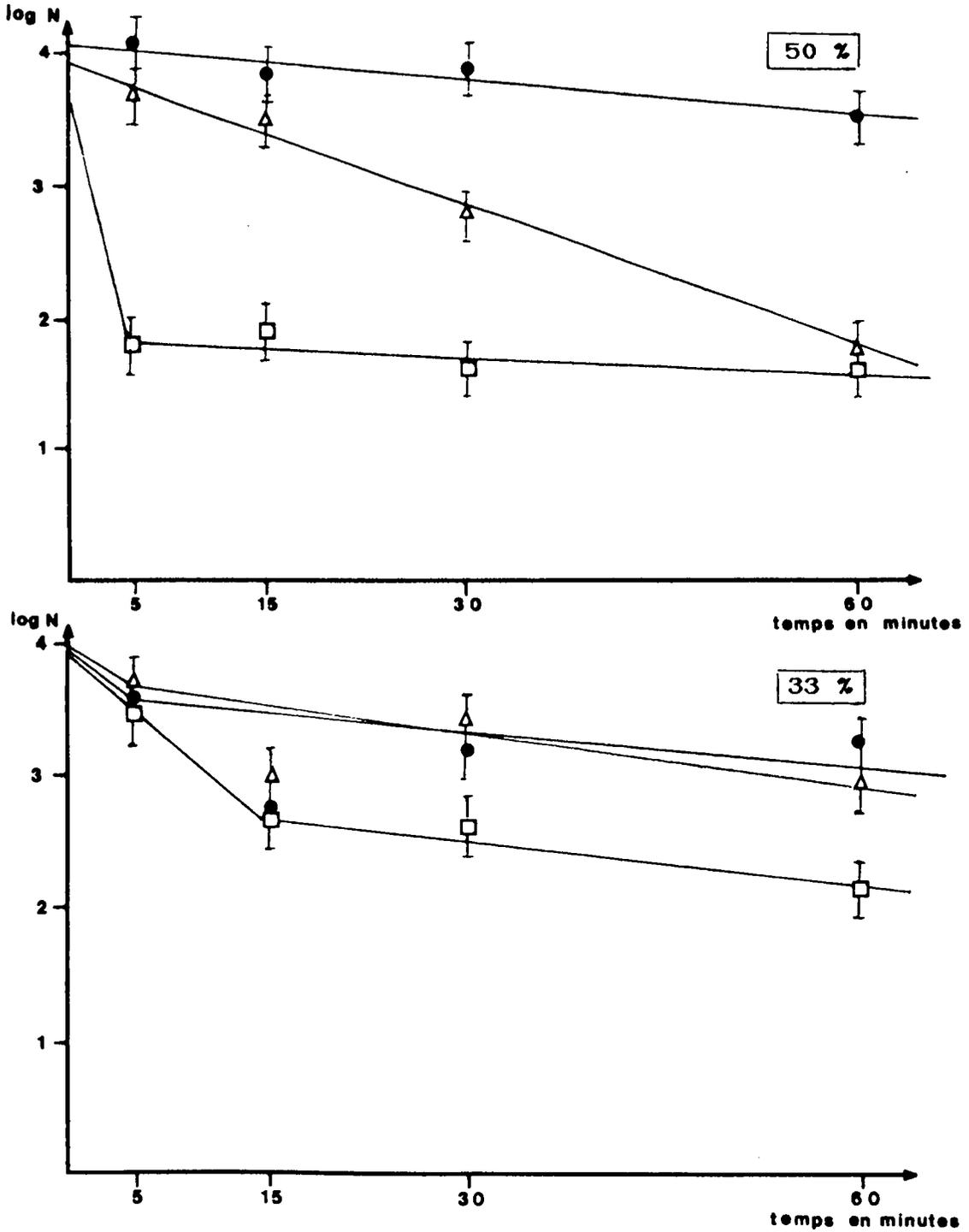


Figure -21- : Influence de l'humidité relative de l'air sur l'activité antiseptique de tissus greffés par le sel 6₃, vis-à-vis de *Escherichia coli* CIP 7624

ACTIVITE A 50 % ET 33 % D'HUMIDITE RELATIVE

(●) témoin (Δ) 5 g/kg (□) 15 g/kg
N : log du nombre de bactéries par cm².

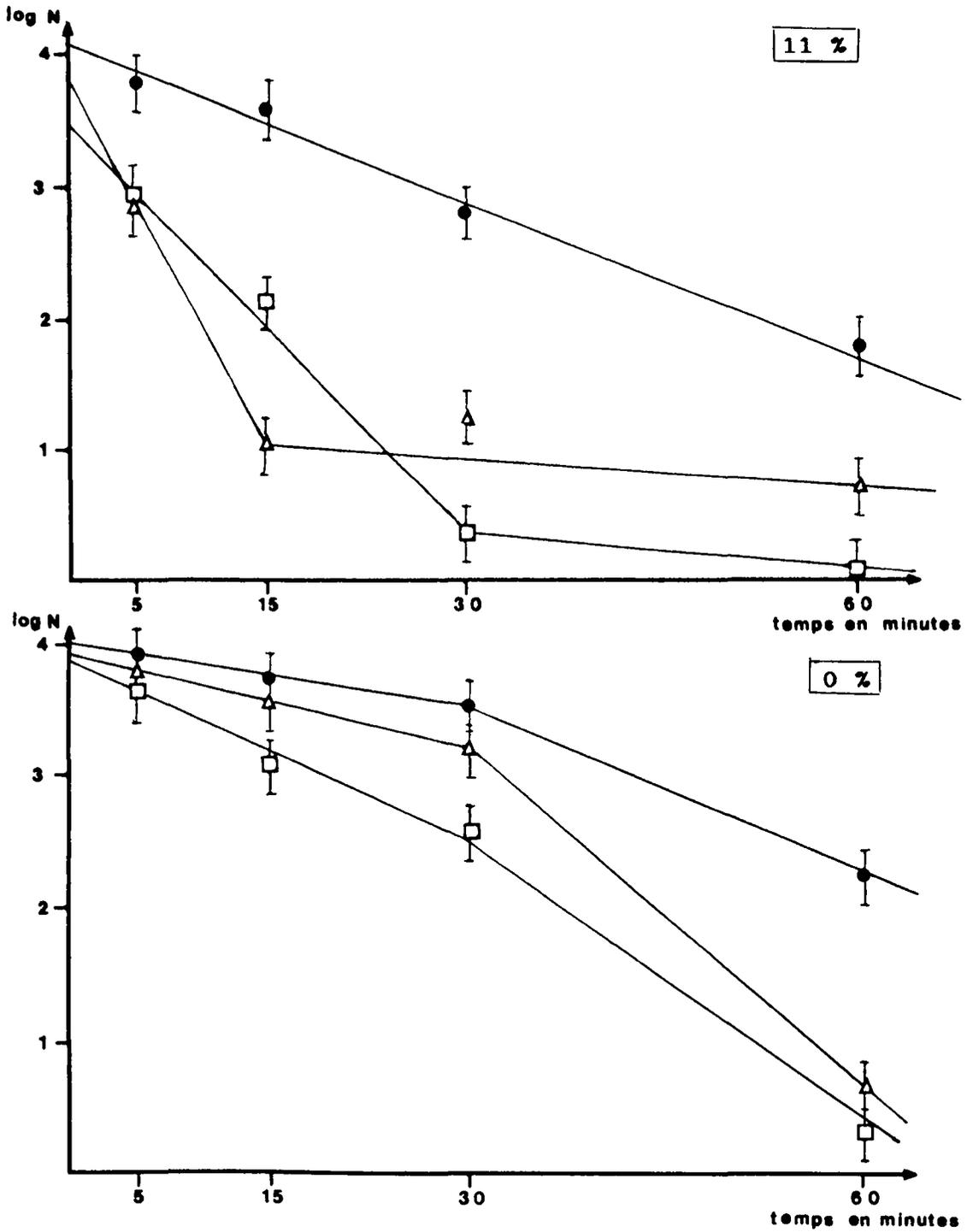


Figure -21- : Influence de l'humidité relative de l'air sur l'activité antiseptique de tissus greffés par le sel 6₃, vis-à-vis de Escherichia coli CIP 7624

ACTIVITE A 11 % ET 0 % D'HUMIDITE RELATIVE

(●) témoin (Δ) 5 g/kg (□) 15 g/kg
N : log du nombre de bactéries par cm².

Dès 50 % et jusque 0 % d'H.R., nous avons vu apparaître un effet antibactérien croissant sur témoin, dû à la deshydratation intense des cellules. Les différences entre biotextiles et tissu témoin ne deviennent plus très significatives à 33, 11 et 0 % d'H.R. de l'air. On remarque cependant que le taux de survie sur les biotextiles est toujours inférieur à celui des tissus témoins.

Les ammoniums quaternaires fixés sont capables d'agir à 50 % d'humidité relative en utilisant la méthode HOFFMAN (1955) préconisée par l'AOAC (1970). Nous pensons néanmoins qu'il faut pondérer ces résultats. En effet, la deshydratation des tissus n'est pas immédiate après leur inoculation, alors que l'activité antiseptique des ammoniums quaternaires a commencé rapidement. Compte-tenu des essais effectués avec des bactéries deshydratées (tableau -XLIII-, p. 155), nous estimons que les biotextiles ont une action très faible en dessous de 70 % d'H.R.

4) Conclusions

Les ammoniums quaternaires fixés, agissent par interaction avec les systèmes membranaires et pariétaux des cellules bactériennes. Leur action se traduit notamment par une modification de la perméabilité cellulaire. Les lésions qu'ils provoquent ne semblent pas néanmoins provoquer la lyse et l'éclatement des cellules bactériennes. Les sites actifs du biotextile sont inactivés après leur contact avec les microorganismes. D'après les observations microscopiques, il semble que cela soit dû à l'adsorption par les ammoniums quaternaires de particules arrachées aux bactéries, lors du contact. Les cellules touchées prennent alors cet aspect granuleux caractéristique. L'expérimentation effectuée sur les ions accompagnateurs, confirme leur importance et le fait qu'un ion fortement retenu par les ammoniums quaternaires, inhibe l'action antimicrobienne.

Le biotextile agirait comme une résine échangeuse d'anions. Les composants lipidiques et protéiques des membranes cellulaires semblent être leur cible. Ainsi la présence de protéines de haut poids moléculaire, de LPS ou de phospholipides provoque-t-elle l'inactivation du tissu.

Une action similaire est observée avec les ions faiblement mobilisables, du fait de leur grande affinité pour les ammoniums quaternaires. Les détergents anioniques en sont l'exemple le plus remarquable.

L'immobilisation des ammoniums quaternaires entraîne certains comportements inhabituels pour cette classe d'antiseptique. Ils sont fort peu actifs à basse température et peu sensibles aux variations de pH. Leur rapidité d'action et leur efficacité sont également très amoindries par rapport aux composés solubles : compte tenu des valeurs obtenues avec le calcul des CMI, environ 1 µg de sel 6 est capable d'inhiber la croissance de 10^4 u.f.c. de Escherichia coli en 24 heures. Après fonctionnalisation, il faut environ 200 µg de ce même sel pour obtenir un résultat identique. L'explication de ce phénomène doit probablement être recherchée dans l'absence de phénomènes de tensio-activité à cause de leur immobilité. Il semble par ailleurs que des contacts répétés bactérie-fibre soient nécessaires pour obtenir un effet antimicrobien.

Nous avons enfin établi l'importance de la "qualité" du contact bactérie-fibre. La présence d'agents mouillants, d'un taux minimum d'humidité relative et l'hydrophilité du coton semblent jouer un rôle important.

