



CONTRIBUTION A LA DESINFECTIION DE L'EAU PAR PHOTOSENSIBILISATION AVEC DES EXTRAITS DE PLANTES

THESE

PRESENTEE A LA FACULTE DES SCIENCES DE L'ULG

Département des Sciences et Gestion de l'Environnement

POUR L'OBTENTION DU GRADE DE DOCTEUR EN SCIENCES

PAR

SUNDA MAKUBA Teddy

Licencié en Sciences Chimiques

SOUTENUE A ARLON LE 21 JUIN 2012 DEVANT LE JURY COMPOSE DE :

Jean-Luc VASEL : Université de Liège (Président)

Francis ROSILLON : Université de Liège (Promoteur)

Kalulu Muzele TABA : Université de Kinshasa (Co-Promoteur)

Monique CARNOL : Université de Liège

Bernard WATHELET : Gembloux Agro-Bio Tech, Université de Liège

Michel PAQUOT : Gembloux Agro-Bio Tech, Université de Liège

Dayeri DIANOU: CNRST, Ouagadougou, Burkina Faso

Il y a dans le cœur de l'homme beaucoup de projets, mais c'est le dessein de l'Éternel qui s'accomplit.

Proverbes 19:21

RESUME

La problématique de l'accès à l'eau par les populations des pays en développement constitue toujours de nos jours un défi important à relever pour contribuer à un développement durable tout en garantissant des conditions sanitaires satisfaisantes. Malgré les Objectifs du Millénaire pour le Développement (OMD), de nombreux pays souffrent encore actuellement d'un manque d'accès à l'eau. En République Démocratique du Congo, seuls 26% de la population a accès à l'eau.

Au-delà de la satisfaction des besoins humains assurés par la fourniture de la quantité d'eau nécessaire, il s'agit aussi de veiller à garantir sa bonne qualité, particulièrement la qualité microbiologique. Parmi les divers procédés de désinfection de l'eau au niveau familial, la présente contribution a pour objectif l'amélioration de la méthode de désinfection solaire par application du processus de photosensibilisation. En présence de lumière, un photosensibilisateur génère dans l'eau l'oxygène singulet très réactif conduisant à la destruction des microorganismes.

Certaines plantes utilisées dans la pharmacopée traditionnelle pour soigner les infections microbiennes et parasitaires sont capables d'initier cette réaction de photosensibilisation. Dans un premier temps, parmi une dizaine de plantes analysées, nous avons mis en évidence l'activité photosensibilisante d'extraits non alcaloïdiques de *Cassia alata*, *Cassia occidentalis*, *Carica papaya*, *Phyllanthus niruri* et *Coleus kilimandschari*. L'inactivation des coliformes fécaux a été remarquée après trois heures d'ensoleillement, celle-ci se manifestant après une heure d'exposition lorsque le milieu est saturé en oxygène.

Tout en étant libéré de la contrainte liée à la saturation du milieu en oxygène, l'étude des huiles essentielles extraites de plantes de la famille des Rutacées a montré une inhibition complète des coliformes fécaux présents dans l'eau après deux heures d'ensoleillement pour *Citrus reticulata* et *Citrus limonum* et une heure d'ensoleillement pour *Citrus bergamia*. L'examen de cette dernière huile en spectrométrie de masse a mis en évidence la présence de méthoxy-5 psoralène (MOP-5), responsable de l'activité photosensibilisatrice. Utilisé en solution dans l'eau, le MOP-5 a confirmé son rôle de photosensibilisateur et son efficacité désinfectante avec un abattement de 4 unités logarithmiques pour les Coliformes fécaux après une heure d'exposition et de 3 unités logarithmiques pour les Entérocoques fécaux après seulement 5 minutes d'exposition.

La fixation du MOP-5 sur un support solide a permis de récupérer le photosensibilisateur après usage tout en conservant son pouvoir désinfectant supérieur à la forme libre. Le dispositif MOP-5/polystyrène a permis d'observer une inhibition complète des Coliformes fécaux après seulement 6 minutes d'exposition et deux minutes pour les Entérocoques fécaux.

Cette recherche constitue un premier travail exploratoire qui ouvre la voie vers un nouveau processus de désinfection de l'eau par photosensibilisation à partir d'extraits de plantes. Mais il conviendra de préciser les modalités pratiques d'application afin de rendre ce processus opérationnel.

Mots clés: désinfection de l'eau, extraits de plantes, huiles essentielles, photosensibilisation, oxygène singulet.

SUMMARY

The problems of access to water by the populations of developing countries constitute nowadays an important challenge to contribute to a sustainable development while guaranteeing satisfactory sanitary health. In spite of the Millennium Development Goals (MDG), many countries don't have access to water. In Republic Democratic of Congo, for example, only 26% of the population has access to water.

Beyond the satisfaction of the human needs ensured by the supply for the quantity of water, it is also a question of taking care to guarantee its good quality, particularly microbiological quality. Among the household methods of water disinfection, the present contribution aims at the improvement of solar disinfection using the photosensitization process. In the presence of light, a photosensitizer generates singlet oxygen, molecule capable of destroying micro-organisms.

Certain plants used in the traditional pharmacopeia to look after microbial and parasitic infections are able to initiate the photosensitization reaction. Initially, among ten plants analyzed, we highlighted the photosensitizing activity of not alkaloid extracts of *Cassia alata*, *Cassia occidentalis*, *Carica papaya*, *Phyllanthus niruri* and *Coleus kilimandschari*.

The inactivation of Fecal Coliforms was noticed after three hours of insulation. This time pass from three hours to one hour of exposure when the medium is saturated with oxygen.

While being released of the constraint related to the saturation of the medium of oxygen, the study of the essential oils extracted from plants of Rutaceae family showed a complete inhibition of Fecal Coliforms present in water after two hours of insulation for essential oils of *Citrus limonum* and *Citrus reticulata* and one hour with *Citrus bergamia* oil.

Mass Spectrometry of these oils highlighted the presence of 5-methoxypsoralen (MOP-5), molecule responsible of its photosensitizing activity. Used in solution in water, the MOP-5 confirmed its role of photosensitizer and its effectiveness disinfecting with an abatement of 4 units logarithmic for Fecal Coliforms after one hour of exposure and 3 units logarithmic for Fecal *Enterococcus* after only 5 minutes.

The fixation of MOP-5 on a solid support made it possible to recover the photosensitizer after use while preserving its capacity disinfecting higher than the free form. The MOP-5/polystyrène device made it possible to observe a complete inhibition of Fecal Coliforms after only 6 minutes of exposure and two minutes for Fecal *Enterococcus*.

This research constitutes the first exploratory work which opens the way towards a new process of water disinfection by photosensitization from plant extracts. But it will be advisable to specify the practical modalities of application in order to make this process operational.

Key Words: Water disinfection, Plant extracts, Essential oils, Photosensitization, Singlet oxygen.

REMERCIEMENTS

Je tiens à remercier Monsieur Francis Rosillon qui a dirigé les quatre années de travaux de cette recherche. Merci pour ses compétences, sa disponibilité, son soutien sans faille et sa détermination pour l'aboutissement de travaux de cette thèse.

Notre profonde gratitude à l'égard de Monsieur Taba Kalulu Muzele pour avoir initié nos premiers pas dans la recherche. Ses conseils, son encouragement et surtout ses remarques ont beaucoup contribué à l'avancement de cette thèse. Nous saisissons cette occasion pour remercier tous les professeurs de la Faculté des Sciences de l'Université de Kinshasa pour la formation dont nous avons été bénéficiaire.

Nous adressons nos remerciements à Monsieur Michel Paquot pour nous avoir accepté au Laboratoire de chimie et biologie industrielle, au sein duquel nous avons réalisé la synthèse organique et les analyses spectroscopiques de cette recherche. Nous tenons à présenter nos vifs remerciements à l'égard de Monsieur Bernard Wathelet pour son encadrement. Son écoute, sa patience et son soutien ont été déterminants pour la réalisation de cette recherche.

Que Madame Monique Carnol trouve à travers ces quelques lignes notre profonde gratitude pour son encadrement et surtout ses remarques qui ont été d'un grand apport pour l'accomplissement de travaux de cette thèse.

Nos sincères remerciements à Monsieur Jean Luc Vasel pour avoir accepté d'être le président du Jury de cette thèse. Nous remercions également Monsieur Dayeri Dianou pour avoir accepté d'être membre du présent Jury.

Je me dois d'adresser mes remerciements à toute l'équipe Eau et Environnement : Kadija Sossey, Guy Kouam et Céline Jacmain, avec qui nous avons partagé ces quelques années ensembles. Merci en tout et pour tous.

J'adresse un grand merci à toute l'équipe de Chimie et biologie industrielle pour son soutien et son aide précieuse: Erick Groignet, Isabelle Van de Vreken, Alexandre Schandeler, Katherine Nott, Byttebier Virginie, Marie-Michèle Combo. Ce fut un grand plaisir de travailler avec vous.

Nous remercions la Coopération Technique Belge (C.T.B.) de nous avoir octroyé cette bourse, laquelle nous a permis de mener à bien les travaux de cette recherche. Que nos gestionnaire de la CTB, Nicolas Brecht, Liesbeth Vastenavondt, Mowa Kapundu et Jean Claude Kakud'ji trouvent à travers ces quelques lignes notre profonde gratitude pour avoir bien géré cette bourse.

Notre gratitude à l'égard de Catherine Heyman qui, malgré ses occupations, était toujours disposée à nous trouver les informations, articles ou livres que nous avions besoin. Merci Catherine pour ton aide précieuse. Bien sûr nos remerciements à Chantal Bartholomé pour ses conseils et son aide durant toutes les années passées au Campus d'Arlon. Merci à Liliane Carpentier pour la commande des produits qui ont servi au bon déroulement de cette recherche.

Nos remerciements fraternels à tous ceux qui nous ont soutenu jours et nuits dans leurs prières durant ces quatre années de thèse. Que Dieu accomplisse le désir de leurs cœurs.

Nos remerciements vont à tous ceux qui de près ou de loin ont contribué d'une manière ou d'une autre à la réalisation de travaux de cette recherche. Je pense notamment à tous les mémorants, avec qui nous avons eu à collaborer durant ces quatre années de thèse. Merci Infiniment.

Grand merci à toi Daniel Lutumba car ta présence m'a appris à placer toute ma confiance en l'Éternel.

Enfin, je remercie mes parents, toute ma famille et ma tendre épouse Lezy Lengi, pour les conseils et le soutien tant moral que spirituel. Ceux-ci ont été déterminants pour l'aboutissement des travaux de cette recherche.

LISTE DES SYMBOLES ET ACRONYMES

ADN: Acide désoxyribonucléique

APCI: Atmospheric Pressure Chemical Ionisation

ARN: Acide ribonucléique

CFU: Unité formant colonie

C.F.: Coliformes fécaux

C.a.: *Cassia alata*

C.o.: *Cassia occidentalis*

Cp.: *Carica papaya*

C.k.: *Coleus kilimandschari*

C.b.: *Citrus bergamia*

C.r.: *Citrus reticulata*

C.l.: *Citrus limonum*

L.c.: *Lantana camara*

P.n.: *Phyllanthus niruri*

E.coli: *Escherichia coli*

FT-IR: Fourier Transformer Infra Red Spectroscopy

Hbrs: *Hibiscus rosa simentis*

HpD: Hématoporphyrine et ses dérivées

IC: Conversion interne

ISC: Conversion intersystème

ISO: Organisation Mondiale de Standardisation

IVR: Relaxation vibrationnelle

Kcal: Kilocalorie

Kg: kilogramme

MOP-5: Méthoxy-5 psoralène

LC / MS: Liquid chromatography / Mass spectroscopy

nm: nanomètre

O.M.S.: Organisation Mondiale de la Santé

SD: Standard deviation (Erreur standard)

S.F.: Streptocoques fécaux

SODIS: Solar Water Disinfection

UVA: Ultraviolets A

$^1\text{O}_2$ ou $^1\Delta_2$: Oxygène singulet

$^3\text{O}_2$: Oxygène triplet

O_3 : Ozone

$^1\Sigma_g^+$: Second état excité

$^1\Delta_g$: Premier état excité

$^3\Sigma_g$: Etat fondamental

$^1\text{Sens}$: Sensibilisateur à l'état singulet

$^1\text{Sens}^*$: Sensibilisateur à l'état singulet excité

$^3\text{Sens}^*$: Sensibilisateur à l'état triplet

λ : Longueur d'onde

%: Pourcentage

h: Constante de Planck

V: fréquence

SOMMAIRE

LISTE DES TABLEAUX.....	16
LISTE DES FIGURES	18
LISTE DES PHOTOS.....	21
CHAPITRE I: INTRODUCTION GENERALE.....	23
1. Introduction	23
2. Questions de recherche	24
3. Objectifs	25
4. Références bibliographiques	30
SECTION I : CONTEXTE BIBLIOGRAPHIQUE	32
CHAPITRE II: SITUATION GENERALE RELATIVE A LA QUALITE MICROBIOLOGIQUE DE L'EAU	34
1. Accès à l'eau potable	34
2. Le risque microbiologique de l'eau.....	35
2.1. Microorganismes indicateurs de contamination fécale.....	37
2.1.1. Les coliformes fécaux	38
2.1.1.1. Intérêt	38
2.1.1.2. Normes.....	38
2.1.2. Les Entérocoques fécaux	39
2.1.2.1. Normes.....	39
3. Production d'eau potable dans les pays en voie développement.....	39
3.1. De l'approche centralisée aux traitements individuels	39
3.2. Quelques méthodes de traitement de l'eau au niveau individuel.....	40
3.2.1. Désinfection de l'eau par ébullition	40
3.2.2. La filtration	40
3.2.3. La chloration.....	40

3.2.4. La désinfection solaire de l'eau	41
4. Conclusion.....	41
5. Références bibliographiques	42
CHAPITRE III: LA PHOTSENSIBILISATION	45
1. La lumière	46
1.1. Historique.....	46
1.2. Effet photoélectrique.....	46
1.3. Le spectre électromagnétique.....	47
1.4. L'absorption de la lumière	47
1.5. Transitions électroniques.....	48
2. Les photosensibilisateurs	49
2.1. Les plantes à activité photosensibilisatrice	50
2.1.1. Plantes de la famille des Rutacées.....	50
2.1.1.1. <i>Citrus limonum</i>	50
2.1.1.2. <i>Citrus bergamia</i>	52
2.1.1.3. <i>Citrus reticulata</i>	53
2.1.2. Autres plantes photosensibilisantes	54
2.1.2.1. <i>Cassia alata</i>	54
2.1.2.2. <i>Cassia occidentalis</i>	55
2.1.2.3. <i>Carica papaya</i>	56
2.2. Les molécules à activité photosensibilisante	57
2.2.1. Les psoralènes ou furocoumarines.....	57
2.2.2. Les quinones.....	61
2.3. Immobilisation du photosensibilisateur sur un support solide	63
3. Oxygène singulet ($^1\text{O}_2$)	64
3.1. Qu'est-ce que l'oxygène singulet ?	64
3.2. Origine de l'oxygène singulet	65

3.3. Formation d'oxygène singulet	66
3.4. Réactions de l'oxygène singulet avec les biomolécules.....	68
3.4.1. Réactions de l'oxygène singulet sur les acides aminés	69
3.4.1.1. Histidine	69
3.4.1.2. Tryptophane	69
3.4.2. Réactions de l'oxygène singulet sur les bases azotées de l'ADN	70
3.4.2.1. La thymine	70
3.4.2.2. La guanine.....	71
3.4.3. L'action de l'oxygène singulet sur les lipides.....	72
3.4.4. L'action de l'oxygène singulet sur les hydrates de carbones.....	72
3.5. Applications de l'oxygène singulet.....	72
4. Conclusion.....	73
5. Références bibliographiques	75
CONCLUSION DE LA SECTION I.....	81
SECTION II : PARTIE EXPERIMENTALE	82
CHAPITRE IV: STRATEGIE DE RECHERCHE.....	84
CHAPITRE V: CONTRIBUTION A L'ETUDE DE LA DESINFECTION DE L'EAU PAR PHOTSENSIBILISATION AVEC DES EXTRAITS DE PLANTES.....	90
1. Introduction	90
2. Matériel et méthodes	90
2.1. Echantillonnage	90
2.2. Préparation des extraits aqueux de plantes	90
2.3. Mode opératoire	92
2.4. Analyses bactériologiques.....	92
2.5. Séparation des extraits de plantes.....	92
3. Résultats et discussion.....	95
3.1. Traitement de l'eau polluée par les extraits aqueux de plantes.....	95

3.2. Traitement de l'eau polluée par les extraits alcaloïdiques et non alcaloïdiques.....	96
4. Conclusion.....	99
5. Références Bibliographiques	99

CHAPITRE VI: DESINFECTION DE L'EAU PAR PHOTSENSIBILISATION AVEC LES HUILES ESSENTIELLES DE *CITRUS BERGAMIA*, *CITRUS LIMONUM* ET *CITRUS RETICULATA*

1. Introduction	102
2. Matériel et méthodes	102
2.1. Echantillonnage	102
2.1.1. L'eau polluée.....	102
2.1.2. Les zestes de fruits.....	102
2.2. Extraction des huiles essentielles	102
2.3. Préparation des échantillons d'eau polluée avec des huiles essentielles.....	103
3. Résultats et discussion.....	103
3.1. Extraction des huiles essentielles	103
3.2. Tests de Photosensibilisation	103
4. Conclusion.....	106
5. Références bibliographiques	107

CHAPITRE VII: DESINFECTION DE L'EAU PAR PHOTSENSIBILISATION AVEC L'HUILE ESSENTIELLE DE *CITRUS BERGAMIA*

1. Introduction	109
2. Matériel et méthodes	109
2.1. L'eau polluée.....	109
2.2. Extraction de l'huile essentielle de <i>Citrus bergamia</i>	109
2.3. Analyse spectrométrique de l'huile essentielle de <i>Citrus bergamia</i>	109
2.4. Préparation des échantillons d'eau avec l'huile essentielle	110
2.5. Analyses bactériologiques.....	110
3. Résultats et discussion.....	110

3.1. Caractérisation de l'huile essentielle de <i>Citrus bergamia</i>	110
3.2. Désinfection de l'eau avec l'huile essentielle de <i>Citrus bergamia</i> : photosensibilisation et post photosensibilisation	111
3.2.1. Photosensibilisation	111
3.2.2. Post photosensibilisation.....	113
3.3. Désinfection de l'eau dans les échantillons non traités avec l'huile essentielle de <i>Citrus bergamia</i> et irradiés: Photolyse et post photolyse	113
3.3.1. Photolyse	113
3.3.2. Post photolyse	114
3.4. Sensibilité des Entérocoques fécaux vis-à-vis de l'huile essentielle de <i>Citrus bergamia</i>	114
4. Conclusion.....	115
5. Références bibliographiques	116
CHAPITRE VIII: DESINFECTION DE L'EAU PAR PHOTOSENSIBILISATION AVEC LE METHOXY-5 PSORALENE EN SOLUTION.....	119
1. Introduction	119
2. Matériel et méthodes	119
2.1. Prélèvement de l'eau à analyser.....	119
2.2. Le Méthoxy-5 psoralène.....	119
2.3. Tests de désinfection de l'eau par photosensibilisation avec le MOP-5	119
2.4. Les analyses bactériologiques.....	120
2.5. Etude cinétique	120
3. Résultats et discussion.....	120
3.1. Sensibilité des coliformes fécaux vis-à-vis du MOP-5.....	120
3.1.1. Résultats des tests de désinfection.....	120
3.1.2. Etude cinétique	123
3.1.3. Influence de l'intensité lumineuse sur l'abattement des coliformes fécaux.....	125
3.2. Sensibilité des entérocoques fécaux vis-à-vis de MOP-5.....	126
4. Conclusion.....	128