CONCLUSION

DISCUSSION

Dans l'état actuel de la technique, nous sommes à la fin du stade "pilote" du projet concernant le tissu bactéricide. Parmi les cinquante formules chimiques synthétisées au départ, le sel no 6 a été choisi selon des critères chimiques (bon rendement de fonctionnalisation, facilité de synthèse, stabilité chimique), biologiques (activité antiseptique intense avant et après fixation, large spectre d'action, faible toxicité cutanée) et économiques (coût de fabrication modique). Un second sel d'ammonium quaternaire (no 36) a été mis en réserve : il présente des qualités similaires à celles du sel no 6 mais son prix de revient est quatre fois plus élevé. La synthèse industrielle du sel no 6 a été tentée et réussie, pour obtenir un produit (sel 6₃) présentant des caractéristiques proches du sel fabriqué en laboratoire. Ainsi, un textile de coton antimicrobien a été traité à l'aide d'appareils "pilotes", selon le protocole expérimental qui sera appliqué à l'échelon industriel. La charge en ammoniums quaternaires fixés avait été étudiée en laboratoire et fixée à 15 g de sel 6 par kg de coton. Le biotextile obtenu a présenté les qualités requises pour un produit utilisable à grande échelle :

- Les activités antibactériennes, obtenues vis-à-vis de bactéries à Gram positif, sont importantes (10^5 à 10^7 u.f.c./cm² inhibées en 6 heures). Parmi les bactéries à Gram négatif, la plupart des Enterobacteriaceae testées ont été sensibles au biotextile (10^3 à 10^4 u.f.c./cm² inhibées en 6 heures) ; les Pseudomonadaceae comptent des bactéries à la fois très sensibles aux ammoniums quaternaires fixés et des souches très résistantes comme Pseudomonas aeruginosa (10^2 à 10^3 u.f.c./cm² inhibées en 6 heures).

- Le biotextile présente également une importante activité antifongique. Vis-à-vis de la levure pathogène Candida albicans, le niveau d'activité germicide est de l'ordre de 10^3 u.f.c./cm² inhibées en 6 heures. Grâce au traitement de fonctionnalisation, le tissu est capable de résister à l'attaque des champignons cellulolytiques. Aucun de ceux que nous avons testés, n'a pu entamer la structure cellulosique du coton.

- Du point de vue toxicologique, le tissu traité, n'a causé aucune irritation cutanée supérieure au tissu témoin sur la peau de lapins. Les essais de contacts itératifs, sur le même animal, n'ont pas permis de déceler le moindre trouble. Parmi cinquante sujets humains d'une population prédisposée aux réactions d'ordre allergologiques, un seul cas réellement positif a été détecté. Ce sujet a réagi, par ailleurs, à d'autres composés de la batterie de test, dont un ammonium quaternaire. L'ensemble de tous ces résultats est encourageant.

- La question de la résistance du biotextile au lavage a été abordée dans la partie confidentielle. Pour le moment, le tissu traité conserve une activité antimicrobienne après 30 à 50 lavages. Nous pensons pouvoir améliorer, sans trop de problèmes, ce résultat, pour porter à 100-150 lavages la maintenance des pouvoirs bioactifs.

Nous venons de voir en quatre points, les principales qualités de ce nouveau produit. Le prix de revient de sa fabrication ne dépasse pas celui d'une teinture. Il est donc possible de l'utiliser à grande échelle pour améliorer les conditions d'hygiène corporelle, éviter certains risques épidémiologiques de contamination par des vêtements souillés ou simplement éviter la dégradation du coton par des agents cellulolytiques. Le biotextile présente enfin quelques qualités intéressantes, exploitables dans les techniques de filtration de liquides ou d'air.

La désinfection avec des produits insolubles

Le procédé de fonctionnalisation n'est pas, en lui-même, une innovation technologique. L'originalité réside dans l'utilisation du pouvoir antiseptique d'ammoniums quaternaires immobilisés sur des fibres de coton, donc d'employer des composés insolubles. Selon JANAUER (1981), l'emploi de molécules désinfectantes insolubles amène une nouvelle conception de la désinfection. L'intérêt de tels désinfectants avait été pressenti par KLARMANN (1953). On peut ainsi désinfecter des liquides sans ajouter d'additifs solubles, qui altèrent la qualité des solutions filtrées ou présentent un risque toxicologique.

Par rapport aux autres méthodes de désinfection sans additifs (ultra-violetts, hautes températures, radiations ionisantes, filtration sur membrane), les produits insolubles sont utilisables sans dépense d'énergie, sans altérer les solutions désinfectées, et peuvent servir au traitement en continu de liquides sans risques de colmatages (par rapport à la filtration sur membrane).

Selon JANAUER (1981), les antiseptiques insolubles doivent provoquer la mort rapide des microorganismes, avoir des sites actifs facilement accessibles, être rémanents et actifs en présence de matières organiques ; ils ne doivent pas être inactivés de manière irréversible. Plusieurs antiseptiques présentent une activité à l'état de faible solubilité ou d'insolubilité totale comme l'argent, l'hexachlorophène, les salicylanilides et certains dérivés du paraben (GUMP 1982). Les ammoniums quaternaires, notamment les composés siliconés, représentent la classe la plus importante et la plus étudiée de désinfectants insolubles. Ainsi, il existe actuellement plusieurs applications et brevets utilisant des ammoniums quaternaires insolubles (MUNE 1979, WALFISH 1979, SPEIER 1981, ISQUITH 1983, BALDWIN 1984a et 1984b, NAKAGAWA 1984b). Il est intéressant de comparer ces produits avec notre biotextile, en étudiant les critères de JANAUER (1981).

La destruction des microorganismes

Il existe une polémique à propos du pouvoir bactéricide des ammoniums quaternaires insolubles. Pour ISQUITH (1972), le pouvoir désinfectant ne fait aucun doute, il n'est pas dû à un faible relargage de composés antiseptiques, mais bien à un contact entre bactérie et surface solide "autostérile". NAKAGAWA (1984b) entretient une polémique : selon lui, les ammoniums quaternaires ne font qu'adsorber les cellules sans les tuer. Les deux auteurs n'ont malheureusement pas employé les mêmes méthodes. ISQUITH a déterminé le pouvoir bactéricide par une technique proche de la nôtre, en utilisant le milieu lécithine-tween. Les essais ont été faits sur du verre poreux traité avec un ammonium quaternaire organosiliconé. NAKAGAWA base son affirmation après avoir étudié des résines traitées par des dérivés pyridiniques quaternaires, dont on connaît le pouvoir antiseptique intense à l'état soluble. Il est parvenu à récupérer des cellules vivantes adsorbées sur la résine, en effectuant une filtration continue par de l'eau distillée.

Nos résultats sont en accord avec ceux d'ISQUITH (1972). Il est néanmoins possible que le milieu lécithine-tween détache les bactéries adsorbées en les tuant, parce qu'elles ont été fragilisées au contact avec les ammoniums quaternaires. Les travaux de QUISNO (1946), WILLIAMSON (1965) ou ENGLEBY (1970) relatifs à ce type de méthodes ont été effectués en effet avec des bactéries adsorbées sur des supports inertes.

On sait par ailleurs que les cellules bactériennes peuvent s'adsorber sur des ammoniums quaternaires insolubles non antiseptiques en continuant de se développer (HATTORI 1972). GUSTAFSSON (1983) a remarqué que des cellules de Cellulomonas sp., traitées par l'Aliquat (trialkylméthyl ammonium de faible poids moléculaire), s'adsorbaient mieux sur le coton sans affecter leur viabilité. Nous estimons pour notre part que les résines de NAKAGAWA ont pu être inactivées plus rapidement qu'il ne le pense (phénomène de "masquage" des sites actifs). Les bactéries survivantes ont pu se développer rapidement. Il se peut également que la résine ne soit pas suffisamment puissante. NAKAGAWA (1984c) a en effet, par sa méthode, expérimenté des verres poreux traités en trouvant cette fois-ci une activité bactéricide (les cellules désorbées étaient mortes). Les méthodes consistant à recouvrir les surfaces traitées par une gélose nutritive (BELLINGER 1967, LASHEN 1971, CZERKOWICZ 1977) pour évaluer la quantité de germes revivifiables, peuvent apporter une solution à ce problème (savoir si les bactéries sont vivantes ou mortes). Nous avons essayé la méthode de LASHEN (1971) sur nos biotextiles : les bactéries sont effectivement inhibées. Les expérimentations sur le mode d'action ont montré enfin les lésions graves subies par les bactéries au contact avec les ammoniums quaternaires fixés.

L'accessibilité des sites actifs

Elle est incontestablement très importante pour favoriser le contact bactérie-désinfectant. Pour notre part, nous avons mis en évidence le rôle de l'hydrophilie du coton, qui permet des activités plus importantes. Cette observation doit être rapprochée des essais effectués en présence d'agents mouillants non-ioniques (tween 80 et triton X-100), qui ont favorisé la pénétration des inoculums entre les fibres textiles.

L'hydrophilité est cependant défavorable à certaines utilisations : nous l'avons vu, en particulier, avec les essais de filtration d'aérosol. Une cellulose imbibée d'eau facilite le transit des bactéries, de sorte que le pouvoir antiseptique n'a pas le temps de se manifester. Ainsi BALDWIN (1984a 1984b) propose deux types de biotextiles traités avec des ammoniums quaternaires organosiliconés insolubilisés dans une résine thermosensible : le premier (BALDWIN 1984a), très hydrophile, est recommandé pour éliminer rapidement les bactéries qui entrent en contact avec le tissu pour limiter les risques de contaminations par un tissu souillé ; le second biotextile (BALDWIN 1984b) est très hydrophobe, pour tout à la fois limiter la propagation des germes infectieux et les inhiber.

La rémanence du pouvoir antiseptique

Les biomatériaux où les ammoniums quaternaires sont fixés par liaisons de covalence ou électrostatiques fortes résistent bien aux lavages et ne relarguent pas de produits désinfectants. Nous ne parlerons pas ici des problèmes causés par les lavages avec des détergents anioniques. Ces problèmes sont spécifiques aux textiles et seront abordés dans la partie confidentielle.

Les résines thermosensibles peuvent subir 720 lavages à l'eau claire sans que soit altéré leur pouvoir antiseptique (MUNE 1979). NAKAGAWA ne constate aucun relargage d'ammoniums quaternaires fixés sur des résines par interactions électrostatiques fortes (1979a et 1979b) ou par covalence (1984a). Les mêmes observations sont faites avec des verres poreux traités (ISQUITH 1972, NAKAGAWA 1984c, ISE 1985). Nous avons montré à plusieurs reprises l'absence de tout relargage par nos biotextiles. Des essais de lavages à grande eau ont également montré une érosion très faible de l'apprêt antimicrobien (voir partie confidentielle).

Inactivation des biotextiles et action en présence de matières organiques

Les deux problèmes sont liés. Les ammoniums quaternaires fixés sont actifs sur les microorganismes parce qu'ils réagissent avec la matière organique des cellules. NAKAGAWA (1984a et 1984b) a constaté que les résines quaternisées sont plus ou moins rapidement saturées au fur et à mesure que les contacts bactéries-ammoniums quaternaires se multiplient.

La présence de sérum albumine bovine diminue également leur activité. La nature des substances inactivantes peut être déduite par la façon dont on récupère l'activité antiseptique.