5. Références Bibliographiques	129
CHAPITRE IX: DESINFECTION DE L'EAU PAR PHOTOSENSIBILISATION AVEC LE METHOXY-5 PSORALENE FIXE SUR LE POLYSTYRENE	132
1. Introduction	132
2. Matériel et méthodes	132
2.1. Désinfection de l'eau avec le MOP-5 fixé sur le polystyrène A	132
2.1.1. Prélèvement de l'eau à analyser	132
2.1.2. Le méthoxy-5 psoralène	132
2.1.3. Le polystyrène.....	132
2.1.4. Fixation du méthoxy-5 psoralène sur le polystyrène A.....	132
2.1.5. Mode opératoire de tests de désinfection	133
2.1.6. Analyses bactériologiques.....	133
2.1.7. Etude cinétique	133
2.2. Désinfection de l'eau avec le MOP-5 fixé sur le polystyrène B	133
2.2.1. Eau polluée.....	133
2.2.2. Méthoxy-5 psoralène (MOP-5).....	134
2.2.3. Polystyrène	134
2.2.4. Fixation du méthoxy-5 psoralène sur le polystyrène B	134
2.2.5. Tests de photosensibilisation avec le MOP-5 psoralène fixé sur le polystyrène B (MOP-5-P-B).....	135
2.2.6. Analyses bactériologiques.....	135
2.2.7. Etude cinétique	136
3. Résultats et discussion.....	136
3.1. Caractérisation du MOP-5 fixé sur le polystyrène A	136
3.2. Tests de désinfection de l'eau par photosensibilisation avec le méthoxy-5 psoralène fixé sur le polystyrène A (MOP-5-P-A)	137
3.3. Désinfection de l'eau par photosensibilisation avec le polystyrène B (MOP-5-P-B)	138
3.3.1. Sensibilité des coliformes fécaux vis-à-vis du système MOP-5-P-B.....	138

3.3.1.1. Etude cinétique	139
3.3.1.2. Influence de l'intensité lumineuse sur l'abattement des coliformes fécaux.....	139
3.3.2. Sensibilité des entérocoques fécaux vis-à-vis de MOP-5 fixé sur le polystyrène-B (MOP-5-P-B).....	140
3.3.3. Etude du maintien de l'activité du système MOP-5-P-B dans le temps.....	141
4. Conclusion.....	143
5. Références Bibliographiques.....	143
CHAPITRE X: DISCUSSION GENERALE.....	146
1. Confirmation de l'effet photosensibilisateur justifiant le pouvoir désinfectant des substances testées.....	146
2. Réflexion relative aux conditions d'expérimentation	146
2.1. La nature du photosensibilisateur	146
2.2. La lumière	149
2.3. Analyses bactériologiques.....	149
2.3.1. Eau utilisée	149
2.3.2. Milieux de culture.....	149
3. Le greffage de MOP-5 et la conservation de son pouvoir photosensibilisateur	149
4. Application concrète des résultats obtenus.....	150
CHAPITRE XI: CONCLUSION GENERALE ET PERSPECTIVES.....	153
ANNEXE: SPECTRES INFRA ROUGE	156

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 2.1.: Les OMD en matière d’approvisionnement en eau (% de la population avec accès à l’eau)	35
Tableau 2.2.: Principaux agents pathogènes présents dans l’eau et maladies associées	36
Tableau 2.3.: Quelques microorganismes indicateurs de contamination fécale	38
Tableau 3.1.: Furocoumarines correspondant aux radicaux R1 et R2	59
Tableau 3.2.: Quelques furocoumarines linéaires et leurs origines	60
Tableau 3.3.: Différents états d’énergie de la molécule d’oxygène	65
Tableau 3.4.: Plantes photosensibilisantes utilisées dans le cadre de cette recherche et les molécules responsables de leur activité	74
Tableau 5.1.: Plantes utilisées et familles correspondantes	91
Tableau 5.2.: Traitement de l’eau polluée avec 2 ml d’extraits aqueux de plantes	95
Tableau 5.3.: Traitement de l’eau polluée avec 2 ml d’extraits alcaloïdique	96
Tableau 5.4.: Traitement de l’eau polluée avec 2 ml d’extraits non alcaloïdiques	97
Tableau 5.5.: Criblage phytochimique des extraits de plantes	98
Tableau 6.1.: Résultats de l’extraction des huiles essentielles de <i>Citrus bergamia</i> , <i>Citrus limonum</i> et <i>Citrus reticulata</i>	103
Tableau 6.2.: Criblage phytochimique des huiles essentielles de <i>Citrus bergamia</i> , <i>Citrus limonum</i> et <i>Citrus reticulata</i>	106
Tableau 7.1.: Les paramètres expérimentaux utilisés pour l’analyse spectrométrique de l’huile de <i>Citrus bergamia</i>	110

**Tableau 8.1.: Constantes cinétiques en fonction des différentes concentrations de MOP-5
utilisées 124**

**Tableau 10.1.: Synthèse des résultats obtenus en fonction des différentes conditions
d'expérimentation 148**

LISTE DES FIGURES

Figure 1.1.: Les différentes étapes de travaux à réaliser dans le cadre de cette étude ...	26
Figure 1.2.: Contexte bibliographique de cette étude	28
Figure 1.3.: Canevas général, Structuration du travail	29
Figure 2.1.: Couverture en approvisionnement en eau potable dans les différentes régions du monde en 2002	35
Figure 3.1.: Production d'oxygène singulet à partir d'un photosensibilisateur et de lumière	45
Figure 3.2.: Spectre électromagnétique.....	47
Figure 3.3.: Niveaux d'énergie des orbitales moléculaires dans le formaldéhyde et différentes transitions électroniques.....	49
Figure 3.4. : Photosensibilisateur à l'état fondamental et excité.....	49
Figure 3.5.: A : Psoralène ; B : Angeline.....	57
Figure 3.6.: Mode d'action des psoralènes.....	58
Figure 3.7.: Thymine	58
Figure 3.8.: Furocoumarines	58
Figure 3.9.: Photodimère avec 4'-5'	59
Figure 3.10.: Photodimère avec 3 -4	59
Figure 3.11.: Photodimère avec 3 -4 et 4'-5'	59
Figure 3.12.: Structure des motifs de base des quinones	61
Figure 3.13.: Vitamine K	62
Figure 3.14.: Alizarine	62
Figure 3.15.: Quelques anthraquinones isolées de feuilles de <i>Cassia alata</i>	62
Figure 3.16.: Structures de Lewis de la molécule d'oxygène.....	64
Figure 3.17.: Diagramme d'orbitales moléculaires de l'oxygène.....	65

Figure 3.18.: Formation de l'oxygène singulet à partir d'un photosensibilisateur	66
Figure 3.19.: Diagramme de Jablonsky.....	66
Figure 3. 20: Formation de l'anion superoxyde et de peroxyde d'hydrogène	67
Figure 3.21.: Une des premières réactions connues comme produisant l'oxygène singulet	68
Figure 3.22.: Mécanisme de photooxydation de l'histidine	69
Figure 3.23.: Mécanisme de photooxydation de tryptophane	70
Figure 3.24.: Mécanisme de photooxydation de Thymine.....	71
Figure 3.25.: Mécanisme de photooxydation de guanine.....	71
Figure 3.26.: Mécanisme de peroxydation du cholestérol	72
Figure 3.27.: Production d'oxygène singulet à partir d'un photosensibilisateur et de lumière.....	74
Figure 4.1.: Objectifs spécifiques poursuivis	85
Figure 4.2.: Etapes poursuivies dans cette recherche	87
Figure 5.1.: Extraction des fractions alcaloïdiques et non alcaloïdiques	94
Figure 6.1.: Abattement des coliformes fécaux en fonction du temps avec l'HE de CB	104
Figure 6.2.: Abattement des coliformes fécaux en fonction du temps avec l'HE de CL	104
Figure 6.3.: Abattement des coliformes fécaux en fonction du temps avec l'HE de CR	105
Figure 7.1.: Spectre de masse de l'huile essentielle de <i>Citrus bergamia</i>	111
Figure 7.2.: Abattement des coliformes fécaux en fonction du temps dans l'eau traitée avec 1 ml d'huile de CB / litre d'eau.....	112
Figure 7.3.: Abattement des entérocoques fécaux en fonction du temps dans l'eau traitée avec 1 litre d'huile de CB / litre d'eau.....	114
Figure 8.1.: Abattement des coliformes fécaux en fonction du temps en utilisant 0,006 g de MOP-5/ litre d'eau	121
Figure 8.2.: Abattement des coliformes fécaux en fonction du temps en utilisant 0,2 g de MOP-5 / litre d'eau	121
Figure 8.3.: Abattement des coliformes fécaux en fonction du temps en utilisant 0,340 g de MOP-5 / litre	122
Figure 8.4.: Abattement des coliformes fécaux en fonction du temps : Comparaison des différentes concentrations.....	122

Figure 8.5.: Méthoxy-5 psoralène	123
Figure 8.6.: Inhibition des coliformes fécaux en fonction du temps (0,006 g de MOP-5/l)	124
Figure 8.7.: Inhibition des coliformes fécaux en fonction du temps (0,2 de MOP-5 g/l)	124
Figure 8.8.: Inhibition des coliformes fécaux en fonction du temps (0,340 g de MOP-5/l)	125
Figure 8.9.: Influence de l'intensité lumineuse sur l'Inhibition des coliformes fécaux .	125
Figure 8.10.: Abattement des entérocoques fécaux en fonction du temps (0,006g de MOP-5 / litre)	126
Figure 8.11.: Abattement des entérocoques fécaux en fonction du temps (0,20 g de MOP-5 / litre)	126
Figure 8.12.: Abattement des entérocoques fécaux en fonction du temps (0,340 g de MOP-5 / litre)	126
Figure 8.13.: Abattement des entérocoques fécaux en fonction du temps : comparaison des concentrations	127
Figure 9.1.: Fixation du Méthoxy-5 psoralène sur le polystyrène A.....	133
Figure 9.2.: Fixation de MOP-5 sur le polystyrène B	135
Figure 9.3.: Spectre infra rouge du méthoxy-5 psoralène fixé sur le polystyrène.....	136
Figure 9.4.: Inhibition des coliformes fécaux en fonction du temps dans l'eau traitée avec le MOP-5-P-A (0,9 mg de MOP-5 / litre d'eau)	137
Figure 9.5.: Inhibition des coliformes fécaux en fonction du temps dans l'eau traitée avec 5,88 g de MOP-5-P / litre d'eau	138
Figure 9.6.: Abattement des coliformes fécaux en fonction du temps.....	139
Figure 9.7.: Influence de l'intensité lumineuse sur l'abattement des coliformes fécaux (5,88 mg de MOP-5-P / litre d'eau)	140
Figure 9.8.: Abattement des coliformes fécaux en fonction de l'intensité lumineuse ..	140
Figure 9.9.: Inhibition d'entérocoques fécaux en fonction du temps dans l'eau traitée avec 5,88 mg de MOP-5 / litre d'eau	141
Figure 9.10.: Inhibition des coliformes fécaux en fonction du temps avec le système MOP-5-P-B	142
Figure 9.11.: Inhibition des coliformes fécaux en fonction du temps avec le système MOP-5-P-B régénéré	142

Figure 10.1.: Inhibition des coliformes fécaux en fonction de la dose utilisée 150

LISTE DES PHOTOS

Photo 3.1.: *Citrus limonum* 51

Photo 3.2.: *Citrus bergamia*..... 52

Photo 3.3.: *Citrus reticulata*..... 54

Photo 3.4.: *Cassia alata* 54

Photo 5.1.: Feuilles de *Cassia alata* 91

Photo 5.2.: Séchage de plantes / Kinshasa..... 93

Photo 5.3.: Concentration d'extraits de plantes / Université de Kinshasa..... 93

CHAPITRE I

CHAPITRE I: INTRODUCTION GENERALE

1. Introduction

L'eau est le constituant fondamental de la vie. A l'instar de l'air, l'eau est essentielle à la vie humaine. Elle est au centre de toute activité humaine: l'agriculture, la production industrielle, la pêche, le tourisme, la production d'énergie (hydro-électricité). Le corps humain est principalement constitué d'eau. La quantité moyenne d'eau dans un organisme adulte est de 70 %, soit une quantité de quarante-cinq litres d'eau pour un adulte de 70 Kg. Le corps humain privé complètement d'eau pendant 3 jours accuse des graves troubles organiques. Deux ou trois jours de plus, cela peut conduire à la mort (Vasey C., 2007). Par conséquent, l'homme doit pouvoir disposer d'une certaine quantité d'eau pour sa vie et son bien-être. L'Organisation Mondiale de la Santé (O.M.S.) recommande vingt litres d'eau par jour par individu. Mais l'accès à cette ressource pose de sérieux problèmes dans plusieurs régions du monde. Selon l'O.M.S., 884 millions de personnes dans le monde n'ont pas accès à l'eau (O.M.S, UNICEF, 2010).

Les Objectifs du Millénaire pour le Développement (O.M.D.: objectif 7, cible 10) se donnent pour mission de réduire de moitié le nombre de personnes n'ayant pas accès à l'eau d'ici 2015. Malheureusement, toutes ces résolutions mettent l'accent sur la quantité d'eau nécessaire pour satisfaire les besoins essentiels de l'homme (usages personnels et domestiques) mais elles insistent peu sur sa qualité. En juillet 2010, l'Assemblée Générale des Nations Unies a adopté une résolution dans laquelle elle stipule que le droit à l'eau potable salubre et propre est un droit fondamental, essentiel au plein exercice du droit à la vie et de tous les droits de l'homme (O.N.U., 2010). Pour le Conseil Européen du Droit pour l'Environnement, chaque personne a droit à l'eau en quantité et en qualité suffisantes pour sa vie et sa santé (Smets H., 2002). Chaque année, 2,2 millions de personnes meurent des suites d'une maladie d'origine hydrique (Meierhofer R. and Wegelin M., 2002). L'eau de bonne qualité est donc essentielle à la vie. Si l'accès à l'eau potable ne constitue pas un problème dans les pays développés, les pays sous développés, par contre, sont confrontés à une crise aigue de l'approvisionnement en eau potable.

En République Démocratique du Congo (R.D.C.), seuls 26 % de la population ont accès à l'eau potable (PNUE, 2011). Le vieillissement des infrastructures, le sous investissement dans le secteur de l'eau et la croissance rapide de la population font que la couverture d'approvisionnement en eau potable décroît. Dans les zones rurales, sur 44 millions de personnes, seules 7,5 millions ont accès à une eau potable salubre. Dans les zones rurales, le secteur de l'eau est caractérisé par l'état délabré de son infrastructure: 60 % des stations de pompage ne sont plus opérationnelles. Ceci est dû au manque d'entretien d'infrastructures et de pièces de rechange. Dans ces conditions, 90 % de la population rurale s'approvisionnent dans les sources et puits peu profonds. Dans la plupart des cas, ces points d'approvisionnement (sources et puits) ne sont pas protégés et deviennent des sources potentielles de contamination. Ceci est à la base de graves problèmes de santé publique. Dans ces conditions, les initiatives tendant à promouvoir l'application des techniques de traitement de l'eau au niveau individuel ou familial devrait être encouragées (PNUE, 2011).

L'approche au niveau individuel ou familial consiste à faire bouillir de l'eau ou à faire usage des produits chlorés. L'ozonation et les lampes ultraviolettes sont aussi utilisées. Mais, toutes ces méthodes posent des problèmes.

La désinfection de l'eau par le solaire, une ancienne méthode, simple, devrait être une alternative pour la potabilisation de l'eau dans les pays en développement. Mais l'efficacité de celle-ci est mise en doute à cause des variations des conditions climatiques.

L'efficacité de cette dernière peut être améliorée par l'usage de l'oxygène singulet, (Taba et Luwenga, 1999 ; Aquacat, 2008 ; Sunda M. et *al.*, 2008). L'oxygène singulet, généré par l'action conjuguée d'un photosensibilisateur et de lumière (photosensibilisation), attaque et endommage la plupart des biomolécules et entraîne ainsi la mort cellulaire et tissulaire.

2. Questions de recherche

Nous nous intéresserons à la photosensibilisation dans le présent travail. Mais au préalable, rappelons l'origine de ce concept et son évolution dans le domaine de la désinfection de l'eau.

Le concept de photosensibilisation apparaît en 1898 quand Oscar Raab décrit pour la première fois le phénomène phototoxique: l'association d'un colorant et de lumière (les deux éléments pris séparément n'ayant pas d'action) pouvait générer l'oxygène singulet dans le milieu ; l'oxygène singulet généré entraîne la mort d'organismes vivants (Honigsmann H. et *al.*, 1996).

Une des premières études réalisées sur la désinfection de l'eau par photosensibilisation a été menée par Acher A. et Rosenthal I. en 1977. Lors de cette étude, le bleu de méthylène a été utilisé comme agent photosensibilisant. Le soleil fut utilisé comme source d'énergie (lumière) et une lampe ultraviolette comme source artificielle génératrice d'énergie. Une réduction de 100 % en coliformes fécaux a été notée. Quelques mois plus tard, une autre étude fut réalisée par Acher A. et Juven B. (1977) sur la désinfection et la détoxification de l'eau par photosensibilisation. Lors de cette étude, des abattements de l'ordre de $1,3 \times 10^9$ coliformes fécaux/100 ml ont été notés, après 30 minutes d'irradiation pour une concentration de 0,5 mg de bleu de méthylène. Ces résultats confirmèrent que cette méthode pouvait être utilisée pour la purification de l'eau (Acher A. et Juven B., 1977).

Cooper A. et Yogi D. (2002) étudièrent la détoxification et désinfection de l'eau par photosensibilisation avec le bleu de méthylène et l'éosine, sous la lumière solaire. Le benzène et le toluène ont été utilisés comme polluants organiques et *Escherichia coli* comme contaminant microbiologique. Lors de cette étude, Cooper A. et Yogi D. remarquèrent qu'aucun de deux photosensibilisateurs utilisés n'était efficace pour la détoxification. En ce qui concerne la désinfection de l'eau, une réduction de 99,5 % (abattement de l'ordre de 10^3 - 10^4 UFC/ml) a été notée pour le bleu de méthylène à une concentration de 10 mg/l après 5 minutes d'insolation. L'activité photosensibilisatrice remarquée pourrait être due à la génération des espèces réactives de l'oxygène, principalement l'oxygène singulet.

Plusieurs auteurs signalent que les réactions des espèces réactives de l'oxygène (stress oxydatif) interviennent également dans le mode d'action de certaines drogues et médicaments (Bors W. et *al.*, 1984 ; Clark I. et Cowden W., 1984). Tracy J.W et Webster L.T. (2001) ont

démontré que certains médicaments comme la quinine, chloroquine, artemisine, mefloquine et primaquine peuvent agir par un mécanisme de type stress oxydatif.

Certaines plantes, notamment celles utilisées dans la pharmacopée traditionnelle pour soigner les infections microbiennes et parasitaires, sont aussi capables de produire l'oxygène singulet. Ces plantes contiennent des chromophores, molécules responsables de leur coloration. Celles-ci, une fois dans l'eau et en présence d'une source d'énergie, sont capables d'absorber l'énergie et de passer de l'état fondamental à l'état excité. L'énergie emmagasinée est par la suite transférée à l'oxygène présent dans l'eau. Ce dernier passe dès lors de l'état fondamental à l'état excité, singulet, tout en endommageant les microorganismes présents dans l'eau (Taba K.M. et Luwenga E., 1999).

Lors de l'étude de la désinfection de l'eau par photosensibilisation avec les extraits de feuilles de plantes, Taba K.M. et Luwenga E. (1999) montrèrent que les extraits de feuilles de plantes de *Cassia alata*, *Cassia occidentalis* et *Carica papaya* avaient un effet photosensibilisateur, au regard de l'inactivation des microorganismes en présence de lumière. Par contre, il a été trouvé une activité bactéricide pour les extraits de *Cymbopogon stratus*, *Lantana camara* et *Hibiscus rosa simentis*, suite à l'inactivation des microorganismes tant à l'obscurité qu'en présence de lumière.

Malheureusement, Taba K.M. et Luwenga E. (1999), vu les conditions de leur travail, ne mirent pas en évidence le composé responsable de l'activité photosensibilisatrice trouvée dans les extraits de ces plantes. Seul l'isolement bioguidé des substances contenues dans ces extraits devrait permettre de relier avec certitude la nature du composé à la photosensibilisation.

Dans cette étude, plusieurs questions, dont les suivantes sont restées sans réponses:

- Quels sont les extraits qui présentent seulement un effet bactéricide ?
- Quels sont les extraits qui présentent un effet photosensibilisateur couplé à un effet bactéricide ?
- De ces extraits, quelles sont les classes de substances responsables de cet effet ?
- Existerait-il une corrélation entre la structure ou les propriétés physico-chimiques de ces composés et l'effet photosensibilisateur ?
- Par quel mécanisme ces composés agissent-ils ?

C'est dans ce cadre que le présent travail de recherche trouve sa justification, pour répondre à ces interrogations, afin d'envisager les applications de la photodynamique dans la désinfection de l'eau.

3. Objectifs

L'objectif général de ce travail est d'évaluer, puis de caractériser l'effet photosensibilisateur (E.F.) des extraits de plantes dans la désinfection de l'eau.

Les objectifs spécifiques sont les suivants:

- Connaître les extraits qui présentent un effet photosensibilisateur ;
- Mettre en évidence la classe de substances responsables de l'effet photosensibilisateur ;

- Identifier la (les) molécule(s) responsable de cette activité ;
- Evaluer l'activité photosensibilisatrice de celle(s)-ci ;
- Fixer la molécule résultante sur un support solide tel qu'un polymère ou un filtre.

Ces objectifs sont repris sur la figure 1.1., laquelle reprend les différentes étapes de travaux à réaliser dans le cadre de cette étude.

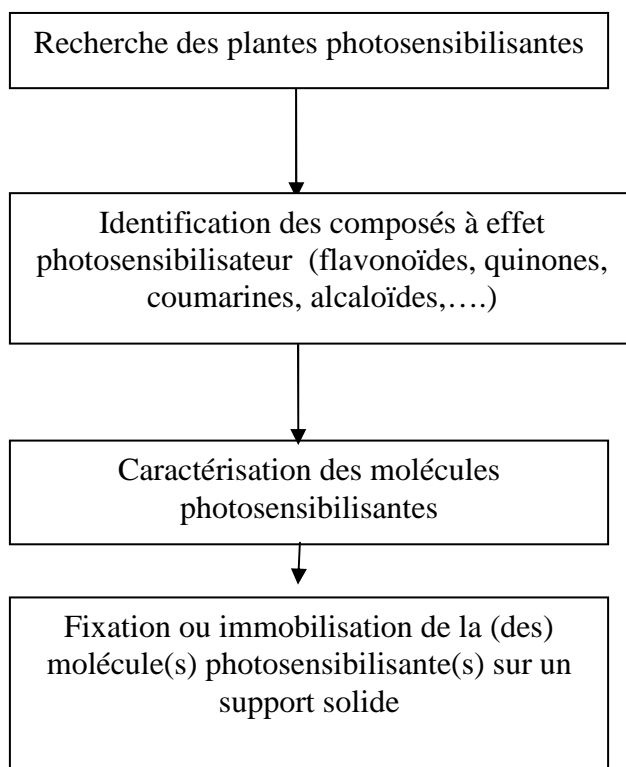


Figure 1.1.: Les différentes étapes de travaux à réaliser dans le cadre de cette étude.

En vue de mieux atteindre ces objectifs, quelques hypothèses de recherche seront vérifiées, notamment:

- Le bon rendement de la désinfection est lié à la présence de lumière ;
- La saturation du milieu en oxygène pur réduit le temps d'insolation ;
- L'efficacité du traitement est fonction du temps de séjour du photosensibilisateur dans l'eau ;
- L'action photodynamique n'est envisageable que lorsqu'il y a conjugaison de trois paramètres, à savoir, la lumière, le sensibilisateur et l'oxygène ;
- L'élimination des micro-organismes est liée à la concentration du photosensibilisateur ;
- Est-il possible de fixer la molécule photosensibilisante sans altérer son activité ?

Cette étude est subdivisée en deux sections : bibliographique et expérimentale.

La première, bibliographique, présente:

- La situation générale en matière de la qualité microbiologique de l'eau ;
- La notion de photosensibilisation.

La figure 1.2. montre les différentes étapes intégrées dans l'approche bibliographique de cette recherche: l'accès difficile à l'eau potable dans les pays en développement, les principales causes liées à ce problème, la solution envisagée (traitement de l'eau au niveau domestique: la chloration, l'ozonation, les lampes ultraviolettes, la désinfection solaire,..), l'amélioration de la désinfection solaire par la photosensibilisation.

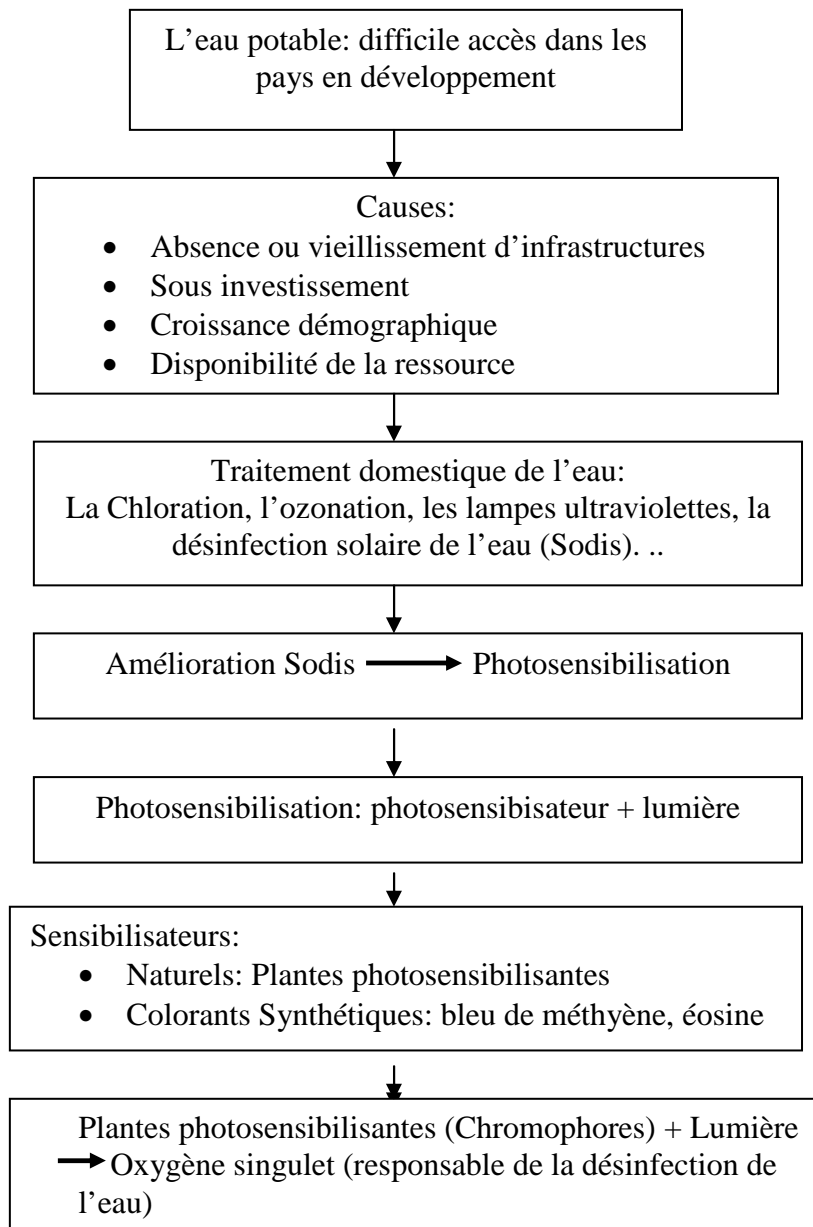


Figure 1.2.: Contexte bibliographique de cette étude.

La deuxième, expérimentale, présente:

- La stratégie de recherche
- La désinfection de l'eau par photosensibilisation avec les extraits de plantes (*Cassia alata*, *Cassia occidentalis*, *Carica papaya*, *Cymbopogon stratus*, *Coleus kilimandschari*, *Lantana camara* et *Hibiscus rosa simentis*) ;
- La désinfection de l'eau par photosensibilisation avec les huiles essentielles de *Citrus bergamia*, *Citrus limonum* et *Citrus reticulata* ;
- l'étude approfondie de la désinfection de l'eau par photosensibilisation avec l'huile essentielle de *Citrus bergamia* ;
- L'étude de la désinfection de l'eau par photosensibilisation avec le méthoxy-5 psoralène ;
- L'étude de la désinfection de l'eau par photosensibilisation avec le méthoxy-5 psoralène fixé sur le polystyrène ;
- Une discussion générale ;
- La conclusion et les perspectives.

La figure 1.3. montre les différentes étapes intégrées dans l'approche expérimentale de cette recherche, partant de la recherche de plantes photosensibilisantes, en passant par les familles et molécules responsables de cette activité jusqu'à la fixation de la molécule résultante sur un support solide.

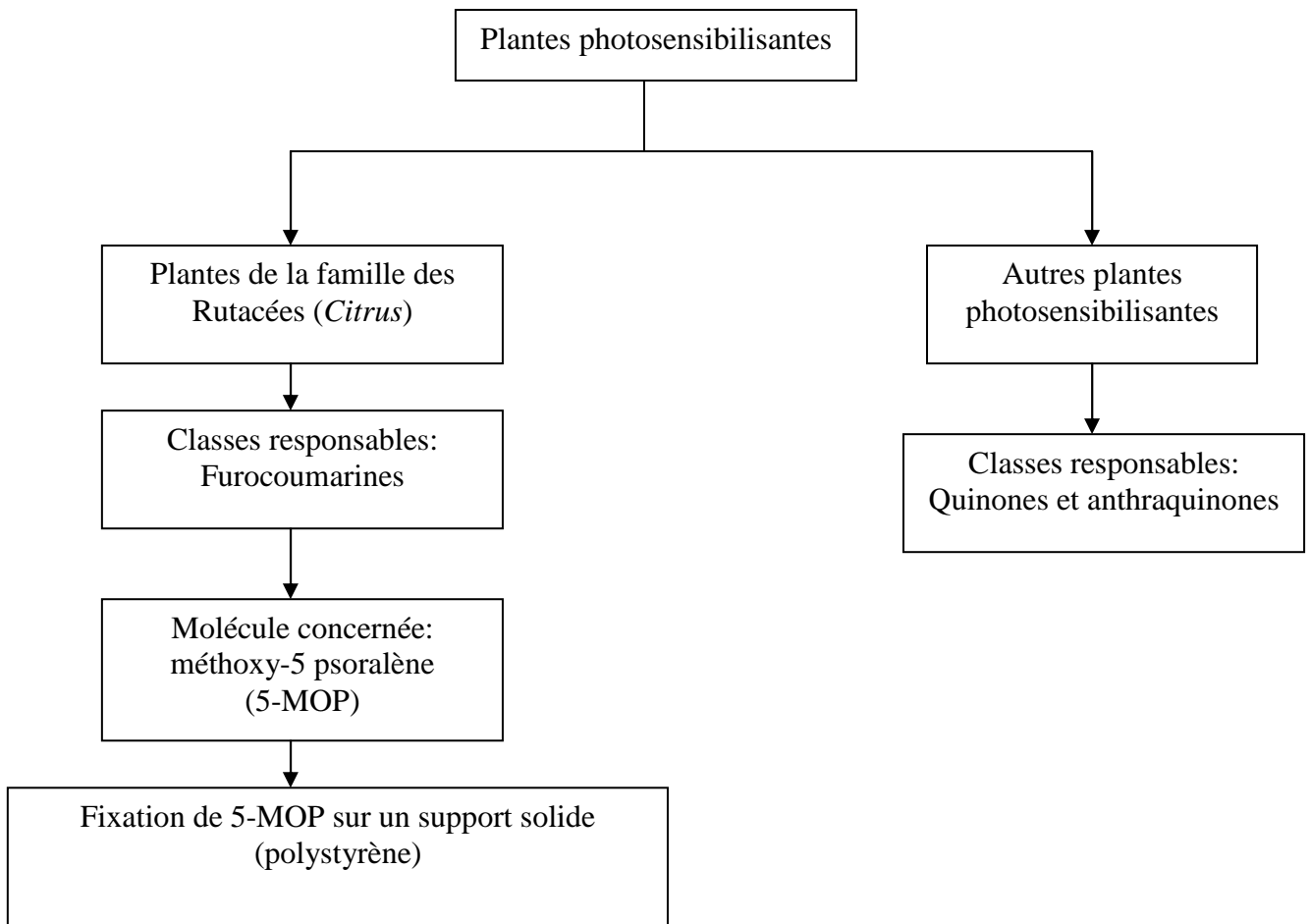


Figure 1.3.: Canevas général, Structuration du travail.

4. Références bibliographiques

Acher J. and Rosenthal I. (January 1977). Dye-sensitized-photooxydation a new approach to the treatment of organic matter in sewage effluents, *Water Research*, Volume 11, p.557-562.

Acher J. and Juven J. (May 1977). Destruction of coliforms in water and sewage water by dye sensitized photooxidation, *Applied and Environmental Microbiology*, Volume 33, n°5, p.1019-1022.

Aquacat (2008). L'utilisation de l'oxygène singulet pour la désinfection de l'eau potable, Cordis, Octobre.

Bors W., Saran M. and Tait D. (1984). Oxygen radicals in chemistry and biology, ed.w.de Gruyers, Berlin, 341-344p.

Clark I.A. and Cowden W.B. (1984). Antimalarias in oxidation stress, Academic Press, London, 187-201p.

Cooper A. and Yogi G. (2002). Evaluation of methylene blue and rose bengal for dye sensitized solar treatment, *Journal of Solar Energy Engineering*, Vol. 124, p. 305-310.

Honigsmann H., Jori G. and Young A. (1996). The Fundamental Bases of Phototherapy, OEMF spa - Milano, 265-284p.

Meierhofer R. and Wegelin M. (2002). Solar Water Disinfection: A guide for the application of Sodis (cited 2007 June 18).

Organisation des Nations Unies(O.N.U.) (2010). Déclaration de l'Assemblée Générale: L'accès à l'eau potable est un droit fondamental, Centre d'Actualités de l'ONU.

OMS / UNICEF (2010). Progress on sanitation and drinking water 2010 update, World Health Organization, Geneva.

Programme des Nations Unies pour l'Environnement (PNUE) (2011). Problématique de l'eau en République Démocratique du Congo, Rapport technique.

Smets H. (2002). Droit à l'eau, p.7.

Sunda M., Rosillon F. et Taba K.M. (2008). Contribution à l'étude de la désinfection de l'eau par photosensibilisation avec les extraits de plantes, *European Journal of Water Quality*, Tome 39, Volume 2, p. 199- 209.

Taba K.M. et Luwenga E. (1999). L'effet de la photosensibilisation des extraits de plantes dans la désinfection de l'eau, Med. Fac., Landbouww, Univ. Gent, 64/1.

Tracy J. and Webster L. (2001). Drug used in chemotherapy in protozoal infection In: Hardman J.G., Limbird L.E. and Gilman A.G. (editors). Goodman and Gilman's the pharmacological basis of theurapeutics, 10th edition, New York, Megraw Hill, 1069-1079p.

Vasey C. (2007). Quand le corps a soif, Edition Jouvence.

SECTION I : CONTEXTE BIBLIOGRAPHIQUE

CHAPITRE II

CHAPITRE II: SITUATION GENERALE RELATIVE A LA QUALITE MICROBIOLOGIQUE DE L'EAU

Ce chapitre présente brièvement le problème d'accès à l'eau potable et ses implications sur la santé publique. Les microorganismes permettant d'évaluer le risque sanitaire et les méthodes de désinfection de l'eau au niveau domestique sont également présentés.

1. Accès à l'eau potable

Environ 15 % de la population mondiale (plus d'un milliard), la plupart dans les pays en développement, n'ont pas encore accès à des systèmes améliorant l'approvisionnement de l'eau et sont par conséquent privés d'eau potable. Ces chiffres pourraient doubler d'ici 2015 (Gleick P.H., 2004 ; Villen L. et *al*, 2006). Les technologies suivantes sont considérées comme des « systèmes améliorant l'approvisionnement »: connexion des maisons au système d'adduction d'eau, forages, puits protégés, sources protégées et collecteurs d'eau de pluie (O.M.S., 2007). Mais la qualité de l'eau provenant des systèmes améliorant l'approvisionnement est souvent affectée par des manipulations peu fiables et surtout un entretien insuffisant. Le mauvais approvisionnement en eau potable conduit à un risque élevé d'infections d'origine hydrique telles que le choléra, la fièvre typhoïde, l'hépatite A, les amibiases ... Chaque année, 4 milliards de cas de diarrhées contribuent à la morbidité et mortalité de 6 millions de personnes, surtout dans les pays en développement (Thielman N. et Guerrant R., 1996 ; Reed R.H., 1997).

Il sied de rappeler que les Objectifs du Millénaire pour le Développement (O.M.D.) se donnent pour mission de réduire de moitié le nombre de personnes n'ayant pas accès à l'eau potable d'ici 2015. Si des progrès sont constatés dans ce domaine, il existe néanmoins des régions où la couverture en eau potable reste faible (voir figure 2.1. et tableau 2.1.). En effet, Selon l' UNICEF (2004), sur 1,1 milliard de personnes n'ayant pas accès à l'eau potable, plus de deux tiers se trouvent en Asie. L'Océanie et le continent Africain sont également concernés. En Afrique, ce problème se pose surtout dans la partie subsaharienne, où 42 % de la population n'ont pas accès à des systèmes améliorant la qualité de l'eau. En République Démocratique du Congo, seuls 26 % de la population ont accès à l'eau potable (PNUE, 2011). Les prévisions actuelles indiquent que malgré les progrès réalisés dans ce secteur, les OMD ne seront pas atteints (PNUE, 2011).