En effet, l'inactivation des ammoniums quaternaires n'est pas irréversible. En général, un lavage à l'éthanol suffit à régénérer les ammoniums quaternaires fixés. En l'occurrence, nos travaux corroborent ceux de NAKAGAWA (1984a et 1984c). Ainsi, les substances inactivantes sont plutôt adsorbées par interactions hydrophobiques ; il s'agit probablement de substances lipidiques et de protéines de haut poids moléculaire. NAKAGAWA (1984c) a indiqué par ailleurs que les résines étaient beaucoup plus difficiles à régénérer que le verre poreux. Les interactions seraient donc plus importantes - peut-être de nature électrostatique - dans le premier cas (pour des raisons inexplicables).

D'après cette observation, NAKAGAWA suppose que le verre poreux traité a une activité plus bactéricide que la résine, parce qu'il autoriserait des contacts répétés entre bactéries et désinfectants. Il faudrait en effet plusieurs chocs entre cellules et biomatériaux pour obtenir un effet germicide. La résine ne permettrait pas ces contacts successifs en retenant trop fortement les bactéries. Nous sommes d'accord avec cette hypothèse, en nous appuyant sur nos observations de microscopie électronique où, de toute évidence, nous avons vu que les bactéries subissent de nombreuses lésions (aspect granuleux).

Le mode d'action des ammoniums quaternaires fixés

Certaines indications montrent qu'il est fort proche de celui des ammoniums quaternaires solubles. Ces derniers sont toujours plus actifs sur les bactéries à Gram positif que sur les bactéries à Gram négatif (NAKAGAWA 1979b, ISQUITH 1983, BALDWIN 1984a, IKEDA 1985). Nous l'avons aussi constaté. Il en est de même en ce qui concerne leur activité supérieure à température élevée (40-50°C) ou leur inactivation par les matières organiques.

Certaines différences existent toutefois. Les levures sont anormalement résistantes aux produits insolubles. Nous l'avons constaté avec Candida albicans, comme NAKAGAWA (1979a) avec Hansenula anomala. Nous avons également observé que des temps d'incubation plus longs sont nécessaires à leur élimination.

Ce phénomène serait dû à la taille plus grande des cellules , ce qui nécessiterait des contacts plus nombreux avec les biomatériaux. L'hypothèse des "chocs successifs" se trouve renforcée. Cette hypothèse peut d'ailleurs expliquer la lenteur d'action des ammoniums quaternaires fixés. Il faut 24 heures à 200 µg de sel 6 fixé pour éliminer 10⁶ u.f.c. de Staphylococcus aureus , 30 minutes suffisent pour une quantité identique de sel 6 soluble. Les désinfectants insolubles d'ISQUITH (1983) ont des temps d'action moyen de 3 jours.

Les ammoniums quaternaires fixés sont peu sensibles aux variations de pH. Ce dernier paramètre agit normalement sur la solubilité des ammoniums quaternaires (KOSTENBAUDER 1977). Cet effet supprimé (solubilité), les produits fixés en sont moins tributaires. L'étude du mode d'action des ammoniums quaternaires fixés constitue une simplification puisque l'on supprime ainsi les effets dus à la tensio-activité et à solubilité des produits. La non-mobilité et surtout l'absence de pouvoirs tensioactifs, sont probablement en partie responsables de la moindre efficacité des désinfectants insolubles. Mais cela prouve surtout que les phénomènes de tensio-activité ne sont pas le moteur principal du pouvoir antiseptique des détergents cationiques, contrairement à ce qu'ont pu affirmer certains auteurs dont CELLA (1952). Les phénomènes de tensions de surface doivent notamment favoriser les contacts bactéries-désinfectants.

Les cibles des ammoniums quaternaires se situent incontestablement au niveau des membranes cellulaires. Ainsi les ammoniums quaternaires n'ont pas besoin de pénétrer dans les cellules microbiennes pour agir efficacement. Cette hypothèse formulée par NEWTON en 1958 a été ainsi confirmée par ISQUITH (1972), JANAVER (1981) et nous-mêmes. Nous avons mis en évidence les perturbations causées aux fonctions membranaires et les lésions occasionnées aux parois bactériennes. Les expérimentations menées avec Pseudomonas aeruginosa et les essais menés avec les ions divalents d'une part et les ions accompagnateurs d'autre part, indiquent que les lipides (phospholipides, LPS) et les protéines membranaires sont les cibles des ammoniums quaternaires. Leur action est probablement multiple : ils fragilisent les parois et provoquent la perte de constituants cellulaires en "capturant" les composants essentiels des membranes. Certains phospholipides sont indispensables à la survie de Escherichia coli (PIERRUCCI 1985).

Le biotextile : une surface "autostérile"

Les biomatériaux traités aux ammoniums quaternaires correspondent parfaitement à la notion de surface "autostérile" définie par HOFFMAN (1955) : les bactéries sont tuées lors du contact avec un solide. Nous avons vu que, fort probablement, plusieurs chocs successifs sont nécessaires. Par conséquent, plus il existe de sites actifs ou de produits fixés, plus les chocs sont nombreux et théoriquement plus la surface est "autostérile". C'est effectivement ce qu'observent NAKAGAWA (1983, 1984a) et ISQUITH (1972). Nous observons un effet similaire entre 1 et 30 g de sel 6 fixé par kg de coton. Il semble que la baisse du pouvoir antiseptique observée avec les tissus chargés à 50 g/kg, soit due à un effet de surface qui empêche le contact bactérie-fibre, probablement parce que les tissus très chargés sont plus hydrophobes.

Le contact des bactéries avec un solide de charge électrostatique positive peut donner lieu à des effets de surface dont on peut difficilement estimer l'influence sur le pouvoir antimicrobien. Les ammoniums quaternaires sont des antistatiques ; ils diminuent, par exemple, les effets électrostatiques de friction (HERSH 1981). A l'interface solide-liquide, il se développe, selon SPEIER (1981), des charges électrostatiques importantes, qui dépendent du pH et de la nature du solide. Il se forme ainsi à la surface des solides traités aux ammoniums quaternaires, une zone où la concentration en ions est très importante. Les bactéries pourraient être tuées rapidement par dépolarisation brutale de leurs membranes, au contact avec cette zone. Cette hypothèse reste à prouver.

Les ions accompagnateurs qui neutralisent les charges électrostatiques des solides, jouent un rôle primordial. KOSTENBAUDER (1977) l'avait déjà remarqué en étudiant des dérivés solides du paraben. Si l'affinité du contre-ion est trop importante pour le désinfectant, l'activité antiseptique de ce dernier peut difficilement se manifester, car il n'y a pas d'interactions avec les cellules microbiennes. Il s'agit véritablement d'un phénomène d'échanges d'ions que nous avons mis en évidence.

Les molécules fortement adsorbées (lipides, protéines, détergents anioniques) neutralisent l'action bactéricide, en donnant lieu au phénomène de "masquage" des sites actifs. De même certaines substances, très affines pour les ammoniums quaternaires, entrent en compétition avec les cellules bactériennes pour l'occupation des sites actifs.

Les températures élevées augmentent l'action des surfaces "autostériles", en favorisant l'adsorption des cellules au niveau des désinfectants. Nous avons vu que les basses températures (5°C) provoquent la disparition quasi-totale du pouvoir antiseptique. Selon KOURAI (1985a), plus l'ammonium quaternaire est actif et plus l'énergie d'activation de la réaction d'adsorption entre le désinfectant et la cellule bactérienne, est importante. A basse température, il n'y aurait pas de contact entre ammoniums quaternaires et bactéries. En outre à 5°C, il n'y a plus de divisions cellulaires : il serait, peut-être, intéressant de voir si c'est au moment de leur division que les cellules sont les plus sensibles aux ammoniums quaternaires fixés.

Un biotextile à bioactivité fixe

Le textile à activité antimicrobienne, que nous avons étudié, correspond pratiquement au textile à bioactivité fixe défini par CHATELIN (1983). Le grand avantage de ce type de textile est sa résistance importante aux cycles de lavages. GAGLIARDI (1962) estimait que des textiles antimicrobiens utilisant des produits actifs fixés par liaisons de covalence, ne puissent posséder qu'un pouvoir plus que bactériostatique. Il avait cependant prévu que de tels biotextiles devaient présenter un risque toxicologique faible. La raison essentielle en est que les produits actifs ne peuvent pas être absorbés par voie dermale. ISQUITH (1983) estime même que l'ingestion par voie orale d'ammoniums quaternaires insolubles présente un risque d'intoxication nettement plus faible que les composés solubles (estimation non chiffrée par l'auteur). Nous avons pu constater que des souris pouvaient ingérer le biotextile sans troubles apparents, après trois semaines.

Perspectives

D'un point de vue technique, il convient actuellement de terminer les essais "pilotes" pour pouvoir accéder à l'échelon industriel.

Dès lors, nous pourrions disposer du biotextile dans sa version définitive. Un certain nombre d'expérimentations pourront ainsi être entreprises :

De nouveaux tests toxicologiques sont indispensables, notamment parce certains paramètres de fabrication ont changé et qu'il faut vérifier qu'aucun résidu de traitement toxique ne subsiste au niveau du textile.

Une étude plus approfondie du spectre d'activité antimicrobienne, pourra être envisagée en testant d'autres organismes :

- Les Mycobactéries et notamment Mycobacterium tuberculosis, qui est très résistant aux ammoniums quaternaires, et Mycobacterium smegmatis, qui est une souche officielle des normes françaises d'évaluation du pouvoir antiseptique (AFNOR 1977a).

- Les bactéries anaérobies

- Différentes souches d' Escherichia coli pathogènes et des souches multirésistantes de diverses bactéries. Il serait notamment intéressant d'étudier toutes les souches de Staphylococcus aureus portant un plasmide de résistance aux ammoniums quaternaires (GILLESPIE 1985 et 1986). D'éventuelles résistances croisées avec le biotextile pourraient être recherchées.

- Les souches pathogènes des animaux domestiques pour d'éventuelles applications vétérinaires

- Des protozoaires pathogènes dont on sait qu'ils sont sensibles aux ammoniums quaternaires (LAWRENCE 1970).

- Des algues (Chlorella vulgaris par exemple), qui pourraient être éliminées sans additifs dans l'eau. De même, les microorganismes responsables du colmatage des réseaux de drainage ou des systèmes de refroidissement (RUCKA 1983), peuvent également être testés.

- Les bactéries cellulolytiques n'ont pas non plus été testées dans cette étude.

Il existe, par ailleurs, d'autres techniques normalisées pour déterminer la résistance des tissus aux agents cellulolytiques comme la méthode par enfouissement (AFNOR 1971b) ou exposition en chambre tropicale (AFNOR 1971c). Ces deux normes complètent celle que nous avons utilisée (norme NF X 41-600, AFNOR 1971a).

Il serait intéressant de rechercher des méthodes plus rapides pour tester l'activité antimicrobienne. Il faudra, en effet, vérifier régulièrement la qualité des biotextiles, si une production industrielle est entreprise.

Des essais en vraie grandeur pourront surtout être entrepris dans des hopitaux d'un point vue épidémiologique ou pour tester le pouvoir antiseptique dans des conditions réelles d'emploi. A cette occasion une étude de l'activité in-vivo du biotextile sera possible. Nous ne connaissons pas, en particulier, l'impact du biotextile sur la flore cutanée : des modifications qualitatives et quantitatives de sa composition, doivent intervenir. Il existe des méthodes d'investigations éprouvées dans ce domaine (WILLIAMSON 1965, ENGLELY 1970). Des techniques récentes comme celle de BOURLIOUX (1983) sont également applicables.

Au niveau de la recherche du mode d'action, des travaux peuvent encore être entrepris. Il conviendrait, par exemple, de vérifier les résultats obtenus avec les essais de relargage du phosphore inorganique. D'autres constituants cellulaires peuvent être détectés (K^+ , PO_4^{2-} , acides aminés). Il serait notamment intéressant d'utiliser des produits radiomarqués. Nous pourrions ainsi effectuer les essais de relargage avec les inoculums servant aux tests d'efficacité antiseptique, plutôt que d'utiliser des "purées cellulaires". Des protoplastes de bactéries permettraient probablement l'observation de cinétiques de relargage plus précises. La bioluminescence est également un outil pratique d'étude des propriétés membranaires (WETTERMARK 1980).

BIBLIOGRAPHIE

A. A. T. C. C. (1975)

"Evaluation of antibacterial finishes on fabrics"
American Association of Textile Chemists and Colorists,
A. A. T. C. C. technical manual, Norme CTM-0829

AFNOR (1971a)

"Essais de résistance aux microorganismes des textiles
cellulosiques : méthode par ensemencement mixte (spores et
mycélium)"
Association Française de Normalisation, Norme NF X 41-600

AFNOR (1971b)

"Essais de résistance aux microorganismes des textiles
cellulosiques : méthode par enfouissement"
Association Française de Normalisation, Norme NF X 41-601

AFNOR (1971c)

"Essais de résistance aux microorganismes des textiles
cellulosiques : exposition en chambre tropicale"
Association Française de Normalisation, Norme NF X 41-602

AFNOR (1977a)

"Antiseptiques et désinfectants utilisés à l'état liquide,
miscibles à l'eau et neutralisables : détermination de
l'activité bactéricide en présence de substances
interférentes définies"
Association Française de Normalisation, Norme NF T 72-160

AFNOR (1977b)

"Désinfectants utilisés à l'état liquide, miscibles à
l'eau ou à un solvant : détermination de l'activité anti-
bactérienne pour la décontamination des surfaces (méthode
des portes germes)"
Association Française de Normalisation, Norme NF T 72-161

AFNOR (1981)

"Antiseptiques et désinfectants"
Association Française de Normalisation, PARIS

AFNOR (1982)

"Gélatine alimentaire, spécifications"
Association Française de Normalisation, Norme NF V 59-001

AHONKHAI, I.; RUSSELL, A.D. (1979)

"Response of RP1⁺ and RP1⁻ strains of Escherichia coli to antibacterial agents and transfert of resistance to Pseudomonas aeruginosa "
Current Microbiol., 3 , 89-94

AHONKHAI, I.; PUGH, W.J.; RUSSELL, A.D. (1984)

"Sensitivity to antimicrobial agents of some mercury-sensitive and mercury-resistant strains of Gram-negative bacteria"
Current Microbiol., 11 , 183-186

AL-ANI, F.Y.; AL-SHIBI, A.S. (1985)

" In-vitro pyocin activity of Pseudomonas aeruginosa strains pretreated with antibiotics"
Folia Microbiol., 30 , 349-352

AL-HITI, M.M.A.; GILBERT, P. (1980)

"Changes in preservative sensitivity for the USP anti-microbial agents effectiveness test micro-organisms"
J. Appl. Bacteriol., 49 , 119-126

ALLEN, N.E. (1985)

"Non classical targets for antibacterial agents"
Annu. Rep. Med. chem., 20 , 155-162

ANACKER, B.W. (1970)

"Micelle formation of cationic surfactants in aqueous media"
in E. Jungermann (ed.) "cationic surfactants", Marcel Dekker Inc., NEW YORK, 203-288

ANDERS, B.; WIEDEMANN, B. (1985)

"Reduktion der Konservierungsmittelkonzentration durch bakterielle Kontamination"
Acta Pharm. Technol., 31 , 34-37

A.O.A.C. (1970)

"Official methods of analysis"
Association of Official Analytical Chemists, W. Horwitz (ed.), P. Chichilo and H. Reynolds (ass. ed.), 11th ed.

A.P.H.A. (1980)

"Standard methods for the examination of water and wastewater"
American Public Health Association, 15th ed., WASHINGTON DC

ARMSTRONG, J.A.; FROELICH, E.J. (1964)

"Inactivation of viruses by benzalkonium chloride"
Appl. Microbiol., 12 , 132-137

BALDWIN, A.F. (1984a)

"Process for making absorbent bioactive wettable medical fabric"
Brevet U.S. 4.425.372, 10 Jan. 1984, 7pp.

BALDWIN, A.F. (1984b)

"Bioactive water- and alcohol-repellant medical fabric"
Brevet U.S. 4.467.013, 21 Août 1984, 4pp.

BARRY, S. (1978)

"Comparative field and laboratory testing of fungicidal emulsion paints for interior use"
In T.A. Oxley, G. Becker, D. Allsop (eds), Proc. Int. Biodeterior. Symp., 4th 1978 (pub. 1980), Pitman Publ., LONDON, 345-351

BECKERS, B.; LANG, H.R.M.; SCHIMKE, D.; LAMMERS, A. (1985)

"Evaluation of a bioluminescence assay for rapid antimicrobial susceptibility testing of Mycobacteria"
Eur. J. Clin. Microbiol., 4 , 556-561

BELLINGER, H. (1967)

"Über den Nachweis antibakterieller Eigenschaften speziell ausgerüsteter Textilien"
Melliand Textilberichte, 5 , 576-580

BENEDETTO, J.P.; BRUNETTEAU, M.; MICHEL, G. (1976)

"Etude du polysaccharide de Escherichia coli K12 CR34"
Eur. J. Biochem., 63 , 313-320



BIZOT, H.; MULTON, J.L. (1978)

"Méthode de référence pour la mesure de l'activité de l'eau dans les produits alimentaires"
Ann. Technol. Agric., 27 , 441-449

BLASKO, K.; SCHAGINA, L.V.; MALEV, V.V.; SUGAR, I.P.; GYÖGYI, S. (1984)

"Comparative studies on prymicin and gramicidin induced cation transport changes in human erythrocytes"
Acta Biochim. Biophys. Acad. Sci. Hung., 19 , 289-298

- BLUM, R.; UEBERSCHAER, K. (1985)
"Laundry post-treatment agent"
Brevet allemand DD 222.893, 29 Mai 1985, 7 pp.
- BLOWERS, R.; WALLACE, K.R. (1955)
"The sterilization of blankets with cetyl trimethylamine bromide"
Lancet, 268 , 1250-1253
- BOURLIOUX, P.; BARC, M.C.; GERMAN, A. (1983)
"Evaluation de l'activité bactéricide des antiseptiques sur la flore cutanée de la souris Hairless holoxénique"
Ann. Microbiol., 134 A , 115-124
- BOURLIOUX, P.; BARC, M.C.; DELAGE, C.; RAGUENEAU, F.; GERMAN, A. (1985)
"Implantation digestive et cutanée de Staphylococcus aureus , Pseudomonas aeruginosa et Corynebacterium xerosis chez la souris Hairless axénique"
Ann. Inst. Pasteur/mic., 136 B , 93-97
- BROOKS, R.W.; GEORGE, K.L.; PARKER, B.C.; FALKINHAM, J.O.; GRUFT, H. (1984)
"Recovery and survival of non-tuberculous mycobacteria under various growth and decontamination conditions"
Can. J. Microbiol., 30 , 1112-1117
- BROWN, M.R.W.; RICHARDS, R.M.E. (1965)
"Effect of Ethylene Diamine TetraAcetate on the resistance of Pseudomonas aeruginosa to antibacterial agents"
Nature (London), 207 , 1391-1393
- BROWN, M.R.W. (1971)
"Inhibition and destruction of Pseudomonas aeruginosa by quaternary ammonium compounds"
In W.B. Hugo (ed.) "The inhibition and destruction of the microbial cell", Academic Press, LONDON, 343-345
- CALDWELL, D.; COX, W.A.; D'ARCY, P.F.; ROWE, L.R. (1961)
"The antibacterial activity of new derivatives of 4-aminoquinoline and 4-aminoquinoline"
J. Pharm. Pharmacol., 13 , 554-64
- CANN, A. (1982)
"Surfactant and detergents systems"
In K. Othmer (ed.) "Encyclopedia of chemical technology", 3d ed., Wiley-Interscience, 22 , 332-342

- CELLA, J.A.; EGGENBERGER, D.M.; NOEL, D.R.; HARRIMAN, L.D.; HARWOOD, H.J. (1952)
"The relation of structure and critical concentration of the bactericidal activity of quaternary ammonium salts"
J. Am. Chem. Soc., 74 , 2061-2062
- CHAPLIN, C.E. (1952a)
"Cytological changes in Bacillus species in stasis and death caused by quaternary ammonium compounds"
J. Bacteriol., 64 , 805-810
- CHAPLIN, C.E. (1952b)
"Bacterial resistance to quaternary ammonium compounds"
J. Bacteriol., 63 , 453-458
- CHATELIN, R. (1983)
"Le greffage : voie d'accès à des textiles supports d'une activité biologique"
in "Aspects médicaux et biophysiques des vêtements de protection", Actes de la conférence internationale, 4-8 Juillet 1983, LYON-BRON, 108-118
- CULLER, M.D.; BITMAN, J.; THOMSON, M.J.; ROBBINS, W.E.; DUTKY, S.R. (1979)
"In vitro antimicrobial activity of alkylamines against mastitic bacteria"
J. Dairy Sci., 62 , 584-595
- CUTLER, R.A.; DROBECK, H.P. (1970)
"Toxicology of cationic surfactants"
in E. Jungermann (ed.) "Cationic surfactants", Marcel Dekker Inc., NEW-YORK, 527-616
- CURTIS, N.A.C.; RICHMOND, M.H. (1974)
"Effect of R-factor-mediated genes on some surface properties of Escherichia coli "
Antimic. Agents Chemother., 6 , 666-671
- CZERKOWICZ, T.J. (1977)
"Methods of testing fungicides"
In S.S. Block (ed) "Disinfection, sterilization and preservation", Lea & Febiger, PHILADELPHIA, 135-147

DAMODARAN, M.; SIVARAMAN, C. (1953)

"The germicidal activity of some pyridinium salts containing unsaturated hydrocarbon radicals"

J. Bacteriol., 65 , 89-91

DANIELS, R.; RUPPRECHT, H. (1985)

"Adsorption and chemical stability of a cationic aggregating ester-propantheline bromide on Silica surfaces in aqueous dispersions"

Pharm. Res., 4 , 170-175

DANNA, G.F.; VIGO, T.L.; WELCH, C.M. (1978)

"Permox-A hydrogen peroxyde-zinc acetate antibacterial finish for cotton"

Text. Res. J., 48 , 173-177

D' ARCY, P.F. (1971)

"Inhibition and destruction of moulds and yeast : IV - Quaternary ammonium salts"

in W.B. Hugo (ed.) "The inhibition and destruction of the microbial cell", Academic Press, LONDON, 636-645

DAVID, J.; BARR, A.R.M. (1972)

"Textiles and microorganisms"

Text. Inst. Ind., 10 , 173-176

DAVIES, J.E.; ROWD, R. (1972)

"transmissible multiple drug resistance in Enterobacteriaceae "

Science, 176 , 758-768

DEAN-RAYMOND, D.; ALEXANDER, M. (1977)

"Bacterial metabolism of quaternary ammonium compounds"

Appl. Environ. Microbiol., 33 , 1037-1041

DERVICHIAN, D.G. (1979)

"Agents de surface, émulsionnants, moussants, mouillants"

Collection Techniques de l'ingénieur, volume "Mesures et analyses", module P 635

DIFCO (1984)

"Difco manual, tenth edition"

DOMAGK, G. (1935)

"Eine neue Klasse von Desinfektionsmitteln"

Dtsch. Med. Wschr., 61 , 829-832

EAGON, R.G. (1984)

"The resistance characteristics of Pseudomonas "
Dev. Ind. Microbiol., 25 , 337-48

EL-FALAHA, B.M.A.; RUSSEL, A.D.; FURR, J.R. (1983)

"sensitivities of wild-type and envelope-defective strains
of Escherichia coli and Pseudomonas aeruginosa to
antibacterial agents"
Microbios, 38 , 99-105

ENGBLY, F.; DEY, E. (1970)

"Proceeding of the Chemical Specialities Manufacturing
Association"
F. Engley & E. Dey (eds), C.S.M.A., Mid-year meeting

ERIKSSON, R.; HOLME, T. (1973)

"The use of microcalorimetry as an analytical tool for
microbial processes"
In B. Sikyta; A. Prokov & M. Novak (eds.) "Advances in
microbial engineering", Biotechnol. Bioeng. Symp., no 4,
Wiley-Interscience, NEW YORK, 581-590

EUDY, W.W. (1981)

"Organosilicon quaternary ammonium antimicrobial
compounds"
Brevet U.S. 4.282.366, 04 Aout 1981, 4pp.