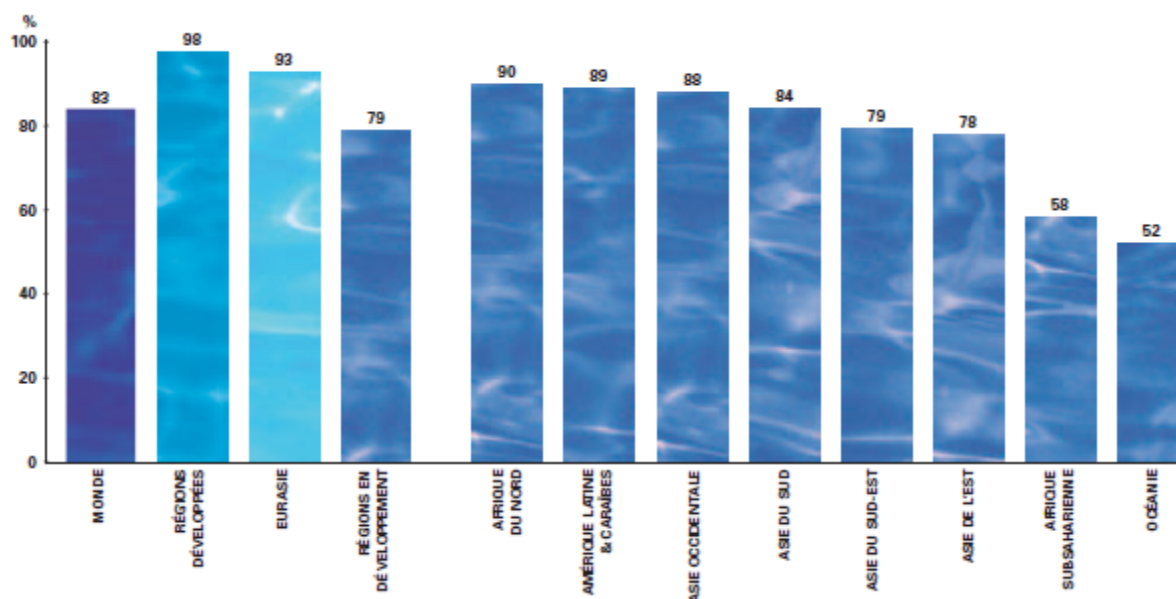


Figure 2.1.: Couverture en approvisionnement en eau potable dans les différentes régions du monde en 2002 (UNICEF / OMS, 2004).

Région	Situation en 1990/2000	Objectifs 2015 (Effort)
Afrique Subsaharienne	53/57	78,5(+21,5)
Asie Est + Pacifique	71/76	88(+12)
Asie sud	72/85	92,5(+7,5)
Amérique latine	82/86	93(+7)
Moyen Orient	82/87	93,5(+6,5)
Afrique du Nord		

Tableau 2.1.: Les OMD en matière d'approvisionnement en eau (% de la population avec accès à l'eau) (Académie de l'eau, 2004).

2. Le risque microbiologique de l'eau

Certains microorganismes pathogènes sont véhiculés par les eaux naturelles superficielles et souterraines (voir tableau 2.2.). Les contaminations microbiologiques des eaux sont essentiellement dues aux eaux résiduaires, aux déchets et aux excréments animaux et humains insuffisamment traités et / ou rejetés dans de mauvaises conditions dans le milieu naturel.

Les bactéries, souvent de provenance intestinale, furent et restent, dans de nombreux pays, à l'origine de grandes épidémies telles que le choléra ou la typhoïde. Elles sont également responsables de pathologies plus bénignes comme des gastro-entérites. La responsabilité de certains virus (poliovirus, Norwalk, hépatite A,...) dans l'apparition de maladies d'origine hydrique a aussi été démontrée, mais les arguments épidémiologiques sont, dans certains cas, moins bien établis, notamment en raison de difficultés d'isoler certains

de ces germes contenus dans les eaux (Potelon J. et Zysman K., 1993). En pratique, la recherche en routine des virus dans les eaux d'alimentation n'est toujours pas réalisée dans la plupart des pays en développement (Potelon J. et Zysman K., 1993). D'autres microorganismes contenus dans l'eau (helminthes, protozoaires dont amibes...) peuvent également présenter des risques pour l'homme (Craun G. et *al.*, 1997). Cependant, ils ne font pas l'objet de recherches systématiques dans le cadre des contrôles réglementaires de la qualité de l'eau.

Sur un plan général, les pathologies d'origine microbiologique sont fréquemment d'apparition brutale et massive et peuvent, de ce fait, toucher une importante population avec des effets à court ou moyen terme. Les personnes sensibles (enfants en bas âges, personnes immunodéprimées...) sont particulièrement exposées à la consommation d'une eau contaminée par des microorganismes. Ils n'en restent pas moins que divers travaux épidémiologiques ont montré l'existence « d'un bruit de fond » significatif des pathologies gastro-intestinales pour les populations régulièrement alimentées par des eaux de mauvaise qualité (Potelon J. et Zysman K., 1993).

Agents pathogènes	Effets aigus
Bactéries :	
Campylobacter jejuni	Gastro-entérites
<i>Escherichia coli</i> (souche pathogène)	Gastro-entérites
Leptospira	Leptosporidiose
Salmonella thyphi	Fièvre typhoïde
Vibrio cholera	Choléra
Yersinia ssp.	Gastro-entérites aiguës
Virus :	
Adénovirus	Infections respiratoires et gastro-entérites
Hépatite A	Hépatite infectieuse (foie, rein et rate)
Virus Norwalk	Gastro-entérites
Virus de poliomyélites	Poliomyélite
Rotavirus	Gastro-entérites
Protozoaires :	
Cryptosporidium parvum	Gastro-entérites
Giardia lamblia	Giardiase, diarrhées
Cyclospora cayetanensis	Gastro-entérites
Helminthes (Vers) :	
Trichiura	Asymptomatique ou divers symptômes
Ascaris lumricoides	Ascaris

Tableau 2.2.: Principaux agents pathogènes présents dans l'eau et maladies associées (Dorfman M., 2004).

2.1. Microorganismes indicateurs de contamination fécale

Il est théoriquement et techniquement difficile de contrôler dans l'eau de boisson tous les microorganismes pathogènes susceptibles d'engendrer des infections d'origine hydriques. En effet:

- la recherche de tous les germes pathogènes n'est pas concevable car d'une part certains d'entre eux ne sont pas identifiables dans la pratique courante des laboratoires et d'autre part, tous ne sont pas encore connus ;
- les germes pathogènes sont, en général, présents irrégulièrement dans les eaux de consommation. Or, il est impossible de les rechercher de façon continue ;
- les délais d'obtention des résultats d'analyses seraient dans un tel cas beaucoup trop long, pour permettre un contrôle efficace de la qualité de l'eau et donc une protection satisfaisante des consommateurs.

On doit donc s'efforcer de trouver des indicateurs, qui révèlent la présence possible de germes pathogènes ou, mieux encore, qui confirment leur absence.

Les germes pathogènes retrouvés dans l'eau sont en pratique toujours d'origine fécale. Or, il existe également des germes intestinaux, en principe non pathogènes, présents dans les déjections de l'homme et des animaux à sang chaud. En conséquence, on cherchera à identifier ces microorganismes non pathogènes, qui sont plus faciles, plus rapides et plus économiques à mettre en évidence. De tels microorganismes sont dits indicateurs ou germes tests (Voir tableau 2.3.).

L'identification de tels microbes permettra de conclure à une pollution d'origine fécale. Dans ce cas, l'eau sera considérée comme non potable et déclarée non-conforme. La suspicion d'une possible contamination par des germes pathogènes donnera lieu à une recherche plus approfondie. Divers travaux épidémiologiques menés ces dernières années ont confirmé que ces germes tests constituent un indice d'une pollution microbienne de l'eau induisant une augmentation des pathologies gastro-intestinales (Zimrou et *al.*, 1987 ; Potelon J. et Zysman K., 1993 ; Edberg S. et *al.*, 2000).

Par ailleurs, ces études ont montré que le risque sanitaire était proportionnel au nombre de germes tests dénombrés. Au contraire, l'absence de germes indicateurs ne signifie pas obligatoirement que l'eau est exempte de microorganismes pathogènes. On concluera seulement que l'échantillon prélevé n'est pas pollué par des matières fécales et de ce fait que l'eau ne présente pas de risques microbiologiques particuliers pour la santé humaine.

Au vu de ces précédentes remarques, l'importance accordée dans le choix de microorganismes indicateurs est fondamentale.

Un bon indicateur doit avoir les qualités suivantes :

- Etre systématiquement présent dans les fécès des humains et animaux à sang chaud et absent dans l'environnement non pollué ;
- Etre toujours présent avec les pathogènes d'origine fécale ;
- Etre plus résistant que les agents pathogènes ;
- Etre plus abondant que les pathogènes ;
- Ne pas proliférer dans la nature ;

- Etre facilement dénombrable par des méthodes peu coûteuses (Prescott M. et *al.*, 2003).

Microorganismes indicateurs
Coliformes fécaux
<i>Escherichia coli</i>
Entérocoques fécaux
Streptocoques fécaux
<i>Clostridium perfringens</i>

Tableau 2.3.: Quelques microorganismes indicateurs de contamination fécale.

Parmi les indicateurs de contamination fécale précédemment cités (voir tableau 2.3.), nous retiendrons pour le besoin de l'étude les deux indicateurs suivants: les coliformes fécaux et les entérocoques fécaux.

2.1.1. Les coliformes fécaux

Les coliformes fécaux (thermotolérants) sont un sous-groupe des coliformes totaux capables de fermenter le lactose à 44,5°C. *Escherichia coli* est l'espèce la plus fréquemment retrouvée dans ce groupe. L'intérêt porté à l'utilisation des microorganismes de ce groupe comme indicateur de contamination fécale est justifié par la similitude de leur comportement dans la nature avec celui des microorganismes pathogènes. En plus, leur concentration dans l'eau est proportionnelle au degré de pollution provoqué par la matière fécale (G.S.E., 2003).

2.1.1.1. Intérêt

Les coliformes sont intéressants car un très grand nombre d'entre eux vivent en abondance dans les matières fécales des animaux à sang chaud et de ce fait, constituent des indicateurs fécaux de la première importance. Par ailleurs, leur résistance aux agents antiseptiques et notamment le chlore et ses dérivés, est voisine de la résistance des bactéries pathogènes vis-à-vis desquelles ce type de traitement est instauré ; ils constituent donc des indicateurs d'efficacité de traitement.

2.1.1.2. Normes

Pour l'Organisation Mondiale de la Santé, une eau potable ne doit pas contenir de coliformes fécaux dans un volume de 100 ml (O.M.S., 1994 et 2000).

2.1.2. Les Entérocoques fécaux

Ce sont des streptocoques possédant la substance antigénique caractéristique du groupe D de Lancefield (*Enterococcus faecalis*, *E. faecium*, *E. durans*, *E. hirae*, *Streptococcus bovis*, *S.suis* et *S. equinus*). Ces streptocoques du groupe D sont généralement pris globalement en compte comme des témoins de pollution fécale, car tous ont un habitat fécal. Le nom d'entérocoques fécaux leur a été donné suite à l'analyse de leur génome. La persistance d'entérocoques fécaux dans la plupart des eaux et leur résistance aux agents désinfectants peut être supérieure aux autres microorganismes indicateurs. Ceci fait d'eux de bons indicateurs de contamination fécale (G.S.E., 2002).

2.1.2.1. Normes

Une eau potable ne doit pas contenir d'entérocoques fécaux dans un volume de 100 ml (G.S.E, 2002 ; US EPA, 2000).

3. Production d'eau potable dans les pays en voie développement

La plupart des populations rurales des pays en voie de développement sont alimentées en eau potable à partir de petites stations de traitement d'eau. Certaines d'entre elles ne fonctionnent pas correctement suite à un entretien insuffisant. D'autres sont carrément à l'arrêt suite au manque de pièces de rechange. En République Démocratique du Congo, le secteur rural est caractérisé par un réseau délabré. Ceci est dû au fait que 60 % des stations de pompes ne sont pas opérationnelles (P.N.U.E., 2011). Dans ces conditions, les populations rurales s'approvisionnent dans les sources et puits non protégés avec les risques que cela peut engendrer sur la santé.

Les zones urbaines des pays en voie de développement sont souvent alimentées à partir des usines de traitement de l'eau. Malheureusement, la plupart d'entre elles n'arrivent pas à approvisionner la population en eau potable (voir point 3.1.). Quand celle-ci est desservie, sa qualité n'est souvent pas satisfaisante. Les forages et les bornes fontaines sont aussi utilisés. Mais l'eau provenant de ces systèmes est souvent contaminée par des manipulations peu fiables et un entretien insuffisant. Dans ce contexte, le traitement de l'eau au niveau domestique s'avère nécessaire et doit être encouragé.

3.1. De l'approche centralisée aux traitements individuels

Les gouvernements des pays en voie de développement, par le passé, ont fait d'importants efforts à travers l'installation d'usines de traitements sophistiqués et des systèmes publics d'adduction d'eau, en particulier en milieu urbain. Toutefois, les usines de traitements d'eau conventionnelles échouent souvent dans leurs tâches à produire une eau potable de qualité. Le manque d'opérateurs compétents, de produits chimiques et des pièces de rechanges disponibles et fiables, associé à des contraintes financières, entrave toute fonctionnalité et maintenance du système. Le manque d'eau conduit à des interruptions fréquentes de l'adduction d'eau et les fuites du réseau de distribution compliquent davantage la situation. De plus, la croissance rapide de la population urbaine ajoute un stress supplémentaire sur les infrastructures d'eau et d'évacuation des déchets existantes et crée d'énormes problèmes dans la planification et la construction de toute nouvelle infrastructure. Par conséquent, les habitants des centres urbains ainsi que la population rurale n'ont souvent

accès qu'à une eau de qualité insuffisante. Chaque ménage est de ce fait responsable du traitement de l'eau destinée à sa propre consommation. En Haïti, par exemple, dans la plupart des zones urbaines, l'approvisionnement en eau potable en réseau est irrégulier. Quand l'eau est desservie, sa qualité n'est toujours pas garantie.

Des centaines de millions de personnes n'auront pas accès à de l'eau potable si seules des approches basées sur des solutions centralisées nécessitant du temps et d'importantes ressources sont appliquées. Les approches qui visent à promouvoir des interventions au niveau de l'habitat individuel devraient être encouragées (Meierhofer R. et Wegelin M., 2002). Les méthodes suivantes de traitement de l'eau sont en général recommandées pour réduire la contamination fécale de l'eau potable au niveau domestique: l'ébullition de l'eau, la filtration, la chloration et la désinfection solaire de l'eau.

3.2. Quelques méthodes de traitement de l'eau au niveau individuel

3.2.1. Désinfection de l'eau par ébullition

La désinfection de l'eau par ébullition consiste à porter l'eau à l'ébullition pendant quelques minutes. Pendant cette opération, les pathogènes viraux, parasitaires et bactériens sont inhibés (Dewolf M., 1986). Le plus grand désavantage de cette méthode réside dans son coût énergétique important qui la rend insoutenable du point de vue économique et environnemental. Dans les milieux ruraux, les paysans trouvent le bois de chauffage dans la forêt. Cette pratique peut conduire à la déforestation.

3.2.2. La filtration

Pour éliminer les microorganismes, des filtres simples sont utilisés au niveau domestique (filtres bougie céramique, filtres cailloux et sable). Malheureusement, ces filtres n'éliminent pas tous les microorganismes. En plus, ces filtres nécessitent une maintenance attentive. Ceux-ci doivent être régulièrement nettoyés même s'ils ne sont pas colmatés. Pour éviter autant que possible que l'eau ne passe à travers le filtre sans être filtré, en coulant par exemple par une fissure, ces filtres doivent être régulièrement inspectés et remplacés (Cas des filtres en céramique)(Howard G., 2004). En outre, les filtres disponibles sur le marché sont relativement coûteux et les filtres réalisés avec les matériaux disponibles localement sont généralement d'une efficacité limitée pour l'amélioration de la qualité microbiologique de l'eau. A cause de toutes les raisons évoquées ci-dessus, certains utilisateurs préfèrent combiner cette méthode à l'ébullition.

3.2.3. La chloration

Le chlore est le désinfectant le plus utilisé pour la désinfection de l'eau. Malheureusement, ce dernier, en contact avec la matière organique, génère des sous produits, notamment les trihalométhanes qui sont cancérigènes (Vogt C. et Regli S., 1981 ; Morris R. et *al.*, 1992 ; Wei C. et *al.*, 1994 ; Gamage J. et Zhang Z., 2010). Une étude épidémiologique attribue des malformations cardiaques à la consommation habituelle par des parents, avant procréation, d'eau contenant des hydrocarbures organochlorés (Goldberg S.J. et *al.*, 1990). Une autre étude réalisée aux Etats-Unis tend à prouver que 9 % des cancers de la vessie et 15 % des cancers de colon sont dus à la consommation journalière de l'eau de distribution obtenue à partir d'eau de surface chlorée (Morris R.D. et *al.*, 1992). En plus, l'approvisionnement en chlore est difficile dans les milieux ruraux et son utilisation exige la

maîtrise du dosage. Aussi, l'eau traitée avec du chlore a un goût que beaucoup d'utilisateurs n'apprécient pas. Ce désagrément est provoqué par le chlore qui reste dans l'eau après la désinfection. Par ailleurs, des cartouches de chlore peuvent être directement placées dans le puits mais la diffusion du chlore est irrégulière et son dosage aléatoire. Cette pratique ne garantit pas la potabilité de l'eau du puits.

3.2.4. La désinfection solaire de l'eau

La désinfection de l'eau par le soleil (Sodis) est une méthode de traitement simple qui utilise le rayonnement solaire (lumière UVA : 320 – 400 nm et la température) pour détruire les microorganismes présents dans l'eau. Son efficacité à éliminer les microorganismes dépend aussi de la température atteinte lors de l'exposition au soleil et des conditions climatiques et météorologiques. De l'eau microbiologiquement contaminée est placée dans des récipients transparents et est exposée en plein soleil pendant 6 heures, si le ciel est complètement dégagé (Meierhofer R. et Wegelin M., 2002). Si le ciel est nuageux, le temps d'exposition passe de six heures à deux jours. Malheureusement, l'intensité de l'UVA est sujette à des variations dues aux conditions climatiques et journalières (Meierhofer R. et Wegelin M., 2002). Ces variations remettent en cause l'efficacité de cette méthode. Cependant, cette méthode de désinfection par le soleil peut être améliorée par l'usage de l'oxygène singulet, généré par l'action combinée d'un sensibilisateur et de lumière. Il s'agit de photosensibilisation qui fait l'objet de ce travail.

4. Conclusion

L'accès à l'eau potable demeure un problème préoccupant dans plusieurs régions du monde. Le manque d'eau potable est à la base de plusieurs maladies d'origine hydriques, notamment le choléra, la typhoïde, l'hépatite... Les microorganismes (germes pathogènes) responsables de ces maladies sont difficiles à déterminer dans les pratiques courantes de laboratoire. Les indicateurs de contamination fécale (Coliformes fécaux, Entérocoques fécaux, Clostridium sulfite-réducteur,...), qui révèlent la présence ou non des pathogènes, sont alors utilisés pour évaluer la qualité microbiologique de l'eau. Dans le cadre de ce travail, les coliformes fécaux (Gram-) et entérocoques fécaux (Gram+) seront utilisés comme microorganismes indicateurs.