FERGUSON, J. (1939)

"Use of chemical potenciales as indexes of toxicity"
Proc. Roy. Soc. (London), 127 B , 387-404

FEW, A.V.; OTTEWILL, R.; PERREIRA, H.C. (1955)

"Interaction between bovine plasma albumin and dodecyl-
trimethylammonium bromide"
Biochem. Biophys. Acta, 18 , 136-137

FISHER, R.; LAROSE, P. (1952)

"Factors governing the adaptation of bacteria against
quaternaries"
Nature (London), 170 , 715-716

FLECCHIA, P. (1985)

"Compositions thérapeutiques à base d' ADN de haut poids
moléculaire"
Brevet français FR 2.556.727, 21 Juin 1985, 8 pp.

FREKE, C.D.; HAGGIE, D. (1981)

"Improved bactericidal efficiency of an acidic quaternary ammonium compound with increasing temperature"

J. Food Prot., 44 , 699-700

FROSCH, Von F.; CONNERT, J. (1978)

"Untersuchungen zur Sensibilität von Mikroorganismen gegen Wirkstoffe in Halsschmerz-Lutschtabletten"

Dtsch. Apth. Ztg., 118 , 758-60

FRUCHART, A. (1974)

"Utilisation de sels de pyridinium pour la décontamination des prélèvements en vue de la recherche et de l'isolement des Mycobactéries"

Thèse de l'Université du Droit et de la Santé, Faculté de Pharmacie, LILLE

GAGLIARDI, D.D. (1962)

"Antibacterial finishes"

Proc. of A.A.T.C.C., Am. Dyestuff rep., 2 , 31-40

GALANOS, G.; LÜDERITZ, O.; WESTPHAL, O. (1969)

"A new method for the extractin of R lipopolysaccharides"

Eur. J. Biochem., 9 , 245-249

GEFTIC, S.G.; HEYMANN, H.; ADAIR, F.W. (1979)

"Fourteen-year survival of Pseudomonas cepacia in a salts solution preserved with benzalkonium chloride"

Appl. Environ. Microbiol., 37 , 505-510

GELINAS, P.; GOULET, J. (1982a)

"Influence de faibles concentrations de huit désinfectants sur l'activité d'un levain à Cheddar"

Le lait, 62 , 660-670

GELINAS, P.; GOULET, J. (1982b)

"Heat and light stability of height sanitizers"

J. Food Prot., 45 , 1195-1196

GELINAS, P.; GOULET, J. (1983a)

"Efficacité de huit désinfectants sur trois types de surface contaminées par Pseudomonas aeruginosa "

Can. J. Microbiol., 29 , 1715-1730

GELINAS, P.; GOULET, J. (1983b)

"Neutralization of the activity of height disinfectants by organic matter"

J. Appl. Bacteriol., 54 , 243-247

GELINAS, P.; GOULET, J.; TASTAYRE, G.M.; PICARD, G.A. (1984)

"Effect of temperature and contact time on the activity of height disinfectants : a classification"

J. Food Prot., 47 , 841-847

GERSTEIN, T. (1979)

"An introduction to quaternary ammonium compounds"

Cosmet. Toiletries, 94 , 32-41

GILBERT, P.; AL-TAAE, A. (1985)

"Antimicrobial activity of some alkyltrimethylammonium bromides"

Lett. Appl. Microbiol., 1 , 101-104

GILES, C.H.; Mc EWAN, T.H.; NAKHWA, S.N.; SMITH, D. (1960)

"Studies in adsorption. Part XI : A system of classification of solution adsorption isotherms and its use in diagnosis of adsorption mechanisms and in measurement of specific surface areas of solids"

J. Chem. Soc., 1960 , 3973-3993

GILLESPIE, M.T.; MAY, J.W.; SKURRAY, R.A. (1985)

"Antibiotic resistance in Staphylococcus aureus isolated at an Australia hospital between 1946 and 1981"

J. Med. Microbiol., 19 , 137-147

GILLESPIE, M.T.; MAY, J.W.; SKURRAY, R.A. (1986)

"Plasmid-encoded resistance to acriflavine and quaternary ammonium compounds in methicillin-resistant Staphylococcus aureus "

FEMS Microbiol. Lett., 34 , 47-51

GILSDORF, J.R.; FERRIERI, P. (1986)

"Susceptibility of phenotypic variants of Haemophilus influenzae type b to serum bactericidal activity : Relation to surface lipopolysaccharide"

J. Infect. Dis., 153 , 223-231

GINN, M.E. (1970)

"Adsorption of cationic surfactants on miscellaneous solid substrates"

In E. Jungermann (ed.) "Cationic surfactants", Marcel Dekker Inc., NEW-YORK, 369-386

GRECO, R.S.; TROOSKIN, S.Z.; DONETZ, A.P.; HARVEY, R.A. (1985)

"The application of antibiotic bonding to the treatment of established vascular prosthetic infection"

Arch. Surg., 120 , 71-75

GUMP, W. (1982)

"Disinfectants and antiseptics"

in K. Othmer (ed.) "Encyclopedia of chemical technology", 3d ed., Wiley-Interscience, 7 , 793-832

GUSTAFSSON, K.; NORKRANS, B. (1983)

"Interference of a quaternary amine in interfacial reactions at bacterial cellulolysis"

FEMS Microbiol. Lett., 16 , 235-239

HAMILTON, W.A. (1971)

"Membrane active antibacterial compounds : Mode of action of surface active compounds"

in W.B. Hugo (ed.) "The inhibition and destruction of the microbial cell", Academic Press, LONDON, 82-93

HARVEY, R.A.; GRECO, R.S. (1981)

"The non-covalent bonding of antibiotics to a polytetrafluoroethylene-benzalkonium graft"

Ann. Surg., 194 , 642-647

HATTORI, R. (1972)

"Growth of Escherichia coli on the surface of an anion exchange resin in continuous flow system"

J. Gen. Appl. Microbiol., 18 , 319-330

HELLMAN, H. (1984)

"Remobilisierung und Bestimmung von k-Tensiden in Tonmineralien"

Fresenius Z. Anal. Chem., 319 , 267-271

HERSH, S.P.; GRADY, P.L.; BHAT, G.R. (1981)

"Effect of internal and external tensides on the electrical properties of polymeric surfaces"
Pure Appl. Chem., 53 , 2123-2134

HOFFMAN, R.K.; YEAGER, S.B.; KAYES, S. (1955)

"A method of testing self-disinfecting surfaces"
Soap Chem. Spec., 31 , 135-138, 163, 165

HUBER, L. (1985)

"Stand der Kenntnisse über das ökologische Verhalten von Tensiden"
Müench. Beitr. Abwasser-, Fisch-, Flussbiol-, 39 , 189-208

HUECK, H.J.; ADEMA, D.M.M.; WIEGMANN, J.R. (1966)

"Bacteriostatic, fungistatic and algistatic activity of fatty nitrogen compounds"
Appl. Microbiol., 14 , 308-319

HUGBO, P.G. (1977)

"Additivity and synergism in vitro as displayed by mixtures of some commonly employed antibacterial preservatives"
Cosmet. Toiletries, 92 , 52, 55-56

HUGO, W.B. (1965)

"Some aspects of the action of cationic surface-active agents on microbial cells with special reference to their action on enzymes"
S.C.I. monograph. no 19 "Surface active agents in microbiology", Soc. Chem. Ind., LONDON, 62-82

HUGO, W.B. (1967)

"The mode of action of antibacterial agents"
J. Appl. Bacteriol., 30 , 17-50

HUGO, W.B. (1976)

"Survival of microbes exposed to chemical stress"
in T.R.G. Gray & J.R. Postgate (eds.) "The survival of vegetative microbes", 26th Symp. of the Soc. for Gen. Microbiol., Cambridge University Press, CAMBRIDGE, 383-413

HUGUES, D.E. (1949)

"Acceleration of bacterial decarboxylase and glutaminase by cetyltrimethylammonium bromide"
1st Intern. Congr. Biochem., CAMBRIDGE, 324-413

HURREN, A.; SLATER, K. (1983)

"Bacterial transfer through textile materials"

In "Aspects médicaux et biophysiques des vêtements de protection", Actes de la conférence internationale, 4-8 Juillet 1983, LYON-BRON, 97-102

HURST, V.; GROSSMAN, M.; INGRAM, F.R.; LOWE, A.E. (1958)

"Hospital laundry and refuse chutes as source of staphylococcal cross-infection"

J. Am. Med. Assoc., 167 , 1223-1229

IKEDA, T.; TAZUKE, S. (1983)

"Biologically active polycations : Antimicrobial activities of poly[triakyl(vinylbenzyl)ammonium chloride]-type polycations"

Makromol. Chem., 4 , 459-461

IKEDA, T.; TAZUKE, S. (1985)

"Biocidal polycations"

Polym. Prepr. (Am. Chem. Soc.), 26 , 226-227

INTERKEMIA V.G.T. (1985)

"Disinfectant preparation"

Brevet allemand DE 3.519.557, 05 dec. 1985, 17 pp.

INSTITUT PASTEUR PRODUCTION (1978)

"Milieux et réactifs de laboratoire Pasteur"

ISOARD, P.; BROS, H. (1983)

"Rôle des textiles et de l'habillement dans la prévention de la contamination"

in "Aspects médicaux et biophysiques des vêtements de protection", Actes de la conférence internationale, 4-8 Juillet 1983, LYON-BRON, 90-96

ISOMAA, B. (1981a)

"Interactions of surface-active alkyltrimethylammonium salts with cells and tissues"

Doctoral thesis, Åbo Akademi, FINLANDE

ISOMAA, B.; PAATERO, G. (1981b)

"Shape and volume changes in rat erythrocytes induced by surface-active alkyltrimethylammonium salts and sodium dodecyl sulfate"

Biochim. Biophys. Acta, 647 , 211-222

ISOMAA, B. (1984)

"Membrane-perturbing and lytic properties of surface-active alkyltrimethylammonium salts"

Ecol. Bull., 36 , 26-30

ISE CHEM. IND. (1985)

"Solid microbiocidal agents"

Brevet japonais JP 60.016.904, 28 Jan. 1985, 5 pp.

ISQUITH, A.J.; ABBOTT, E.A.; WALTERS, P.A. (1972)

"Surface-bonded antimicrobial activity of an organosilicon quaternary ammonium chloride"

Appl. Microbiol., 24 , 859-863

ISQUITH, A.J.; GETTINGS, R.L. (1983)

"Insoluble polymeric contact preservatives"

Eur. Pat. appl. EP 90.577, 05 Oct. 1983, 30pp.

JANAUER, G.E. (1981)

"Insoluble polymeric contact disinfectant : an alternative approach to water disinfection"

Chem. Water. Rinse, 1 , 501-521

JANDA, J.; WORK, E. (1971)

"A colorimetric estimation of lipopolysaccharides"

FEBS Letters, 16 , 343-345

JARRELL, K.; KROPINSKI, A.M. (1977)

"The chemical composition of the lipopolysaccharide from Pseudomonas aeruginosa strain PAO and a spontaneously derived mutant"

Microbios, 19 , 103-116

JOHNSTON, H.H.; MITCHELL, C.J.; CURTIS, G.D.W. (1976)

"An automated test for the detection of significant bacteriuria"

Lancet, 2 , 400-402

JOLY, J.P.; SAINGIER, J. (1981)

"Produits de traitement de polymères polyhydroxylés ou polyaminés ainsi que procédé utilisant ces produits"

Brevet français FR 2.511.001, 10 sept. 1981, 12 pp.

JOLY, J.P. (1982)

"Synthèse de sels d'ammonium quaternaire à motif epoxy-propyl. Application à la fonctionnalisation de la cellulose de coton"

Mémoire d'ingénieur C.N.A.M., Chimie industrielle, NANCY

JOURNAL OFFICIEL (1976a)

"Méthode officielle pour la détermination de l'Indice d'Irritation Primaire Cutanée"

J.O. du 21 avril 1976

JOURNAL OFFICIEL (1976b)

"Méthode officielle pour l'appréciation de l'agressivité superficielle cutanée par applications itératives"

J.O. du 21 avril 1976

JOURNAL OFFICIEL (1985)

"Constituants de produits destinés au nettoyage de matériels pouvant se trouver au contact des denrées alimentaires"

J.O. du 29 septembre 1985

JUNGERMANN, E. (1970)

"Cationic surfactants"

Marcel Dekker Inc., 1970, NEW-YORK, 630 pp.

KARAMANOS, I. (1983)

"Etude d'un lipopolysaccharide possédant une activité anti-inflammatoire extrait d'un lysat d'Enterobacter agglomerans"

Thèse de doctorat 3ème cycle en Biochimie, LILLE

KATSORCHIS, T.; LEGAKIS, N.J.; SHEARER, B.; GENMATA, V.; PATARYAS, H. (1985)

"Outer surface changes of Pseudomonas aeruginosa in relation to resistance to gentamicin and carbenicillin"

J. Med. Microbiol., 19, 375-381

KENWARD, M.A.; BROWN, M.R.W.; FRYER, J.J. (1979)

"The influence of Calcium or Manganese on the resistance to EDTA, polymyxin B or cold shock, and the composition of Pseudomonas aeruginosa grown in glucose- or Magnesium-depleted batch cultures"

J. Appl. Bacteriol., 47, 489-503

KEWELOH, H.; BAKKER, E.P. (1984a)

"Increased permeability and subsequent releasing of the host cell membrane early after infection of Escherichia coli with bacteriophage T1"

J. Bacteriol., 160 , 354-359

KEWELOH, H.; BAKKER, E.P. (1984b)

"Permeability changes in the cytoplasmic membrane of Escherichia coli K-12 early after infection with bacteriophage T1"

J. Bacteriol., 160 , 347-353

KHANAKA, H.; CATTEAU, M.; TAILLIEZ, R. (1981)

"Antibiotic sensitivity in Rhizobium and Agrobacterium "

Zbl. Bakt. Hyg., I Abt. Orig., C2 , 282-288

KINGET, R. (1985)

"Overzicht van de voornamste tensiden en emulgatoren gebruikt in farmaceutische en kosmetologische preparaten"

Farm. Tijdschr. Belg., 62 , 223-240

KITAHARA, A. (1970)

"Micelle formation of cationic surfactants in non-aqueous media"

In E. Jungermann (ed.) "Cationic surfactants", Marcel Dekker Inc., NEW-YORK, 289-310

KLARMANN, E.G.; WRIGHT, E.S.; SHTERNOV, V.A. (1953)

"Prolongation of antibacterial potential of disinfected surfaces"

Appl. Microbiol., 1 , 19-23

KNOX, W.E.; AUERBACH, V.H.; ZARUDNAYA, K.; SPIRTEs, M. (1949)

"The action of cationic detergents on bacteria and bacterial enzymes"

J. Bacteriol., 58 , 443-452

KOHJIN Co., Ltd. (1985)

"unsaturated quaternary ammonium salts"

Brevet japonais JP 60 54.343, 28 Mai 1985, 5 pp.

KOLOCOURIS, N.; COSTAKIS, E.; ROMOND, C.; DUBREUIL, L.; DEVOS, J.; CAZIN, M.; BRUNET, C.; CAZIN, J.C. (1981)

"Synthèse et étude pharmacologique de quelques amidines et sels d'ammoniums quaternaires dérivés de la pyrrolidine"

Ann. Pharm. Franç., 39 , 201-213

- KOŁODYNSKI, J.; ULASZEWSKI, S.; GROBELNY, D.; WITKOWSKA, R.; WITEK, S.; LACHOWICZ, T. (1984)
"Effect of some quaternary benzalkonium salts on physiology of yeast"
Acta Microbiol. Pol., 33 , 119-130
- KOSTENBAUDER, H.B. (1977)
"Physical factors influencing the activity of antimicrobial agents"
in S.S. Block (ed.) "Disinfection, sterilization and preservation", Lea & Febiger, PHILADELPHIA, 912-932
- KOTTES-ANDREWS, B.A.; DE GRUY, I.V. (1982)
"Cotton"
in K. Othmer (ed.) "Encyclopedia of chemical technology", 3d ed., Wiley Interscience, 7 , 176-195
- KOURAI, H.; TAKECHI, H., HORIE, T.; UCHIWA, N.; TAKEICHI, K.; SHIBAZAKI, I. (1985a)
"Antimicrobial characteristics and mode of action of N-alkylpyridinium iodides against Escherichia coli K-12"
J. Antibact. Antifung. Agents, 13 , 3-10
- KOURAI, H.; TAKECHI, H.; HORIE, T.; TAKEICHI, K.; SHIBAZAKI, I. (1985b)
"The antimicrobial characteristics of quaternary ammonium salts: Quantitative structure-activity relationship of antimicrobial N-laurylpyridinium"
J. Antibact. Antifung. Agents, 13 , 245-253
- KRAMER, V.C.; NICKERSON, K.W.; HAMLETT, N.V.; O'HARA, C. (1984)
"Prevalence of extreme detergent resistance among the Enterobacteriaceae "
Can. J. Microbiol., 30 , 711-713
- KROPINSKY A.M.B.; CHADWICK, J.S. (1976)
"The pathogenicity of rough strain of Pseudomonas aeruginosa for Galleria mellonella "
Can. J. Microbiol., 21 , 2084-2088
- KROPINSKI, A.M.B.; CHAN, L.; MILAZZO, F.H. (1978)
"Susceptibility of lipopolysaccharide-defective mutants of Pseudomonas aeruginosa strain PAO to dyes, detergents and antibiotics"
Antimicrob. Agents Chemother., 13 , 494-499

- KROPINSKI, A.M.B.; KUZIO, J.; ANGUS, B.L.; HANCOCK, R.E.W.
(1982)
"Chemical and chromatographic analysis of lipopoly-
saccharide from an antibiotic-supersusceptible mutant of
Pseudomonas aeruginosa "
Antimicrob. Agents Chemother., 21 , 310-319
- KUCHARSKI, S.; PERNAK, J.; KRYSINSKI, J. (1980)
"Wirkung neuer quatärer Ammoniumverbindungen gegen aus-
gewählte Bakterien- und Pilzstämmen"
Pharmazie, 35 , 644-646
- KUCZERA, J.; JANAS, T.; PRZESTALSKI, S.; WITEK, S.;
OSWIECIMSKA, M. (1985)
"Influence of some amphiphilic derivatives of glycine
esters on sulfate ion transport across lecithin liposome
membrane"
Stud. Biophys., 105 , 167-176
- KULL, F.C.; EISMAN, P.C.; SYLWESTROWICZ, M.D.; MAYER, R.L.
(1961)
"Mixtures of quaternary ammonium compounds and long-chain
fatty acids as antifungal agents"
Appl. Microbiol., 9 , 538-541
- LAMBERT, P.A.; HAMMOND, S.M. (1973)
"Potassium fluxes : First indications of membrane damage
in microorganisms"
Biochem. Biophys. Res. Commun., 54 , 796-799
- LASHEN, E.S. (1971)
"New method for evaluating antibacterial activity directly
on fabric"
Appl. Microbiol., 21 , 771-773
- LAW, A.B. (1979)
"Synergistic microbiocidal compositions"
Brevet U.S. 4.173.643, 06 Nov. 1979, 11 pp.
- LAWRENCE, C.A. (1970)
"Germicidal properties of cationic surfactants"
in E. Jungermann (Ed.) "Cationic surfactants", Marcel
Dekker Inc., NEW-YORK, 491-526

- LEAL, J.S.; ANGUERA, S.; COMELLES, F.; DOMINGUEZ, J.J.G.;
PARRA, J.L. (1983)
"Interactions between ionic surfactants and wool"
J. Text. Inst., 4 , 196-203
- LETOURNEAU, L.; SAINT-ONGE, C. (1980)
"Les antiseptiques, partie -1-"
Techn. Biol., 6 , 341-347
- LETOURNEAU, L.; SAINT-ONGE, C. (1981)
"Les antiseptiques, partie -2-"
Techn. Biol., 1 , 33-40
- LINFIELD, W.M.; EDWARDS, B.E. (1970)
"Miscellaneous non-nitrogen-containing cationic surfactants"
in E. Jungermann (ed.) "Cationic surfactants", Marcel
Dekker Inc., NEW-YORK, 191-199
- LION CORP. (1985)
"Fabric softeners"
Brevet japonais JP 60 45.685, 12 mars 1985, 5 pp.
- LONCIN, M. (1986)
"Aktuelle Entwicklungen auf dem Gebiet der Reinigung und
Desinfektion in der Lebensmittel-Industrie"
Chem. -Ing. -tech., 58 , 108-114
- LONDON, C.J.; GRIFFITH, I.P. (1983)
"The presence in the fleece of Pseudomonads able to
degrade wool-based substrates"
J. Text. Inst., 4 , 303-304
- LONGLEY, K. (1970)
"Polymeric cationic surfactants"
in E. Jungermann (ed.) "Cationic surfactants", Marcel
Dekker Inc., NEW-YORK, 179-189
- LOUNATMAA, K.; MÄKELÄ, P.H.; SARVAS, M. (1976)
"Effect of polymyxin on the ultrastructure of the outer-
membrane of wild-type and polymyxin-resistant strains of
Salmonella "
J. Bacteriol., 127 , 1400-1407
- LURIA, S.E.; BURROUS, J.W. (1957)
"Hybridization between Escherichia coli and Shigella "
J. Bacteriol., 74 , 461-476

Mc CULLOCH, E.C. (1947)

"False disinfection velocity curves produced by quaternary ammonium salts"

Science, 105 , 480-481

Mc LAREN, J.A.; Mc DERMOTT, J.A. (1984)

"Some effects of the sorption of cationic surfactants by wool"

J. Text. Inst., 6 , 416-423

Mc NEIL, E. (1961)

"Detection and evaluation of antibacterial activity of treated fabrics"