Par ailleurs, les populations des pays en développement sont alimentées en eau potable grâce à la connexion au réseau d'adduction, aux bornes fontaines, aux forages, puits et sources protégées. Mais l'eau provenant de ces systèmes est souvent contaminée par des manipulations peu fiables et un entretien insuffisant. Ceci peut conduire à des graves problèmes de santé publique. En République Démocratique du Congo, par exemple, seuls 26 % de la population ont accès à l'eau potable. Dans les milieux ruraux, sur 44 millions de la population, seulement 7,5 millions ont accès à l'eau potable (PNUE, 2011). Pour résoudre ces problèmes, il est important de promouvoir des méthodes de désinfection de l'eau au niveau domestique. Les méthodes courantes de désinfection de l'eau au niveau domestique (l'ébullition, la chloration, l'ozonation et les lampes germicides) posent toutes des problèmes. La désinfection solaire est préférée à toutes ces méthodes. Mais, son efficacité est mise en doute à cause du manque d'indicateur d'exposition de l'eau au soleil et à des variations des conditions climatiques. Mais elle peut être améliorée par l'usage de l'oxygène singulet généré par l'action conjuguée d'un photosensibilisateur et de lumière (photosensibilisation).

5. Références bibliographiques

Académie de l'eau (2004). De l'eau pour tous, un aperçu des travaux menés sur le droit à l'eau potable et la solidarité pour l'eau, Académie de l'eau, 34p.

Craun G., Berger P. and Calderon R. (1997). Coliforms bacteria and water born disease outbreaks, *Journal of the American water works Association*, 89(3), p.96-104.

Dewolf M. (1986). Boiling Drinking Water: A critical look, *Water lines*, Vol. 5, n°1, IT Publications, London.

Dorfman M. (2004). Testing the water: A guide to water Quality and vocation beaches, NRDC, p.8-9.

Edberg S., Rice W., Karlin R. and Allen M. (2000). *Escherichia coli*, total coliforms and fecal coliforms population as indicators of waste water treatment efficiency, *Water Environment, Res.*, 71, p.332-339.

Gamage J. and Zhang Z. (2010). Application of photocatalytic disinfection, *International journal of photoenergy*, Volume 2010, Article ID764870.

Gleick P.H. in Gleick P.H. (2004). World's Water 2004-2005, Island Press, Washington, p.1.

Goldberg S.J., Lebowitz D., Graver E. and Hicks S. (1990). An association of human congenital cardiac malformations and drinking water malformation, *J. Am. Coll. Card.*, 16, p. 155-164.

Groupe Scientifique de l'Eau (G.S.E.) (2002). Entérocoques et Streptocoques fécaux: Dans Fiches synthèses sur l'eau potable et la santé humaine, Institut National de Santé Publique du Québec, 5p.

Groupe Scientifique de l'Eau (G.S.E.) (2003). Coliformes fécaux: Dans Fiches synthèses sur l'eau potable et la santé humaine, Institut National de Santé Publique du Québec, 3p.

Howard G. (2004). Villages santé: Guide des communautés et des agents de santé communautaires, O.M.S., Genève, 33p.

Meierhofer R. and Wegelin M. (2002). Solar Water Disinfection: A guide for the application of SODIS (cited 2007 June 18).

Morris R.D., Audet A.M., Angetillo I.F., Chalmers T.C. and Mosteller F. (1992). Chlorination, chlorination by products and cancer. A meta analysis, *Am. Jour. of Public Health*, Vol. 82, n°7, p. 955-963.

O.M.S. (1994). Directive de qualité pour l'eau de boisson, Volume 1, Recommandation, Organisation Mondiale de la Santé, 2^{ième} édition, 202p.

O.M.S. (2000). Directive de qualité pour l'eau de boisson, volume 2, Critères d'hygiène et documentation à l'appui, Organisation Mondiale de la Santé, 2^{ième} édition, 1050p.

O.M.S. (2007). Combating Waterborne Disease at the Household level. International Network to promote Household Water treatment and Safe storage, World Health Organization, Geneva.

Potelon J.L. et Zysman K. (1993). Guide des analyses d'eau potable. Editions de La lettre du Cadre Territorial, p. 143-145.

Prescott M., Harley P. et Klein A. (2003). Microbiologie, 2^{ème} édition Française, De boeck, 654p.

Programme des Nations Unies pour l'Environnement (P.N.U.E.E.) (2011). Problématique de l'eau en République Démocratique du Congo, Rapport technique.

Reed R.H. (1997). Solar inactivation of faecal bacteria in water: the critical role of oxygen, *Letters in Applied Microbiology*, 24, p. 276-280.

Thielman N.M. and Guerrant R.L. (1996). From Rwanda to Wisconsin: The global relevance of diarrhoeal diseases, *Journal of Medical Microbiology*, 44, p. 155-156.

UNICEF/O.M.S. (2004). Atteindre les OMD en Matière d'eau potable et d'assainissement, NLM: WA 675, 9p.

US EPA (2000). National primary drinking water regulations: ground water rule, proposed rules, Federal Register (10), p.30194-30272.

Villen L., Manjón, F., García F. D. and Orellana G. (2006). Solar Reactor for Water Disinfection by Sensitized Singlet Oxygen Production in Heterogeneous Medium, *Appl. Catal.*, 69, p.1-9.

Vogt C. and Regli S. (1981). Controlling THM while attaining disinfection, *JAWWA*, p. 383-396.

Wei C., Lin W., Zainal Z., Williams N.E., Zhu K., Kruzic A.P., Smith R.L. and Rajeshwar K. (1994). Bactericidal activity of TiO₂ photocatalyst in aqueous media: Toward a solar-assisted water disinfection system, *Env. Sci.Techn.*, 28(5), p.934-938.

Zmirou D., Ferley P., Collin J., Charrel M and Berlin J. (1987). A follow-up study of gastrointestinal disease related to bacteriologically substandard drinking Water, *Am. Journal of Public Health*, 77, p.582-584.

CHAPITRE III

CHAPITRE III: LA PHOTOSENSIBILISATION

Ce chapitre décrit la photosensibilisation, technique d'obtention d'oxygène singulet à partir d'un photosensibilisateur et de lumière. La double nature de la lumière, les photosensibilisateurs naturels et les différentes applications de l'oxygène singulet sont également présentés.

La photosensibilisation est une réaction au cours de laquelle l'oxygène singulet est généré par l'action combinée d'un photosensibilisateur et d'une source de lumière. L'oxygène singulet généré est utilisé pour la désinfection de l'eau (voir figure 3.1.).

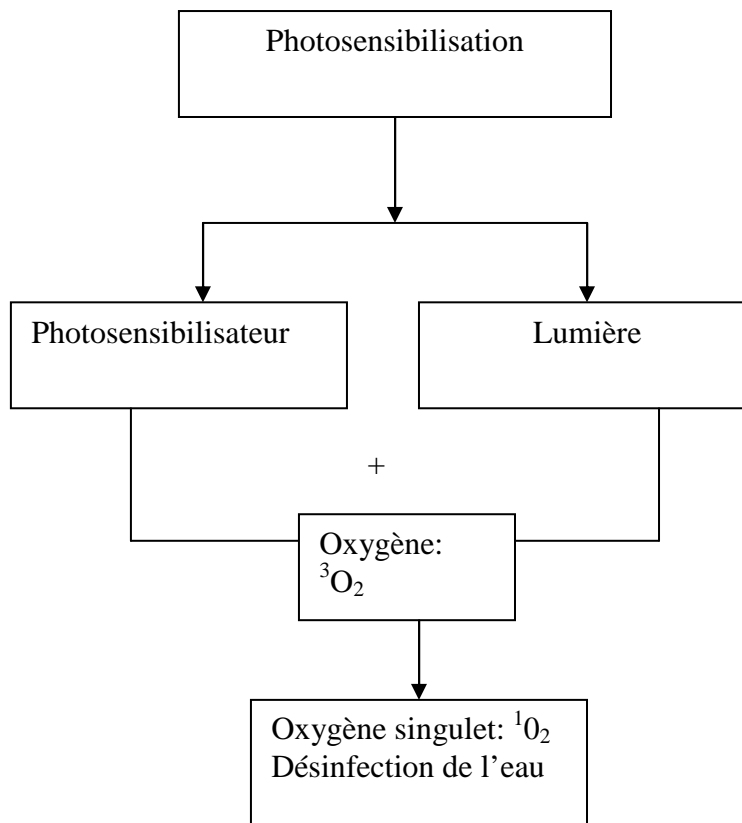


Figure 3.1.: Production d'oxygène singulet à partir d'un photosensibilisateur et de lumière.

Dans la partie qui suit, nous passerons en revue les éléments qui interviennent lors du phénomène de photosensibilisation: la lumière, les photosensibilisateurs et l'oxygène singulet.

1. La lumière

1.1. Historique

Deux théories sur la nature de la lumière s'affrontèrent pendant plus de deux siècles: la théorie corpusculaire et la théorie ondulatoire.

C'est Isaac Newton qui observa le premier que la lumière est constituée de particules de masses différentes qui provoquent sur la rétine de l'œil humain une sensation: les couleurs. Cette théorie arrivait à expliquer valablement la propagation rectiligne et la réflexion de la lumière. Mais celle-ci n'était pas en mesure d'expliquer clairement le phénomène de réfraction. Malgré ses limites, elle s'imposa jusque 1727.

Plus tard Christian Huygens considéra la lumière comme une vibration se transmettant dans un milieu donné (éther). Cette observation lui permit d'expliquer le phénomène de diffraction. En 1801, Thomas Young arriva à observer ce phénomène et mesura les longueurs d'onde de la lumière. En 1819, Augustin Fresnel précisa la nature transversale des ondes lumineuses et expliqua le phénomène de polarisation.

La vitesse de la lumière fut mesurée plus tard par Hyppolite Fizeau (1849), puis par Léon Foucault, qui observèrent que celle-ci était plus faible dans l'eau comparée à sa propagation dans l'air. Cette expérience confirma la nature ondulatoire de la lumière et permit la confirmation de la théorie ondulatoire. La nature électromagnétique de cette onde sera précisée en 1873 par James Clerk Maxwell (Roussel J., 2009).

1.2. Effet photoélectrique

Heinrich Hertz découvra en 1886, grâce à ses travaux sur l'électromagnétisme, l'effet photoélectrique (émission d'un électron par un métal sous l'action d'un rayonnement lumineux). En 1900, Lenard remarqua que seuls les rayonnements de faible longueur d'onde arrivaient à induire ce phénomène (photoémission) quelle que soit l'intensité du rayonnement incident. Mais ce phénomène ne pouvait pas être expliqué par la physique classique qui considère le rayonnement électromagnétique comme une onde. En 1905, grâce à la théorie du quanta découvert en 1900 par Marx Planck, Einstein arriva à expliquer ce phénomène en considérant la lumière comme un flux de particules (photons) doté d'une énergie dépendant non de l'intensité du rayonnement mais de sa longueur d'onde. Chaque photon possède une énergie $E=h\nu$, où ν : la fréquence du rayonnement et h : la constante de Planck. Einstein comprit que l'effet photoélectrique se traduit par l'absorption de certains photons par le métal: lorsque l'énergie du photon est supérieure à celle liant un électron d'un atome du métal, l'électron quitte l'orbitale atomique en acquérant une énergie cinétique et produit un courant électrique. Cette observation contribua beaucoup à l'avancement de la théorie quantique et permit de reconsidérer la nature corpusculaire de la lumière (Séguin M. et *al.*, 2010).

Les deux points de vue, corpusculaire et ondulatoire, apparemment incompatibles, furent rassemblés par Louis de Broglie en 1925 (dualité onde-corpuscule).

1.3. Le spectre électromagnétique

Le spectre électromagnétique représente la décomposition du rayonnement électromagnétique en ses différentes composantes en fonction de l'énergie (longueur d'onde).

Les différentes couleurs que présente ce spectre sont les suivantes: Violet, bleu, vert, jaune, orange et rouge. Plus tard, d'autres rayons furent découverts. Ceux-ci sont tous invisibles à l'œil humain: rayons gamma, rayons x, ultraviolets, infra-rouges, micro-ondes et ondes radio (voir figure3.2.). Dans le cadre de ce travail, seul le spectre UV-visible de lumière nous intéressera.

En ce qui concerne le spectre ultraviolet (U.V.), il est composé de trois zones:

UVA: est constituée des rayonnements de longueur d'onde comprise entre 320 et 400 nm. Ils représentent 95 à 98 % des U.V. qui atteignent la surface de la terre.

UVB: est constituée des rayonnements de longueur d'onde comprise entre 290-320 nm et augmentent de 4 % tous les 300 mètres d'altitude. Ces derniers atteignent partiellement la surface de la terre et constituent de 2 à 5 % des U.V. observés sur terre. La diminution de la couche d'ozone permettrait une bonne transmission des UVB.

UVC: est constituée des rayonnements de longueur d'onde inférieure à 290 nm. Ceux-ci sont absorbés par la couche d'ozone.

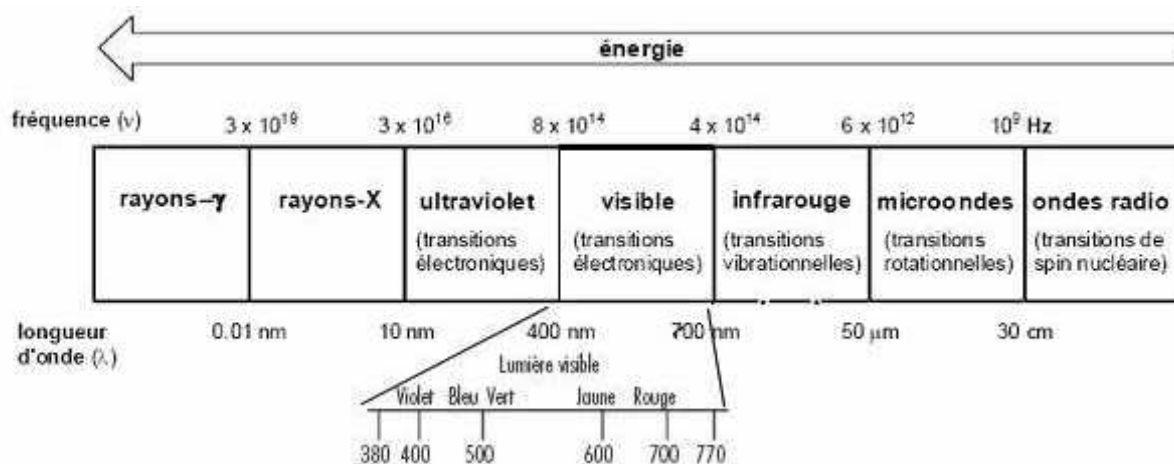


Figure 3.2.: Spectre électromagnétique (Gallo R., 2009).

1.4. L'absorption de la lumière

Lorsqu'une molécule absorbe un photon incident, il en résulte un déplacement des électrons de l'état fondamental (état électronique le moins énergétique) à l'état excité (état électronique plus énergétique par rapport à l'état fondamental).

L'absorption d'énergie se fait par étapes ; chaque étape ou transition consiste en l'absorption d'un quanta d'énergie (photon). L'énergie correspondant à ce photon est donnée par la relation de Planck $E=h\nu$ (h : constante de Planck et ν : fréquence de lumière).

L'énergie minimale requise pour une transition électronique est comprise entre 30-40 kcal/mol. Celle-ci correspond à la lumière rouge (700-800 nm). L'énergie maximale est de 140 kcal/mol et cela correspond à l'ultraviolet (200 nm). Les radiations supérieures à 800 nm sont moins énergétiques pour provoquer une transition électronique et inférieures à 200 nm sont très énergétiques, car elles peuvent conduire à l'ionisation de la molécule (dissociation de la molécule).

1.5. Transitions électroniques

Lorsqu'une molécule absorbe un photon d'une longueur d'onde appropriée, celle-ci passe de l'état fondamental à l'état excité. Ceci correspond à la promotion d'un électron dans l'orbitale inoccupée d'énergie supérieure, une orbitale étant une zone de l'espace où la probabilité de trouver un électron est élevée. Il existe des orbitales atomiques et moléculaires.

L'orbitale moléculaire sigma (σ) est constituée du recouvrement de deux orbitales atomiques s, ou d'une orbitale atomique s et d'une orbitale atomique p. Ces recouvrements conduisent à la formation des liaisons sigma (σ). L'orbitale moléculaire p est constituée du recouvrement de deux orbitales p. Ces recouvrements conduisent à la formation des liaisons π . Une molécule organique comportant une double liaison, est en réalité constituée d'une liaison π et d'une liaison sigma (σ). L'absorption d'un photon par une telle molécule fait passer les électrons pi de l'orbitale p vers l'orbitale p antiliante, en provoquant une transition π - π^* .

Les transitions n - π^* peuvent aussi être observées. Celles-ci sont observées dans les molécules comportant un hétéroatome. En effet, les atomes tels que l'oxygène ou l'azote contiennent des paires d'électrons non liantes sur les orbitales n (Valeur B., 2004).

L'énergie de transition électronique varie selon la séquence suivante:

$$n - \pi^* < \pi - \pi^* < n - \sigma^* < \sigma - \pi^* < \sigma - \sigma^*$$

Pour bien comprendre la notion de transition électronique, prenons l'exemple de la molécule du méthanal, une molécule organique comportant un seul carbone avec une fonction aldéhyde. Lorsque cette molécule absorbe un photon d'énergie, un électron non liant (n) de l'oxygène passe dans l'orbitale π^* , localisée pour moitié dans le carbone et pour moitié dans l'oxygène (transition n- π^*).

Deux orbitales sont à considérer dans le cas de la spectroscopie d'absorption et de la fluorescence: Orbitale moléculaire occupée de haute énergie (HOMO: highest occupied molecular orbital) et orbitale moléculaire inoccupée de basse énergie (LUMO: lowest unoccupied molecular orbital) (voir figure 3.3.). Dans le présent exemple du méthanal, HOMO correspond à l'orbitale n et le LUMO à l'orbitale π^* .