Proc. of A.A.T.C.C., Am. Dyestuff Rep., 2 , 26-29

Mc NEIL, E.; BLANFORD, J.M.; CHOPER, E.A.; GRAHAM, R.T.; HOAK, F.C.; OLIVA, E.C.; SMITH, J.C. (1963)

"The role of bacteria in the development of perspiration odor on fabrics"

Proc. of A.A.T.C.C., Am. Dyestuff Rep., 3 , 87-90

Mc QUILLEN, K. (1950)

"The bacterial surface I. Effect of cetyltrimethylammonium compound on the electrophoretic mobility of certain Gram-positive bacteria"

Biochim, Biophys. Acta, 5 , 463-471

MARTIN, P.; MENNECIER, M.; AGACHE, P.; HURIEZ, C. (1967)

"L'allergie aux ammoniums quaternaires : état actuel de nos recherches"

Congr. Int. Dermatol., 13th 1967 (pub. 1968), Jadossom Wa Springer Verlag. (ed.), BERLIN, 1 , 276-279

MONTANARI, F.; TUNDO, P. (1981)

"Titration of polyethers on the resins"

J. Org. Chem., 46 , 2130-2134

MOORE, R.A.; BATES, H.C.; HANCOCK, R.E.W. (1986)

"Interaction of a polycationic antibiotics with Pseudomonas aeruginosa Lipopolysaccharide and lipid A studied using dansyl-polymyxin"

Antimic. Agents Chemother., 29 , 496-500

MOTTA, G.; LEONARDI, A.; NARDI, D.; VERONESE, M. (1979)

"Ulteriori ricerche sui derivati del Durene : Nuovi sali di ammonio ad attività disinfettante"

Boll. Chim. Farm., 118 , 373-379

- MUNE, I.; USHIYAMA, K.; MOROISHI, Y.; IBARAGI, N.;
TADAICHI, T. (1979)
"Antibakterielles und Pilzbefall verhinderndes Material"
Brevet allemand DE 2.833.290, 05 juil. 1979, 25 pp.
- MURATA, H.; SEKINO, M. (1985)
"Antibacterial semipermeable membranes"
Brevet japonais 60.172.310, 05 sept. 1985, 3 pp.
- MYKLEBUST, S. (1985)
"Comparative antibacterial effectiveness of seven hand
antiseptics"
Scand. J. Dent. Res., 93 , 546-554
- NAKAGAWA, Y.; TAWARATANI, T.; SHIBASAKI, I. (1979a)
"Microbiocidal activity of insoluble quaternary ammonium-
salt-cation-exchange resin"
J. Antibact. Antifung. Agents, 7 , T511-T518
- NAKAGAWA, Y.; INOUE, Y.; TAWARATANI, T.; SHIBASAKI, I. (1979b)
"Bactericidal activity of insoluble cetylpyridinium
chloride-Amberlite IRC50-complex under continuous system"
J. Antibact. Antifung. Agents, 7 , T551-T552
- NAKAGAWA, Y.; DOMI, N.; TAWARATANI, T.; SHIBASAKI, I. (1983)
"The modeling of continuous disinfection system with
insolubilized quaternary ammonium salts"
J. Antibact. Antifung. Agents, 11 , 263-269
- NAKAGAWA, Y.; TSUKASAKI, T.; TAWARATANI, T.; KOURAI, H.;
HORIE, T.; SHIBASAKI, I. (1984a)
"Antimicrobial characteristics of quaternized insoluble
vinylpyridine-divinylbenzene-styrene copolymers in a con-
tinuous treatment system"
J. Antibact. Antifung. Agents, 12 , 329-334
- NAKAGAWA, Y.; TAWARATANI, T.; KOURAI, H.; HORIE, T.;
SHIBASAKI, I. (1984b)
"Adsorption of Escherichia coli onto insolubilized
lauryl pyridinium iodide and its bacteriostatic action"
Appl. Environ. Microbiol., 47 , 88-93

- NAKAGAWA, Y.; HAYASHI, H.; TAWARATANI, T.; KOURAI, H.; HORIE, T.; SHIBASAKI, I. (1984c)
"Disinfection of water with quaternary ammonium salts insolubilized on a porous glass surface"
Appl. Environ. Microbiol., 47 , 513-518
- NEWTON, B.A. (1956)
"The properties and mode of action of the polymyxins"
Bact. Rev., 20 , 14-27
- NEWTON, B.A. (1958)
"Surface active bactericides"
Symp. Soc. Gen. Microbiol., 8 , 62-92
- NICKEL, J.C.; WRIGHT, J.B.; RUSESKA, I.; MARRIE, T.J.; WHITFIELD, C.; COSTERTON, J.W. (1985)
"Antibiotic resistance of Pseudomonas aeruginosa colonizing a urinary catheter in vitro "
Eur. J. Clin. Microbiol., 4 , 213-218
- NIEL, C.; GUILLAUMB, J.B.; BECHET, M. (1977)
"Mise en évidence de deux enzymes présentant une activité β -galactosidasique chez Rhizobium meliloti "
Can. J. Microbiol., 23 , 1178-1181
- NIKAIDO, H.; VAARTA, M. (1985)
"Molecular basis of bacterial outer membrane permeability"
Microbiol. Rev., 49 , 1-32
- NISHIKAWA, K.; OI, S.; YAMAMOTO, T. (1979)
"Induced production of acidic polysaccharide by benzalkonium chloride in a bacterium and some properties of the acidic polysaccharide produced"
Agric. Biol. Chem., 43 , 2305-2310
- OCHIN, D. (1980)
"La production en masse et la préparation de cellules deshydratées de Rhizobium "
Thèse de doctorat 3ème cycle, LILLE
- OITA, N.; CIOVICA, N.S. (1980)
"Pansament antiseptic si cicatrizant"
Brevet roumain Rom 70.069, 30 juin 1980, 2 pp.
- O.M.S. (1977)
Rapports techniques de l'Organisation Mondiale de la Santé,
GENEVE, 28 , 106-123

OSANAI, S.; ABE, Y. (1985)

"Chirality-antimicrobial relationship of quaternary ammonium cationics"

J. Chem. Tech. Biotechnol., 35 B , 43-45

PARKER, M.S. (1969)

"Some effects of preservatives on development of bacterial spores"

J. Appl. Bacteriol., 32 , 322-328

PASTERNAK, C.A.; BASHFORD, C.L. (1985)

"Effect of Ca⁺⁺ and other divalent cations on the pore-formation by viruses, toxins, complement and other agents"

Stud. Biophys., 110 , 113-122

PAULUS, W.; PAULI, O. (1971)

"Permanente antimikrobielle ausrüstung von anionisiertem Textilmaterial"

Textilveredlung, 6 , 217-224

PECHMEZE, J.P.B. (1972)

"Process for the treatment of cellulosic materials"

Brevet anglais BP 1.283.326, 26 juil. 1972, 3 pp.

PEREA-CARPIO, R.; GONZALEZ-CABALLERO, F.; BRUQUE, J.M.; GONZALEZ-FERNANDEZ, C.F. (1986)

"The adsorption of n-alkylammonium chlorides at the aqueous solution-air interface"

J. Colloid Interface Sci., 110 , 96-101

PERNAK, J.; KRYSINSKI, J.; SKRZYPCZAK, A. (1985a)

"Wirkung neuer quartärer Iminium verbindungen gegen ausgewählte Bakterien- und Pilzstämmen"

Pharmazie, 40 , 570-571

PERNAK, J.; OSWIECIMSKA, M. (1985b)

"The anticorrosive, antielectrostatic and biocidal properties of some synthesized quaternary ammonium chlorides"

Tenside Deterg., 22 , 255-258

PETROCCI, A.N. (1977)

"Quaternary ammonium compounds"

In S.S. Block (ed.) "Disinfection, sterilization, and preservation", Lea & Febiger, PHILADELPHIA, 325-347

PHARMACHIM (1979)

"Filet de polyamide biologiquement actif et procédé pour sa préparation"

Brevet belge 878.408, 17 dec. 1979, 8 pp.

PHILLIPS, I.; SHANNON, K. (1984)

"Aminoglycoside resistance"

Brit. Med. Bull., 40 , 28-35

PIERUCCI, O.; RICKERT, M. (1985)

"Duplication of Escherichia coli during inhibition of Net phospholipid synthesis"

J. Bacteriol., 162 , 374-382

POSTGATE, J.R. (1956)

"Cytochrome C3 and desulphoviridin ; Pigments of the anaerobe Desulphovibrio desulphuricans "

J. Gen. Microbiol., 14 , 545-572

QUISNO, R.; GIBBY, I.W.; FOTER, M.J. (1946)

"A neutralizing medium for evaluating the germicidal potency of the quaternary salts"

Am. J. Pharm., 118 , 320-324

RADFORD, J.P. (1973)

"Application and evaluation of antimicrobial finishes"

Am. Dyestuff Rep., 13 , 48-59

REBOLD, R.; MONTE-BOVI, A.J.; MEDICI, P.T. (1958)

"A preliminary report on some new quaternary ammonium derivatives"

Am. J. Pharm., 130 , 227-230

RECK, R.A. (1982)

"Quaternary ammonium compounds"

in K. Othmer (ed.) "Encyclopedia of chemical technology", 3d ed., Wiley Interscience, 19 , 521-531

REYBROUCK, G. (1979)

"Efficacy of inactivators against 14 disinfectant substances"

Zbl. Bakt. Hyg., I. Abt. Org. B, 168 , 480-492

RICHARDS, R.M.E.; CAVILL, R.H. (1980)

"Electron microscope study of the effect of benzalkonium, chlorhexidine and polymyxin on Pseudomonas cepacia"
Microbios, 29, 23-31

RIEDMANN, W.D.; BANASIAK, L.; BRUNNER, G.; KOCHMANN, W.; LYR, H.; NAUMANN, J.; PFEIFFER, H.D.; REISSMULLER, H.; SCHWOTZER, H. (1984)

"Microbiocidal agent for disinfection"
Brevet allemand DD 215.690, 21 nov. 1984, 11 pp.

RUCKA, M.; OSWIECIMSKA, M.; WITEK, S. (1983)

"New biocides for cooling water treatment : Quaternary ammonium salts derivatives of glycine esters"
Environ. Prot. Eng., 9, 25-31

RUSSELL, A.D. (1977)

"The destruction of bacterial spores by quaternary ammonium compounds"
in W.B. Hugo (ed.) "The destruction and inhibition of the microbial cells", Academic Press, LONDON, 573-574

RYE, R.M.; WISEMAN, D. (1968)

"The partially inhibited growth of Escherichia coli in the presence of some antibacterial agents"
J. Pharm. Pharmacol., 20, 697-703

SALTON, M.R.J. (1951a)

"The adsorption of cetyltrimethylammonium bromide by bacteria, its action in releasing cellular constituents and its bactericidal effects"
J. Gen. Microbiol., 5, 391-404

SALTON, M.R.J.; HORNE, R.W.; COSLETT, V.E. (1951b)

"Electron microscopy of bacteria treated with cetyltrimethylammonium bromide"
J. Gen. Microbiol., 5, 405-407

SANYO-KOKUSAKU (1983)

"Resin-coated cardboard plates for clinical tests"
Brevet japonais JP 58.182.557, 25 oct. 1983

SANYO CHEM. IND., Ltd. (1985)

"Antimicrobial finishes for fiber products"
Brevet japonais JP 60 48.908, 16 Mai 1985, 5 pp.