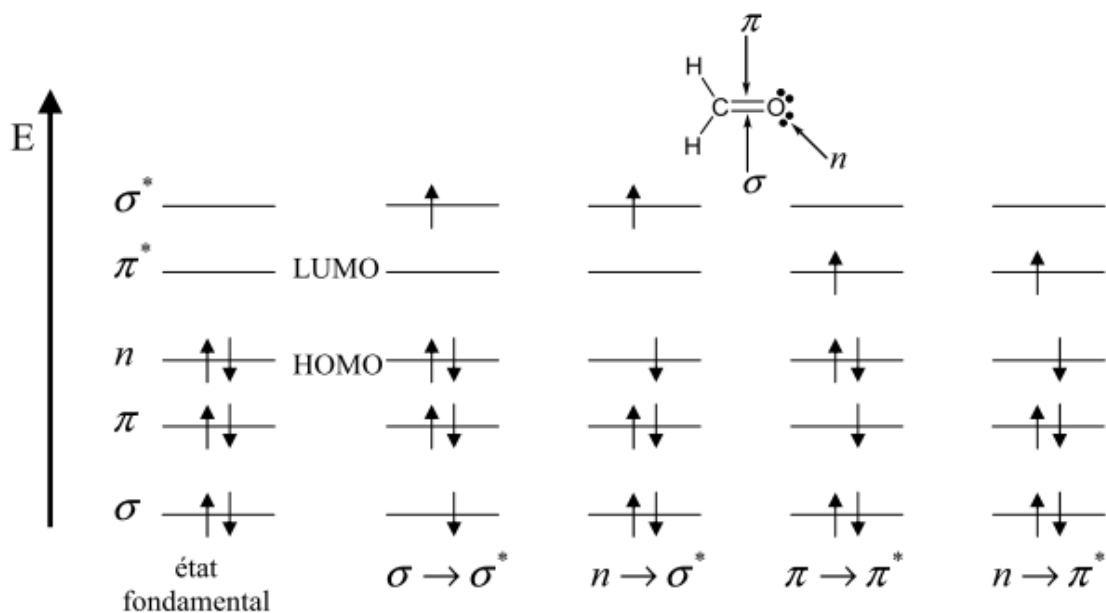


Figure 3.3.: Niveaux d'énergie des orbitales moléculaires dans le formaldéhyde et différentes transitions électroniques (Valeur B., 2004).

2. Les photosensibilisateurs

Un photosensibilisateur, généralement un colorant, est une molécule capable d'être excitée par capture d'un photon et de transférer son énergie à un composé accepteur d'énergie (voir figure 3.4.). Ce processus commence avec l'excitation du sensibilisateur à son état singulet, suivi par un transfert d'énergie à un composé accepteur. Ceci conduit à un produit à l'état singulet. Mais, si le singulet du sensibilisateur initialement formé se change dans un état triplet (comme beaucoup de composés carbonyles le font), le transfert d'énergie peut se passer avec conservation du spin total et l'accepteur sera élevé directement dans son état excité triplet.

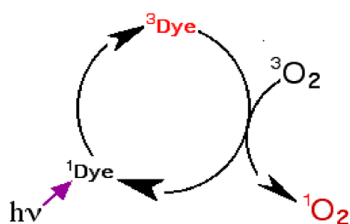


Figure 3.4.: Le photosensibilisateur à l'état fondamental (^1Dye : Singulet) est excité et passe à l'état triplet (^3Dye). Il se désexcite en transférant son énergie à l'oxygène fondamental qui devient singulet, tandis que l'électron retourne sur son orbitale primitive (de basse énergie). (Engel P.S. et Schexnayder M.A., 1972 ; Engel P.S. et Schexnayder M.A., 1975).

L'accepteur peut ensuite réagir photochimiquement à partir de cet état excité. En fait, presque tous les photosensibilisateurs sont des sensibilisateurs d'état triplet. Cela peut avoir une influence sur le produit final, car la réaction à travers un état triplet peut être différente du chemin emprunté par l'état singulet (Engel P.S. et Schexnayder M.A., 1972 ; Engel P.S. et Schexnayder M.A., 1975).

Il existe plusieurs types de photosensibilisateurs absorbant dans le spectre UV-Visible de lumière (bleu de méthylène, éosine, rose de bengal, Porphyrine, furocoumarines, quinones...). Dans le cadre de ce travail, nous nous limiterons aux photosensibilisateurs naturels d'origine végétale. Nous les avons subdivisés en deux classes:

- Les plantes de la famille des Rutacées ;
- Les autres plantes utilisées dans la pharmacopée traditionnelle.

2.1. Les plantes à activité photosensibilisatrice

Comme dit précédemment, dans le cadre de cette étude, nous nous intéresserons donc aux photosensibilisateurs d'origine végétale.

2.1.1. Plantes de la famille des Rutacées

Certaines plantes, utilisées dans la pharmacopée traditionnelle pour soigner les infections microbiennes et parasitaires, sont supposées réagir par un mécanisme de type « stress oxydatif ». Ces plantes sont signalées par plusieurs auteurs comme comportant des molécules photosensibilisantes (chromophores) (Towers G., 1985 ; Chenu J., 1992 ; Ongoka P. et *al.*, 2007). En présence de lumière, ces molécules peuvent initier une réaction de photosensibilisation. Certaines de ces plantes sont celles appartenant à la famille des Rutacées, notamment *Citrus limonum*, *Citrus bergamia*, *Citrus reticulata*, etc.. L'activité photodynamique trouvée dans ces plantes est due principalement aux furocoumarines (Zacher K.D. et Ippen H., 1984 ; Naganuma et *al.*, 1985 ; Weisenseel P. et Woitalla S., 2005).

2.1.1.1. *Citrus limonum*

Répartition géographique et description morphologique

Le Citronnier (*Citrus limonum*) est un petit arbre de la famille des Rutacées, cultivé dans les régions méditerranéennes et tropicales pour son fruit, le citron. Son origine est asiatique. Cet arbre de taille variant entre 3 et 5 m, vigoureux, affectionne les sols non calcaires sous un climat humide et chaud. Sa longévité naturelle peut approcher les deux cents ans, mais les arbres utilisés en culture de production ne dépassent pas l'âge de cinquante à soixante ans. Le citron est un fruit constitué d'une baie cortiquée. Cet agrume de taille moyenne (5 à 10 cm) est dit limoniforme c'est-à-dire, ovoïde et avec, à l'extrémité stylaire, un mamelon souvent cerné d'une dépression circulaire. La peau du citron est appelée zeste. Elle est brillante et d'une couleur variant du vert au jaune vif selon la maturité du fruit (Naganuma et *al.*, 1985 ; Marin C. et *al.*, 2000 ; Zhiri A. et Baudoux D., 2009).



Photo 3.1.: *Citrus limonum* (Peterson J.S., 2004)

Description botanique

- Nom botanique : *Citrus limonum*
- Famille : Rutacées
- Règne : *plantae*
- Division : *magnoliophyta*
- Classe : *magnoliopsida*
- Ordre : sapindales

Noms synonymes

- Français: Citronnier
- Italie: Limone
- Anglais: Lemon
- Allemand: Zitrone
- Arabe: Lymon et Limoun

Composition chimique du zeste

- Monoterpènes (80,03 %), Sesquiterpènes (18,57 %), Monoterpenole (0,15 %), aldéhydes (0,49 %), alcools (0,72 %)
- Flavonoïdes: hétérosides de flavonones (néohes péricosides et hespéricosides)
- Naringoside, ériodyctroside, ériocitroside, autres flavonoïdes (diosmine, rutoside)
- Citroflavonoïde
- Caroténoïde
- Acide organique: acide citrique, acide malique, acide ascorbique
- Furocoumarines (Méthoxy-5 psoralène, bergamottine, oxypeucedanine....)
(Naganuma *et al.*, 1985 ; Sue C., 2004 ; Muhammad *et al.*, 2006).

Propriétés pharmacologiques des huiles essentielles extraites des zestes

- Pouvoir photosensibilisant
- Vitamine P mimétique et fluidifiante sanguine
- Tonique digestive, carminative, apéritive, dépurative
- Litholytique (Naganuma et *al.*, 1985; Zhiri A. et Baudoux D., 2009)

2.1.1.2. *Citrus bergamia*

Description morphologique et origine

Citrus bergamia appelé en français bergamotier est un arbre de 3 à 4 mètres de hauteur qui s'épanouit préférentiellement sous des climats tempérés ou tropicaux à des températures comprises entre 13 et 39°C. En dessous de -3°C, la récolte est détruite et à -11°C, l'arbre meurt. De plus le bergamotier se développe bien dans les sols profonds perméables et de texture légère. Il craint les milieux basiques et les eaux salines (Julie C., 1998 ; Ulrich R., 1952 ; Digne, 1997, Zhiri A. et Baudoux D., 2009).

Son origine est incertaine mais des analyses génétiques ont montré qu'il s'agit d'une hybridation entre le bigaradier et un citronnier, ou un bigaradier et un limetier.

Le bergamotier ou *Citrus bergamia* produit une baie d'une dizaine de centimètres de diamètre appelé « bergamote ». Son écorce jaune verdâtre est épaisse et criblée de vésicules oléifères, sécrétant l'huile essentielle. Cet agrume possède une chair très acide (pH de l'ordre de 1 et 2).



Photo 3.2.: *Citrus bergamia* (Orwa, 2009).

Description botanique

- Nom botanique: *Citrus bergamia*
- Famille: Rutacées
- Règne: *plantae*
- Division: *magnoliophyta*
- Classe: *magnoliopsida*
- Ordre: sapindales

Noms synonymes

- Français: Bergamotier
- Italien: Bergamotta

Composition chimique du zeste de *Citrus bergamia*

- 40 % limonène
- 28 % linalyl acétate
- 8 % linalol
- 5 % bergaptène (méthoxy-5 psoralène), citropène, bergamottine, gamma-terpinène, beta-terpinène et fraction non volatile (4-7 %) (Mehmet K. et *al.*, 2007).

Propriétés pharmacologiques

- Sédatif, calmant
- Antispasmodique
- Digestif
- Pouvoir photosensibilisant
- Anti-inflammatoire (Winter C.A. et *al.*, 1962 ; Zacher K.D. et Ippen H., 1984 ; Weisenseel P. et Woitalla S., 2005).

2.1.1.3. *Citrus reticulata*

Description morphologique et origine

C'est un petit arbre de 3 à 4 mètres, aux feuilles simples vert foncé brillant. Il est originaire de la Chine. La mandarine doit son nom au mandarin chinois qui recevait ce fruit en cadeau par tradition (Zhiri A. et Baudoux D., 2009).



Photo 3.3.: *Citrus reticulata* (USDA, 2009).

Description botanique

- Nom botanique : *Citrus reticulata*
- Famille : Rutacées
- Règne : *plantae*
- Division : *magnoliophyta*

- Classe : *magnoliopsida*
- Ordre : sapindales

Noms synonymes

- Français : Mandarinier
- Anglais : Mandarin

Composition chimique du zeste

- Monoterpènes: limonène (82,57 %), gamma-terpinène (10,21 %), alpha pinène (1,63 %)
- Monoterpènes: linalool (0,12 %), alpha terpinéol (0,09 %)
- Aldéhydes: décanal (0,06 %)
- Furocoumarines (Méthoxy-5 psoralène, bergamottine,...) (Sue C., 2004).

Propriétés pharmacologiques

Antispasmodique, puissant calmant, sédatif, relaxant, tonique digestif, laxatif doux, carminatif, stimulant gastrique et hépatique (Zhiri A. et Baudoux D., 2009).

2.1.2. Autres plantes photosensibilisantes

Une autre catégorie de plantes, utilisées dans la pharmacopée traditionnelle pour soigner les infections microbiennes et parasitaires, est constituée de *Cassia alata*, *Cassia occidentalis*, *Carica papaya*, *Coleus kilimandschari* et *Phyllanthus niruri*. L'activité photosensibilisatrice trouvée dans cette catégorie est essentiellement due à la présence des quinones et particulièrement d'anthraquinones (Sunda et *al.*, 2008 ; Masscheleir-Kleiner L. et Heylen J.B., 1968).

2.1.2.1. *Cassia alata*

Description morphologique et origine

Cet arbrisseau d'origine d'Amérique du sud peut atteindre deux mètres de hauteur. Il a de grandes feuilles composées de huit à dix paires de folioles obovales. Ses fleurs jaunes en grappes dressées donnent des gousses ailées de quinze centimètres environ remplies de nombreuses graines.



Photo 3.4.: *Cassia alata* (Dibong et *al.*, 2011).

Botanique

- Famille: *Caesalpinaceae*
- Genre: *Cassia*
- Espèce: *Cassia alata*

Composition chimique

Les feuilles de *Cassia alata* contiennent: des Anthraquinones, anthrones libres, acide chrysophanique, flavonoïdes, triterpénoïdes, acides aminés, stérols,...

Propriétés pharmacologiques

Laxatif, antiprurigineux et cicatrisant, anti-inflammatoire, antibactérien, antifongique et antihistaminique.

Usages thérapeutiques

- Constipation
- Affection de la peau et des muqueuses, nombreuses mycoses dont candidoses et teigne, allergies cutanées,...

2.1.2.2. *Cassia occidentalis*

Description morphologique et origine

Cet arbrisseau d'origine d'Amérique centrale peut atteindre deux ou trois mètres de hauteur. Il possède des feuilles pétiolées d'environ dix centimètres à la base desquelles se trouve une petite glande. Ses fleurs jaunes donnent des gousses.

Botanique

- Famille: *Caesalpinioideae*
- Genre: *Cassia*
- Espèce: *Cassia occidentalis*

Composition chimique

Flavonoïdes et dérivés anthracéniques.

Propriétés pharmacologiques

Laxatif, antiprurigineux et cicatrisant, anti-inflammatoire, antibactérien, antifongique et antihistaminique.

Usages thérapeutiques

- Constipation
- Affection de la peau et des muqueuses, nombreuses mycoses notamment candidoses et teigne, allergies cutanées.

2.1.2.3. *Carica papaya*

Description morphologique et origine

Cet arbre fruitier d'origine d'Amérique tropicale peut atteindre six mètres de hauteur. Le papayer résiste peu au froid. Il peut cependant résister aux brefs gels de l'ordre de -1 et 2 °C. Son feuillage est persistant. Il est organisé en bouquets terminaux de feuilles palmées d'une cinquantaine de centimètres chacune.

Botanique

- Famille: *Caricaceae*
- Genre: *Carica*
- Espèce: *Carica papaya* L.

Composition chimique

Terpènes, alcaloïdes, coumarines, flavonoïdes, β -Carotène, thiamine ou vitamine B1, riboflavine ou vitamine B2, niacine ou vitamine B3, acide ascorbique.

Propriétés pharmacologiques

- Anti-inflammatoire
- Antibactérien
- Antihelminthique
- Antifongique
- Cicatrisant

Usages thérapeutiques

Plaies, brûlures, ulcères et infections urinaires.

2.2. Les molécules à activité photosensibilisante

2.2.1. Les psoralènes ou furocoumarines

Comme dit précédemment, l'activité photosensibilisante remarquée dans les plantes de la famille des Rutacées est essentiellement due aux psoralènes ou furocoumarines (voir tableau 3.1.). Ils se repartissent en composés linéaires et angulaires (voir figure 3.5.) (Yurkow E. et Laskin J., 1991 ; Bordin F., 1999 ; Serrano J. et *al.*, 2008).



Figure 3.5.: A: Psoralène (Bordin F., 1999). B: Angeline (Bordin F., 1999).

Mode d'action

Comme photosensibilisateurs, ces composés agissent de deux façons différentes:

Dans un milieu pauvre en oxygène, ces molécules, sous l'action des UVA, vont s'insérer entre deux brins d'ADN ou ARN et réalisent un pontage entre deux bases azotées de l'ADN. Cette insertion va bloquer la réplication de l'ADN (voir figure 3.6.) (Cain M. et *al.*, 2006 ; Machet V. et Vaillant L., 2006).

Dans un milieu saturé en oxygène, ces composés absorbent l'énergie et passent de l'état fondamental, singulet, à l'état excité, triplet, en subissant une conversion intersystème (I.S.C.). Par la suite, l'énergie emmagasinée est transférée à l'oxygène fondamental. Ce dernier passe de l'état fondamental, triplet, à l'état excité, singulet. L'oxygène singulet, étant plus réactif que l'oxygène fondamental, attaque et endommage les molécules riches en électrons, notamment l'ADN (Joshi P.C. et Pathak M.A., 1983 ; Pathak M.A. et Joshi P.C., 1983 ; Serrano J. et *al.*, 2008).

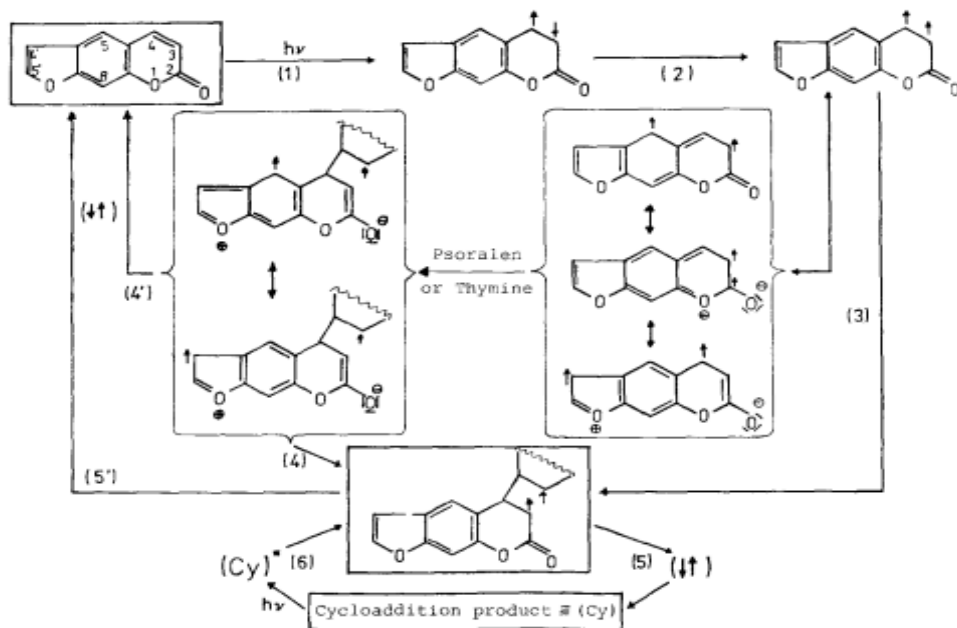


Figure 3.6.: Mode d'action des psoralènes (Anders A. et *al.*, 1983).

Ces processus entraînent:

- l'oxydation de certains composants cellulaires ;
- la formation des composés d'addition (voir figure 3.9. et 3.10.) covalents entre les furocoumarines et les bases pyrimidiques de l'ADN (cytosine, uracile, thymine) (voir figures 3.7. et 3.8.).

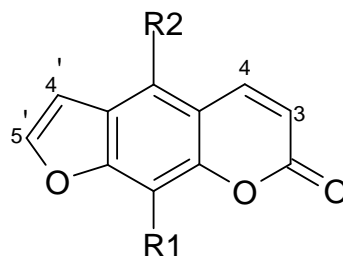
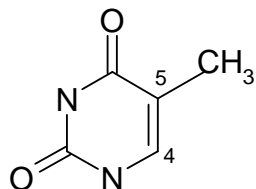


Figure 3.7.: Thymine (Courseille C. et *al.*, 1982). **Figure 3.8.:** Furocoumarines (Courseille C. et *al.*, 1982).

Les noms des furocoumarines linéaires correspondant aux radicaux R_1 et R_2 sont donnés dans le tableau 3.1.

Nom	R1	R2
Psoralène	-H	-H
Méthoxy-8 psoralène	-OCH3	-H
Méthoxy-5 psoralène	-H	-OCH3
Impérorine	-OCH ₂ -CH=C-(CH ₃) ₂	-H

Tableau 3.1.: Furocoumarines correspondant aux radicaux R₁ et R₂.

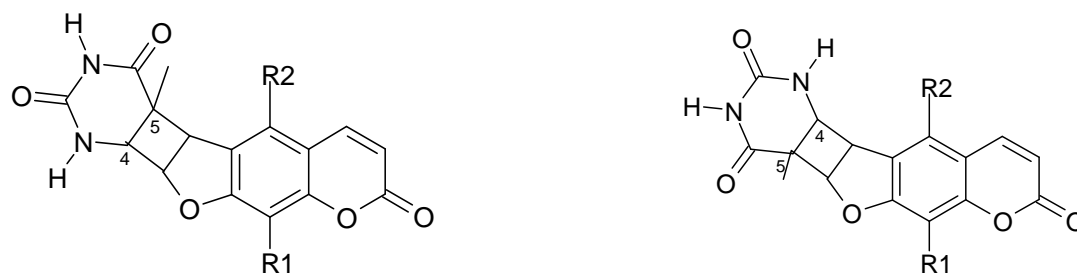


Figure 3.9.: Photodimère avec 4'-5' (Netanel K. et Eylon Y., 2010).

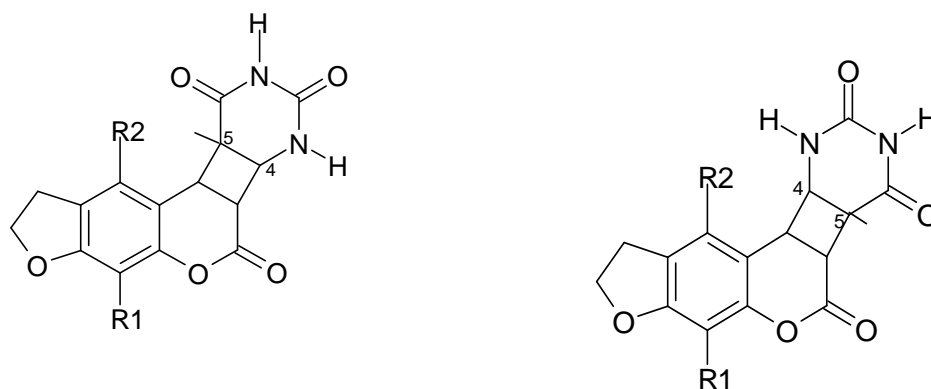


Figure 3.10.: Photodimère avec 3-4 (Netanel K. et Eylon Y., 2010).

En plus de ces dérivés de monoaddition peuvent se former des composés de diaddition, chacune des doubles liaisons concernées (3-4 et 4'-5') s'additionnant sur une base pyrimidique appartenant à chacune des deux chaînes de la molécule d'ADN (voir figure 3.11.) (Serrano J. et *al.*, 2008 ; Yurkow E. et Laskin J., 1991 ; Towers G., 1985 ; Machado A. et *al.*, 2001).

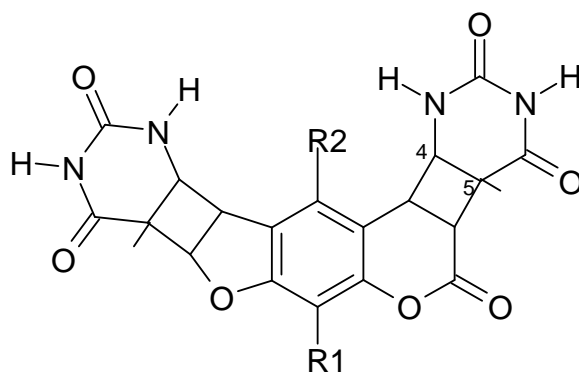


Figure 3.11.: Photodimère avec 3-4 et 4'-5' (Netanel K. et Eylon Y., 2010).

Usages

Les furocoumarines, à cause de leurs propriétés photosensibilisantes, sont utilisées en thérapeutique (Serrano J. et *al.*, 2008 ; Yurkow E. et Laskin J., 1991 ; Bordin F., 1999; Valkova S., 2007) :

- Le méthoxy-5 psoralène et le méthoxy-8 psoralène sont utilisés en puvathérapie, traitement photochimiothérapique du psoriasis et d'autres affections dermatologiques (Parish J.A. et *al.*, 1974 ; Parish J.A. et *al.*, 1976 ; Lowe N.J. et *al.*, 1979; Morison W.L. et *al.*, 1987). Cette technique consiste à administrer, en général par voie orale, la furocoumarine ; deux ou trois heures après, on procède à une exposition au rayonnement d'une lampe UV émettant dans la zone des UV longs (320-380 nm) ou aux rayons solaires ;
- Dans le traitement du vitiligo ;
- Dans les produits cosmétiques (Parrish J.A. et *al.*, 1974 ; Parrish J.A. et *al.*, 1976 ; Lowe N.J. et *al.*, 1979 ; Morison W.L. et *al.*, 1987).

Principales sources

Le tableau 3.2. donne quelques furocoumarines linéaires et leurs principales sources (les plantes qui servent à leur isolement).

Psoralène	<i>Ficus carica</i> (Moraceae) <i>Psoralea corylifolia</i> (Leguminosae)
Méthoxy-5 psoralène (bergaptène)	<i>Ficus carica</i> <i>Citrus bergamia</i> <i>Citrus limonum</i> <i>Heracleum ssp</i> <i>Ammi majus</i> <i>Seseli indicum</i> <i>Petroselinum sativum</i>
Méthoxy-8 psoralène	<i>Ammi majus</i> <i>Angelica</i> <i>Pastinaca sativa</i> <i>Ficus carica</i> <i>Ruta graveolens</i>

Tableau 3.2.: Quelques furocoumarines linéaires et leurs origines (Towers, 1986).

2.2.2. Les quinones

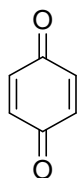
Comme dit précédemment, l'activité photosensibilisatrice trouvée dans les extraits aqueux de *Cassia alata*, *Cassia Occidentalis*, *Carica papaya*, *Coleus kilimandschari* et *Phyllanthus niruri* est essentiellement due à la présence des quinones et particulièrement d'antraquinones.

Définitions

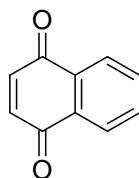
Les quinones sont des composés correspondant à l'oxydation des dérivés aromatiques. Le dione est conjugué aux doubles liaisons du noyau aromatique (voir figure 3.12.).

Les quinones naturelles appartiennent à trois groupes principaux:

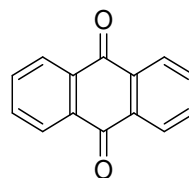
- Benzoquinones ;
- Naphtaquinones ;
- Anthraquinones.



A. Benzoquinone



B. Naphtaquinone



C. Anthraquinone

Figure 3.12.: Structure des motifs de base des quinones (Morrison R. et Boyd R., 1992).

Distribution des quinones

Les quinones sont fréquentes chez les végétaux supérieurs (familles de *Rubiaceae*, *Rhamnaceae*, *Fabaceae* et *Polygonaceae*) et chez les champignons. Les benzoquinones simples, caractéristiques des arthropodes, sont rares chez les végétaux supérieurs et peu répandus chez les champignons. La distribution des naphtaquinones est presque exclusivement limitée chez les champignons. Les anthraquinones sont de loin les plus nombreuses, elles sont fréquentes chez les lichens, les champignons et dans un nombre limité de familles d'angiospermes. Les quinones se rencontrent dans la nature sous forme libres ou hétérosides. Les figures 3.13. et 3.14. donnent quelques anthraquinones naturelles (Müller S.A., 1983 ; Morrison R. et Boyd R., 1992).

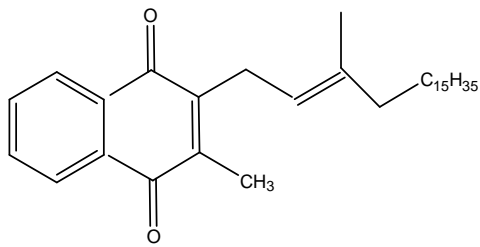


Figure 3.13.: Vitamine K.

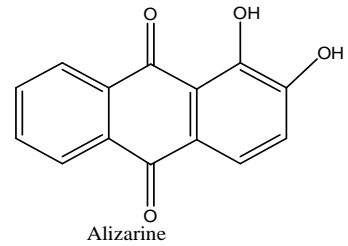
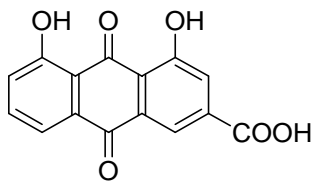
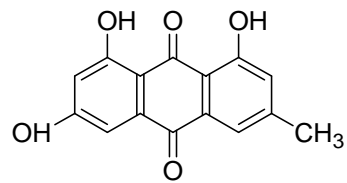


Figure 3.14.: Alizarine, premier colorant naturel préparé par synthèse en 1865.

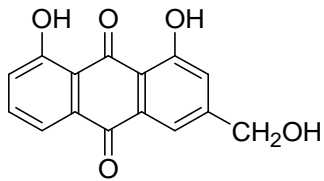
En 1979, Smith R.M. and Sadaquat A. isolèrent six anthraquinones de feuilles de *Cassia alata* :



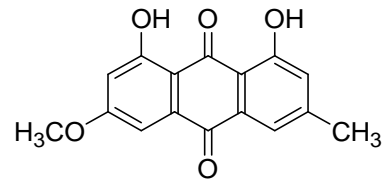
Rhein



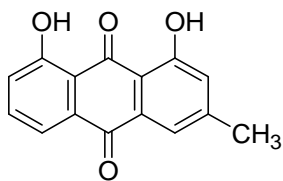
Emodin



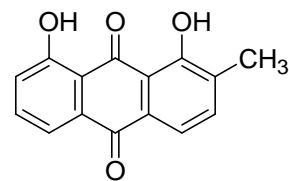
Aloe Emodin



Physicion



Chrysophanol



Isochrysophanol

Figure 3.15.: Quelques anthraquinones isolées de feuilles de *Cassia alata* (Smith R.M. et Sadaquat A., 1979).

Propriétés générales des quinones

- Propriétés physiques

Les quinones et leurs homologues cristallisent très facilement ; elles sont fortement colorées en jaune ou en rouge et possèdent presque toutes une odeur caractéristique piquante, rappelant le chlore ou l'acide sulfureux.

Elles sont volatiles et se subliment aisément, certaines dès la température ordinaire. Les quinones sont entraînaables par la vapeur d'eau, ce qui permet de les purifier. Elles sont presque insolubles dans l'eau froide et facilement solubles dans la plupart des solvants organiques.

Dans les alcalis, les quinones se solubilisent et donnent une coloration allant de l'orange au rouge vif ou violacée, ce qui permet leur caractérisation et leur dosage. Le dosage des quinones est habituellement pratiqué en spectrophotométrie et est fondé sur la mise en œuvre de l'une de leurs réactions colorées (Muller L., 1983).

2.3. Immobilisation du photosensibilisateur sur un support solide

L'un des premiers travaux réalisés sur la désinfection de l'eau par photosensibilisation fut mené par Acher A. et Rosenthal I. (1977). Le bleu de méthylène a été utilisé comme photosensibilisateur. Le soleil et la lampe ultraviolette furent utilisés comme source de lumière. En 1977, Acher A. et Juven B. réalisèrent une autre étude sur la désinfection et la détoxification de l'eau par photosensibilisation. Les abattements de l'ordre de $1,3 \times 10^9$ UFC coliformes fécaux / 100 ml furent notés pour une concentration de 0,5 mg / litre de bleu de méthylène. En 2002, Cooper A. et Yogi T., lors de leurs travaux sur la désinfection et détoxification de l'eau par photosensibilisation avec le bleu de méthylène, remarquèrent une bonne activité (abattement de l'ordre de 10^3 - 10^4 UFC/ ml en *Escherichia coli* pour une concentration de 10 mg/l). Malgré l'efficacité notée, le photosensibilisateur restait en solution après la désinfection, rendant ainsi impropre la consommation de l'eau traitée. Il fallait donc le fixer sur un support solide pour pouvoir l'enlever après la désinfection de l'eau.

L'immobilisation d'un photosensibilisateur sur un support solide présente plusieurs avantages, notamment celui d'être retiré après la désinfection de l'eau et d'être utilisé pour un autre traitement. Ceci est alors bénéfique d'un point de vue économique et environnemental. Mais en général, l'immobilisation du photosensibilisateur sur un support solide réduit sa capacité de production d'oxygène singulet (Derosa M. et Crutchley R.J., 2002).

Bonnett R. et al. (2006), étudiant la désinfection de l'eau par photosensibilisation avec le (5, 10, 15,20-tetrakis (p-hydroxyphenyl) porphyrine, p-THPP ; 5, 10,15, 20-tetrakis (p-aminophenyl) porphyrine, p-TAPP et l'acide tétra sulfonique phtalocyanine Zn (II), ZnPCs, remarquèrent une très bonne activité avec le ZnPCs incorporé dans la membrane chitosane. Lors de cette étude, où *E.coli* était pris comme modèle, il a été constaté une réduction de $1,99 \times 10^5$ CFU / ml à $0,90 \times 10^5$ UFC / ml après 35 minutes et à $8,3 \times 10^2$ UFC / ml après 160 minutes. La même membrane, gardée à l'obscurité pendant 9 mois et réutilisée, a montré encore une certaine activité, avec une réduction de $3,1 \times 10^5$ à $1,0 \times 10^4$ CFU / ml après 160 minutes d'irradiation.

Il existe plusieurs méthodes de fixation d'un photosensibilisateur sur un support solide. Celles-ci dépendent de la structure du photosensibilisateur et du support solide. Dans le cadre de ce travail, la réaction d'acylation de Friedel-Craft sera utilisée pour la fixation de méthoxy-5 psoralène (MOP-5) sur le polystyrène.

3. Oxygène singulet ($^1\text{O}_2$)

Rappelons que l'oxygène singulet est le produit résultant de l'action combinée d'un photosensibilisateur, de lumière et d'oxygène.

3.1. Qu'est-ce que l'oxygène singulet ?

L'oxygène singulet est une forme d'oxygène, de plus haute énergie que l'oxygène classique, formé par l'excitation de ce dernier. L'oxygène fondamental est un participant important dans les processus photochimiques, car il contient un haut potentiel chimique (Wassermann H. et Murray R., 1979).

Deux structures de Lewis pour la molécule d'oxygène servent de base (Voir figure 3.16. a et b) pour des discussions ayant trait à sa chimie. La structure (a), dans laquelle tous les électrons sont appariés, correspond à l'état électronique singulet. Alors que la structure (b), dans laquelle deux électrons ne sont pas appariés, peut correspondre à un état triplet ou singulet.



Figure 3.16.: Structures de Lewis de la molécule d'oxygène.

Les propriétés de l'oxygène sont déterminées par les six électrons dans les orbitales $\pi \rightarrow \pi^*$ montrées dans le diagramme d'orbitales moléculaires (Voir figure 3.17.). Le terme spectroscopique pour l'état fondamental triplet est noté $^3\Sigma_g^-$. Les deux électrons appariés qui occupent les mêmes orbitales π^* dans l'état excité $^1\Delta_g$ correspondent à l'espèce excitée d'énergie faible qui réagit chimiquement comme l'oxygène singulet. L'énergie d'excitation est de 22,5 Kcal/mol (= 1270 nm). L'espèce excitée d'énergie supérieure est notée $^1\Sigma_g^+$. Dans cet état les deux électrons de spins contraires occupent deux orbitales moléculaires différentes. L'énergie d'excitation est de 37,5 Kca l/ mol (voir tableau 3.3.). La durée de vie de cet état excité est faible de sorte que cet état excité est converti rapidement dans l'état $^1\Delta_g$ (Wassermann H. et Murray R., 1979).

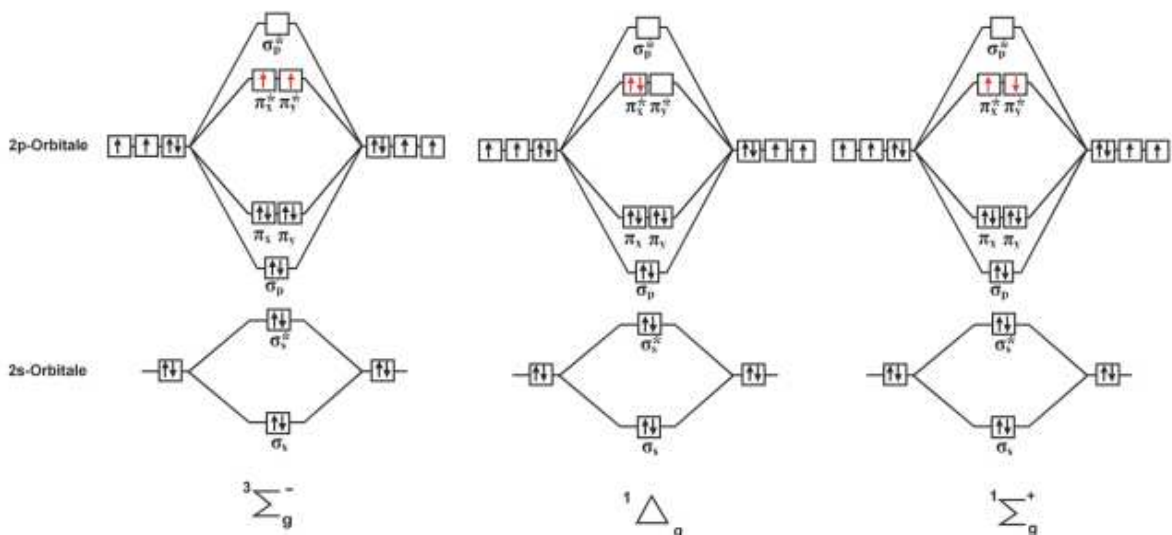


Figure 3.17.: Diagramme d'orbitales moléculaires de l'oxygène (Wassermann H. et Murray R., 1979).

Etats d'énergie de la molécule d'oxygène	Configuration électronique de l'Orbitale Moléculaire occupée de haute énergie (HOMO)	Energie au dessus de l'état fondamental
Second état excité (${}^1\Sigma_g^+$)	↑ ↓	37 Kcal / mol
Premier état excité (${}^1\Delta_g$)	↑↓	22 Kcal / mol
Etat fondamental (${}^3\Sigma_g^-$)	↑ ↑	

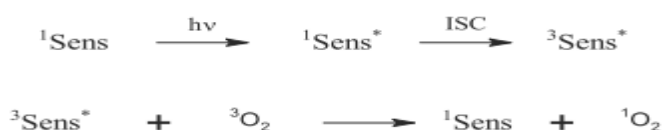
Tableau 3.3.: Différents états d'énergie de la molécule d'oxygène (Ameta C.S. et *al.*, 1990).

3.2. Origine de l'oxygène singulet

L'origine la plus fréquente de l'oxygène singulet semble être la photosensibilisation: divers photosensibilisateurs, tels que l'hypericine du Millepertuis, l'huile de bergamote ou les porphyrines produisent l'oxygène singulet en présence de lumière (Malik Z. et *al.*, 1990 ; Nitzan Y. et *al.*, 1992 ; Foote C. et Clennan, 1995 ; Merchat M. et *al.*, 1996 ; Alouini Z. et Jemli M., 2001 ; Caminos D. et *al.*, 2006 ; Ergaieg K. et Seux R., 2009 ; Valduga G. et *al.*, 1999).