SATA, T.; TAKATA, K.; MIZUTANI, Y. (1986)

"Interaction between large organic cations and cation exchange membranes"

J. Appl. Electrochem., 16 , 41-52

SEVIOUR, R.J.; PETHICA, L.M.; Mc CLURE, S. (1984)

"A simple modified procedure for preparing microbial cells for scanning electron microscopy"

J. Microbiol. Meth., 3 , 1-5

SHIGEMITSU, S. (1985)

"Manufacture of immobilized microbicidal microorganisms"

Brevet japonais JP 60.180.589, 14 sept. 1985, 3 pp.

SHIGITA, S. (1985a)

"Antibacterial finishing of fibers"

Brevet japonais JP 60 185.866, 21 sept. 1985, 7 pp.

SHIGITA, S. (1985b)

"Antibacterial finish of fiber products"

Brevet japonais JP 60.162.870, 24 août 1985, 7 pp.

SHINDO, H.; NAKAJIMA, E.; SHIGEHARA, E. (1976)

"Autoradiographic studies on the distribution of quaternary ammonium compounds : Adsorption of bisonium ions to rat tissues as revealed by in vitro whole-body adsorption autoradiography"

Chem. Pharm. Bull., 24 , 2327-2334

SIMMONS, L.K.; ELLIS, L.F.; SCHEGEL, R.A. (1976)

"Technique for scanning electron microscopy analysis of antibiotic activity on bacteria in colony form"

in O. Johari & R.P. Becker (eds.) "Scanning electron microscopy", Illinois Institute of Technology, CHICAGO, Part V, 107-112

SMITH, R.F.; SHAY, D.E.; DOORENBOOS, H.J. (1964)

"Relationship of surfactant properties of some synthetic steroids to bactericidal action"

J. Pharm. Sci., 53 , 1214-1216

SPEIER, J.L.; MALEK, J.R. (1982)

"Destruction of microorganisms by contact with solid surfaces"

J. Colloid Interface Sci., 89 , 68-76

- STANECK, J.L.; ALLEN, S.D.; HARRIS, E.E.; TILTON, R.C. (1985)
"Automated reading of MIC microdilution trays containing fluorogenic enzyme substrates with the sensitive autoreader"
J. Clin. Microbiol., 22 , 187-191
- STANTON, M.G. (1968)
"Colorimetric determination of inorganic phosphate in the presence of biological material and adenosine triphosphate"
Anal. Biochem., 22 , 27-29
- STOLS, A.L.H.; VELDSTRA, H. (1965)
"Interaction of Turnip Yellow Mosaic Virus with quaternary ammonium salts"
Virology, 25 , 508-515
- STOLZ, G.; FISHER-COLBRIE, H.; GRABLOWITZ, D.; HURKA, W. (1985)
"Clear-aqueous disinfectant solutions containing chlorhexidine lactate or gluconate and quaternary ammonium salts"
Brevet allemand DE 3.443.232, 05 juin 1985, 12 pp.
- STUART, L.S.; BOGUSKY, J.; FRIEDL, J.L. (1950)
"Difficulties encountered in testing quaternary germicides"
Soap Sanit. Chemicals, 26 , 121-125, 137
- SULING, W.J.; O'LEARY, W.M. (1977)
"Lipids of antibiotic-resistant and susceptible members of the Enterobacteriaceae "
Can. J. Microbiol., 23 , 1045-1051
- SWENSON, R.P. (1981)
"Inactivation of potassium current in squid axon by a variety of quaternary ammonium ions"
J. Gen. Physiol., 77 , 255-271
- TENNENT, J.M.; LYON, B.R.; GILLESPIE, M.T.; MAY, J.W.; SKURRAY, R.A (1985)
"Cloning and expression of Staphylococcus aureus plasmid-mediated quaternary ammonium resistance in Escherichia coli "
Antimicrob. Agents Chemother., 27 , 79-83

TIERNO, P.M.; HANNA, B.A.; DAVIES, M.G. (1983)

"Growth of toxic-shock-syndrome strain of Staphylococcus aureus after enzymic degradation of 'Rely' tampon component"

Lancet, 19 march 1983, 615-616

TOLGYESI, E.; SCHWARTZ, A.M.; RADER, C.A.; BRY, R.E. (1971)

"Moothproofing with ammonium quats"

Chem. Technol., 1, 27-30

TOWNSEND, D.B.; ASHDOWN, N.; ANNEAR, D.I.; GRUBB, W.B. (1985)

"A conjugative plasmid encoding production of a diffusible pigment and resistance to aminoglycosides and macrolides in Staphylococcus aureus"

Aust. J. Exp. Biol. Med. Sci, 63, 573-586

TOYOBO Co., Ltd (1984a)

"Bactericide-treated synthetic fibers"

Brevet japonais JP 59 164.342, 17 sep. 1984, 4 pp.

TOYOBO Co., Ltd (1984b)

"Antibacterial treatment of fibers"

Brevet japonais JP 59.130.371, 26 juin 1984, 4 pp.

TURBAK, A.F.; DURSO, D.F.; BATTISTA, O.A.; BOLKER, H.I.; COLVIN, J.R. (1982)

"Cellulose"

in K. Othmer (ed.) "Encyclopedia of chemical technology", 3d ed., Wiley Interscience, 5, 70-88

UETA, T.; KAZAMA, M. (1984)

"Determination of benzalkonium chloride in premoistened cotton wipes by HPLC"

Kenkyu Nenpo-Tokyo-toritsu Eisei Kenkyusho, 35, 159-161

U.S.P. (1980)

"National formulary of the Pharmacopeia of United States"
USP/NF XX, WASHINGTON D.C., U.S. pharmacopeal convention

VAIL, S.L. (1982)

"Textile finishing"

In K. Othmer (ed) "Encyclopedia of chemical technology", 3d ed., Wiley Interscience, 22, 769-802

- VENTULLO, R.M.; LARSON, R.J. (1986)**
"Adaptation of aquatic microbial communities to quaternary ammonium compounds"
Appl. Environ. Microbiol., 52 , 356-361
- VENTURA, F. (1985)**
"Meccanismo d'azione delle sostanze antimicrobiche e considerazioni su alcuni preservati"
Prod. Chim. Aerosol sel., 26 , 34-35, 37
- VINCENZINI, M.T.; FAVILLI, F.; STIO, M.; VANNI, P.; TREVES, C. (1985)**
"Detergents as selective inhibitors and inactivators of enzymes"
Physiol. Chem. Phys. Med. NMR, 17 , 279-295
- WALFISH, I.H.; JANAUER, G.B. (1979)**
"A new approach to water disinfection : NN dimethyl alkyl benzyl-polystyrene anion exchange resins as contact disinfectants"
Water, Air, Soil Pollut., 12 , 447-484
- WALLHAUSSER, K.H.; BÜCKING, H.W.; MAY, A. (1974)**
"Wascheweichspülmittelkonzentrat mit desinfizierenden Eigenschaften"
Brevet allemand DE 2.459.354., 16 dec. 1974, 8pp.
- WEINER, N.D.; HART, F.; ZOGRAFT, G. (1965)**
"application of the Ferguson principle to the anti-microbial activity of quaternary ammonium salts"
J. Pharm. Pharmacol., 17 , 350-355
- WESTPHAL, O.; JANN, K. (1965)**
"Bacterial lipopolysaccharides extraction with phenol-water and further applications of the procedure"
Methods Carbohydrate Chem., 5 , 83-91
- WETTERMARK, G.; BROLIN, S.E.; JUHLIN, L. (1980)**
"Applying bioluminescence to studies of cell membrane properties"
J. Colloid Interface Sci., 73 , 287-289
- WHITE, H.J. (1970)**
"Adsorption of cationic surfactants by cellulosic substrates"
in E. Jungermann (Ed.) "Cationic surfactants", Marcel Dekker Inc., NEW-YORK, 311-340

WILDBRETT, Von G. (1985)

"Zur abspülbarkeit keimtötender quaternärer Ammoniumverbindungen durch Wasser und Milch und daraus resultierende Folgen"

Arch. Lebensmittelhyg., 36 , 12-15

WILKINSON, S.G.; GALBRAITH, L.; LIGHTFOOT, G.A. (1973)

"Cells walls, lipids and lipopolysaccharides of Pseudomonas species "

Eur. J. Biochem., 33 , 158-174

WILLIAMSON, P.B.A.; KLIGMAN, A.M. (1965)

"A new method for quantitative investigation of cutaneous bacteria"

J. Inv. Dermatol., 45 , 498-503

WOSCINSKI, C.J.; JENG, D.K.H.; BURROUGHS, J.E. (1985)

"Compositions for maintaining asepsis on urine drainage bags"

Brevet canadien CA 1.188.983, 18 juin 1985, 6 pp.

WYSOCKI, A.J.; TABER, D. (1970)

"Cyclical alkylammonium compounds"

In E. Jungermann (ed.) "Cationic surfactants", Marcel Dekker Inc., NEW-YORK, 71-146

ZEMBALA, M.; CZARNECKI, J. (1982)

"Properties of adsorbed layer and stability of thin-liquid film in the air-aqueous dodecyltriethylammonium salt solution-mercury system"

J. Colloid Interface Sci., 89 , 1-7

ZISSMANN, E. (1954)

"Propriétés bactériostatiques et tensioactives de certains composés cationiques"

C. R. Acad. Sci., 238 , 1843-1845

ZISSMANN, E. (1957)

"Tension superficielle de quelques agents cationiques antiseptiques en solution dans le milieu même des essais bactériostatiques"

C. R. Acad. Sci., 245 , 237-239



PHOTO -1-

Tissu traité
sel 6_a à
15 g/kg de
coton

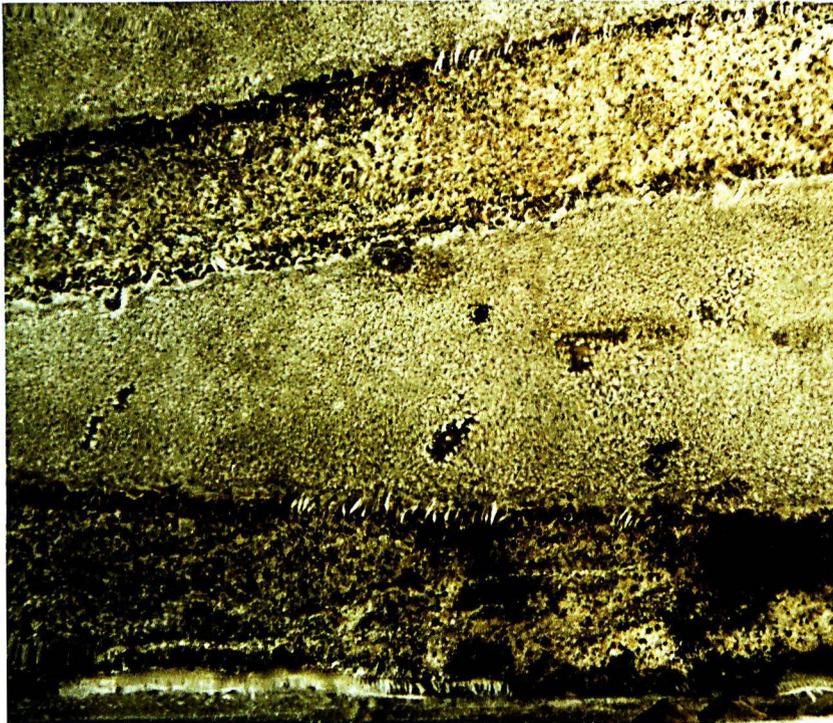


PHOTO -2-

Tissu témoin

ECHANTILLONS DE TISSUS APRES TROIS SEMAINES D'EXPOSITION
A DES CHAMPIGNONS CELLULOLYTIQUES
(NORME NF X 41-600)