3.3. Formation d'oxygène singulet

De nombreuses méthodes ont été développées pour produire l'oxygène singulet. Il existe des méthodes photochimiques et chimiques. Bien qu'une photoexcitation de l'oxygène moléculaire soit possible, ce n'est pas une méthode photochimique pratique, du fait des faibles rendements quantiques obtenus. Utiliser un photosensibilisateur dans le but de produire l'oxygène singulet est une méthode plus pratique (voir figures 3.18. et 3.19.). Généralement un colorant possède un fort pouvoir absorbant (bleu de méthylène, rose de bengal, porphyrine et ses dérivés, furocoumarines,.....) (Ergaieg K. et Seux R., 2009). Certains complexes de Ruthénium II portant des ligands bipyridines ont été également décrits comme photosensibilisateurs (Garcia F. et *al.*, 1996 ; Garcia F. et *al.*, 1999 ; Fuller Z.J. et *al.*, 2003 ; Kühni J. et *al.*, 2007).



ISC: Changement intersystème

Figure 3.18.: Formation de l'oxygène singulet à partir d'un photosensibilisateur.

Comme montré dans la figure 3.18., le sensibilisateur est excité par l'absorption d'un photon. Après un croisement intersystème (ISC), le photosensibilisateur est à l'état triplet. Une annihilation triplet-triplet entre l'oxygène à l'état fondamental et le photosensibilisateur dans son état triplet fournit l'oxygène singulet (${}^1\text{O}_2$) et laisse le photosensibilisateur dans son état initial. Ce dernier peut effectuer ce cycle un grand nombre de fois, de sorte que, généralement, une quantité minimum de sensibilisateur est nécessaire (Voir figure 3.19.).

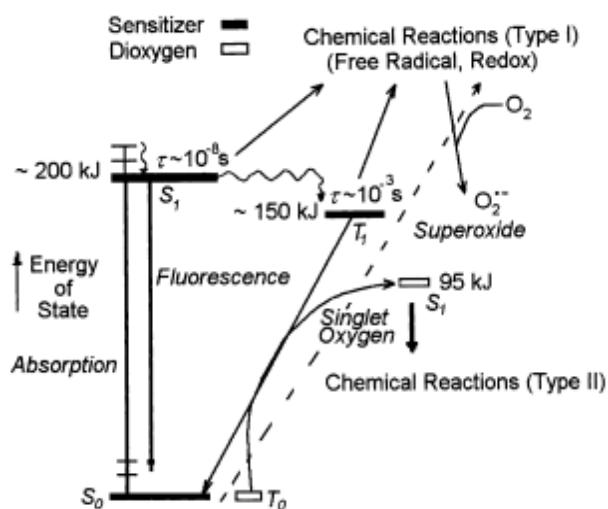


Figure 3.19.: Diagramme de Jablonsky (Maria C. et Robert J., 2002).

Lorsqu'on illumine un photosensibilisateur, il en résulte un état d'énergie supérieur (un état excité) qui est instable et les molécules du photosensibilisateur vont retourner à leur état initial en relarguant l'énergie selon différents processus:

- transfert de l'énergie excédentaire à une molécule par collision (en solution) ;
- conversion de l'énergie excédentaire en énergie thermique ;
- émission d'un photon lumineux selon deux aspects illustrés par le diagramme de Jablonsky.

Le diagramme de Jablonsky peut être appliqué spécifiquement à la photosensibilisation en montrant les mécanismes d'excitation et de désexcitation des états électroniques des photosensibilisateurs : les photosensibilisateurs provoquent l'excitation des molécules normalement insensibles après absorption de lumière. Lors de l'absorption de lumière (phénomène très rapide $\sim 10^{-15}$ s), le photosensibilisateur passe de son état singulet fondamental S_0 à différents états singulets (S_1, S_2, \dots, S_n). Il y a ensuite retour à l'état singulet excité de plus basse énergie S_1 par deux phénomènes: la relaxation vibrationnelle (IVR) et la conversion interne (IC). A partir de cet état S_1 (de courte durée de vie 10^{-10} à 10^{-7} s), le retour à l'état initial S_0 peut s'opérer de deux façons:

- par émission d'un photon par fluorescence ;
- par transfert d'énergie à un état triplet T_1 par conversion intersystème (ISC).

Le retour à S_0 à partir de T_1 peut ensuite s'effectuer par émission de phosphorescence. Cependant, la durée de vie de cet état triplet (de 10^{-6} à 1 s), relativement longue, permet à la molécule d'interagir avec les substrats situés dans son environnement proche (par exemple l'oxygène). Deux types de réactions sont alors possibles (Foote C.S., 1984 ; Foote C.S. 1991): une photoréaction du type I et une photoréaction du type II.

a. Phtoréaction du type I:

L'état triplet T_1 réagit directement avec les substrats biologiques (phospholipides, protéines, stérols,..) par transfert d'électrons ou d'atomes d'hydrogène conduisant à la formation d'espèces radicalaires (Towers G., 1985). Les radicaux libres peuvent réagir avec l'oxygène dans son état fondamental pour former l'ion superoxyde. Si cette espèce n'est pas particulièrement réactive, sa forme protonée peut en revanche être transformée en peroxyde d'hydrogène (figure 3.20.).

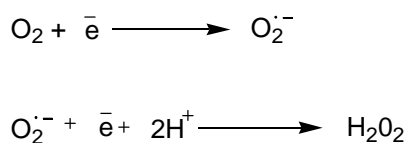


Figure 3. 20.: Formation de l'anion superoxyde et de peroxyde d'hydrogène (Lacolley P. et *al.*, 2007).

b. Photoréaction du type II:

L'état triplet T_1 réagit directement avec l'oxygène en lui transférant son excès d'énergie qui fait passer l'oxygène de l'état fondamental, triplet (3O_2) à son état singulet (1O_2).

Le passage par l'état triplet est prédominant dans le cas où un colorant riche en électrons (délocalisation des électrons π sur l'ensemble de la structure) ou une molécule paramagnétique est présent dans le milieu.

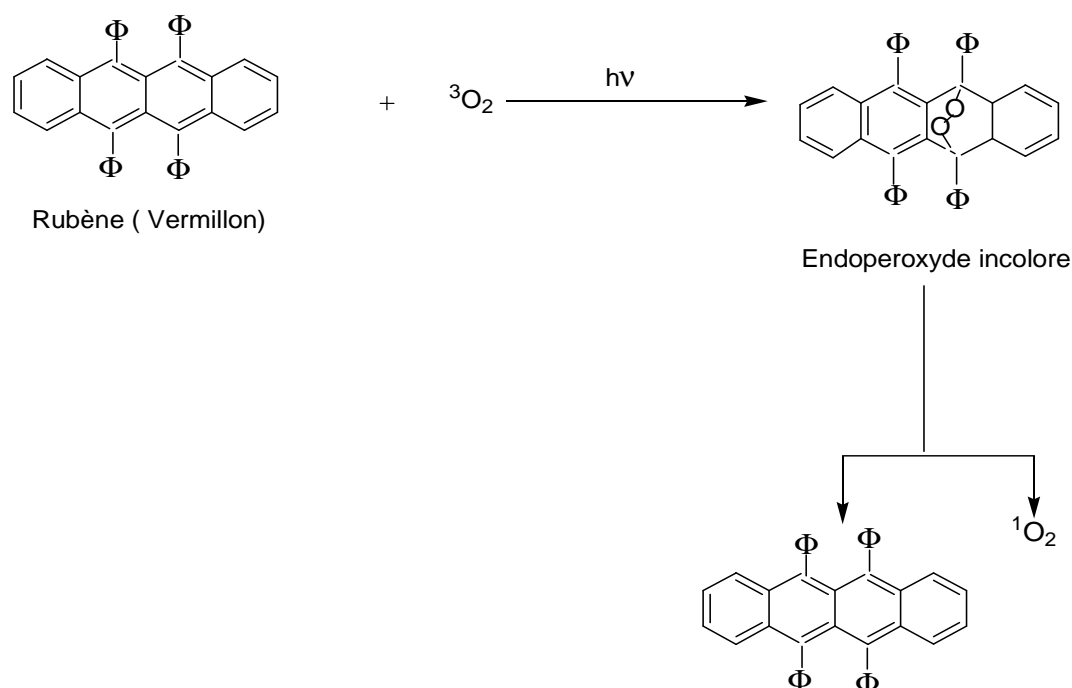


Figure 3.21.: Une des premières réactions connues comme produisant l'oxygène singulet (Moureu C. et *al*, 1926).

3.4. Réactions de l'oxygène singulet avec les biomolécules

Quoique plusieurs études aient été réalisées et même certaines en cours, sur les réactions d'oxydation des biomolécules par l'oxygène singulet afin d'isoler et caractériser les intermédiaires et produits, les mécanismes de photooxydation des biomolécules comme l'histidine, le tryptophane ou les bases de l'ADN (Acide désoxyribonucléique) ne sont pas encore complètement clairs. Les investigations sont difficiles vu la faible solubilité de ces composés, l'instabilité des intermédiaires et la difficulté de séparer et de caractériser les produits. Aussi, les conditions non-physiologiques peuvent conduire à des mécanismes et cinétiques de photooxydation différents de ceux provenant d'un système biologique (Iesce R. et *al*, 2005 ; Dahl T. et *al*, 1989). L'oxygène singulet réagit également avec les bases azotées de l'ADN, principalement la thymine et la guanine. Vu sa nature électrophile, l'oxygène singulet réagit avec les lipides insaturés, notamment le cholestérol.

3.4.1. Réactions de l'oxygène singlet sur les acides aminés

Parmi les acides aminés, l'histidine et le tryptophane réagissent facilement avec l'oxygène singlet (voir figures 3.22. et 3.23.).

3.4.1.1. Histidine

La photooxydation de l'histidine suit la réaction de type II. Dans la solution aqueuse, celui-ci subit une dégradation en plusieurs produits parmi lesquels l'acide aspartique et l'urée ont été identifiées (Foote C.S., 1984). Ces produits subiraient à leur tour une oxydation conduisant à la formation d'eau, de gaz carbonique et d'énergie. Cette réaction de photooxydation provoque la mort de la cellule (Iesce R. *et al*, 2005).

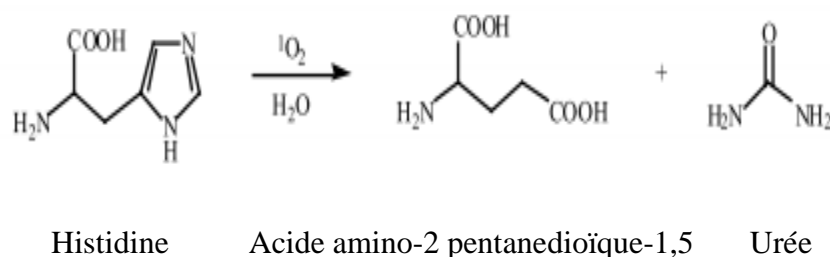


Figure 3.22.: Mécanisme de photooxydation de l'histidine.

3.4.1.2. Tryptophane

Plusieurs études sur la production du N-formylkynurenine (3) et ses dérivées à partir de tryptophane 1, en utilisant la riboflavine et le bleu de méthylène comme photosensibilisateurs, en présence de l'oxygène moléculaire, ont été réalisées. L'hydroperoxyde 2 a été suggéré comme premier intermédiaire et plusieurs voies de transformations de 1 à 4 ont été étudiées, mais aucun intermédiaire n'a été obtenu, sauf l'hydroperoxyde 5, le tautomère cyclique de 2. Ce composé a été isolé et il s'est avéré qu'il se réarrange sous diverses conditions en 3 (voir figure 23.).

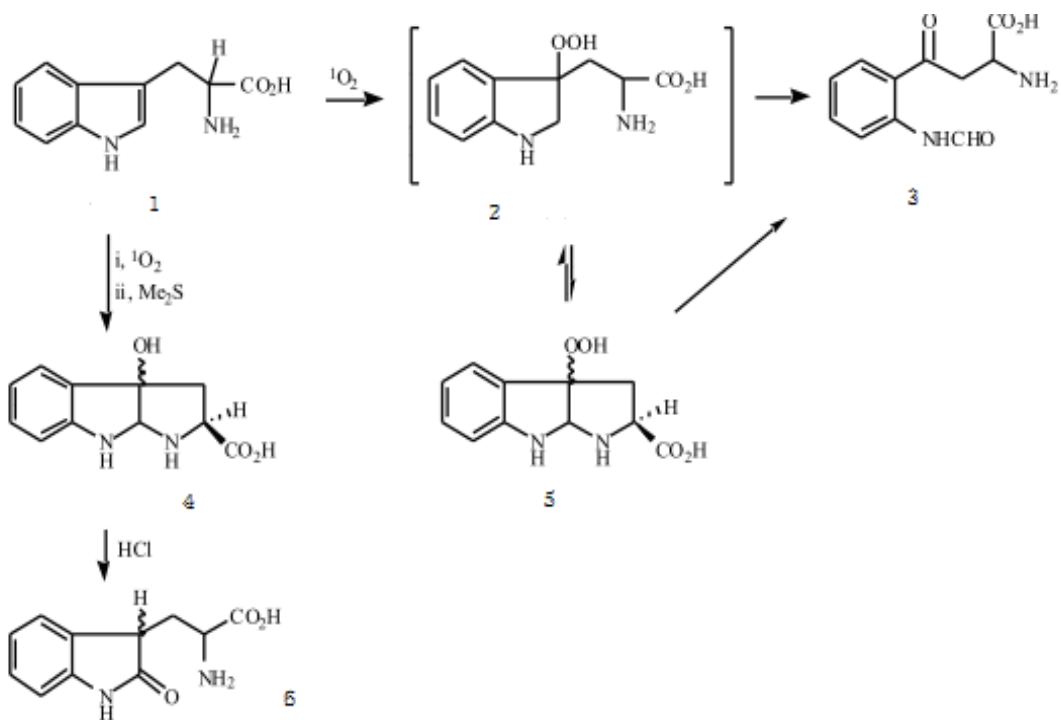


Figure 3.23.: Mécanisme de photooxydation de tryptophane.

3.4.2. Réactions de l'oxygène singlet sur les bases azotées de l'ADN

En présence de l'oxygène singlet, l'ADN subit une fragmentation, surtout au niveau de ses bases azotées.

3.4.2.1. La thymine

La figure 3.24. présente le mécanisme détaillé de la fragmentation de la thymine.

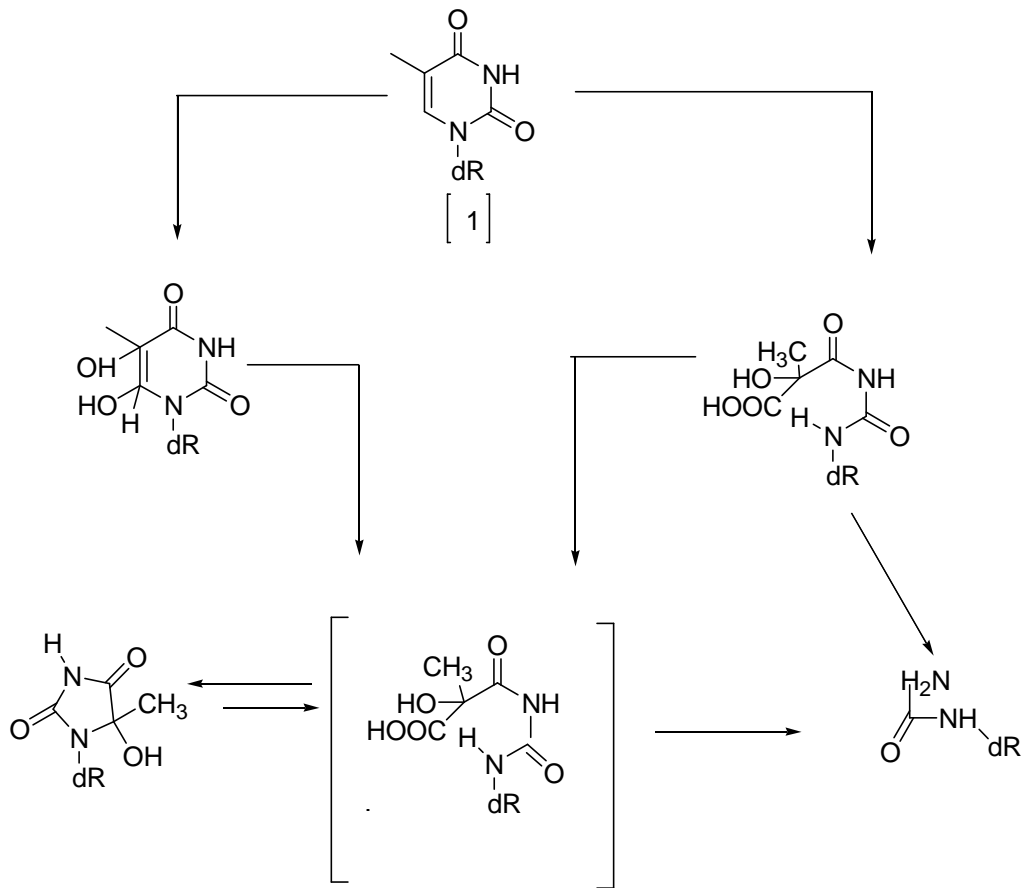


Figure 3.24.: Mécanisme de photooxydation de la thymine (Iesce R. et *al.*, 2005).

3.4.2.2. La guanine

A cause de son potentiel redox élevé, la guanine est la base azotée de l'ADN la plus oxydable. Par conséquent, elle réagit facilement avec l'oxygène singlet (voir figure 3.25.).

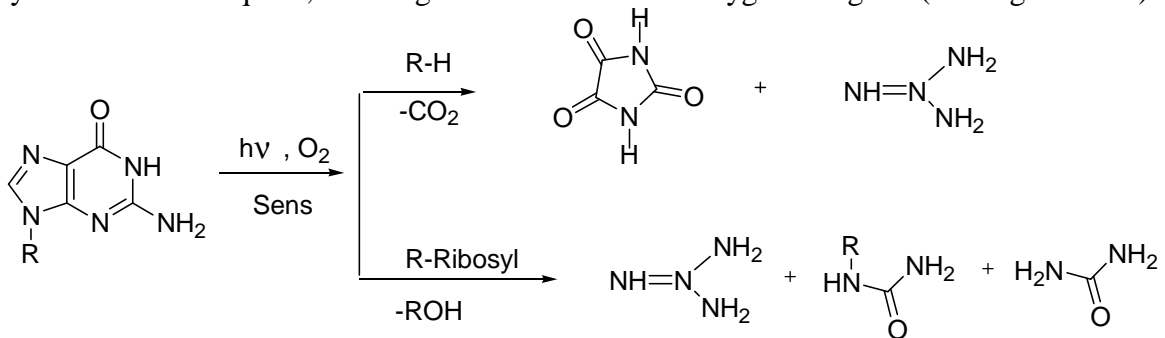


Figure 3.25.: Mécanisme de photooxydation de guanine (Iesce R. et *al.*, 2005).

3.4.3. L'action de l'oxygène singulet sur les lipides

Les acides gras sont largement présents dans les phospholipides des membranes biologiques. En plus de l'oxydation enzymatique dont ils sont l'objet, les acides gras subissent une autre oxydation non-spécifique: une peroxydation. Les produits de la peroxydation dépendent essentiellement de la nature de l'acide gras initial. Par exemple, le pentane est généré par la peroxydation d'un acide 6- ω polyinsaturé et l'éthane par un acide gras 3- ω polyinsaturé.

L'oxydation du cholestérol est d'un intérêt biologique spécial, car elle conduit au 5 α -hydroperoxyde cholestérol et 5,6-époxyde cholestérol (Figure 26 a et b).

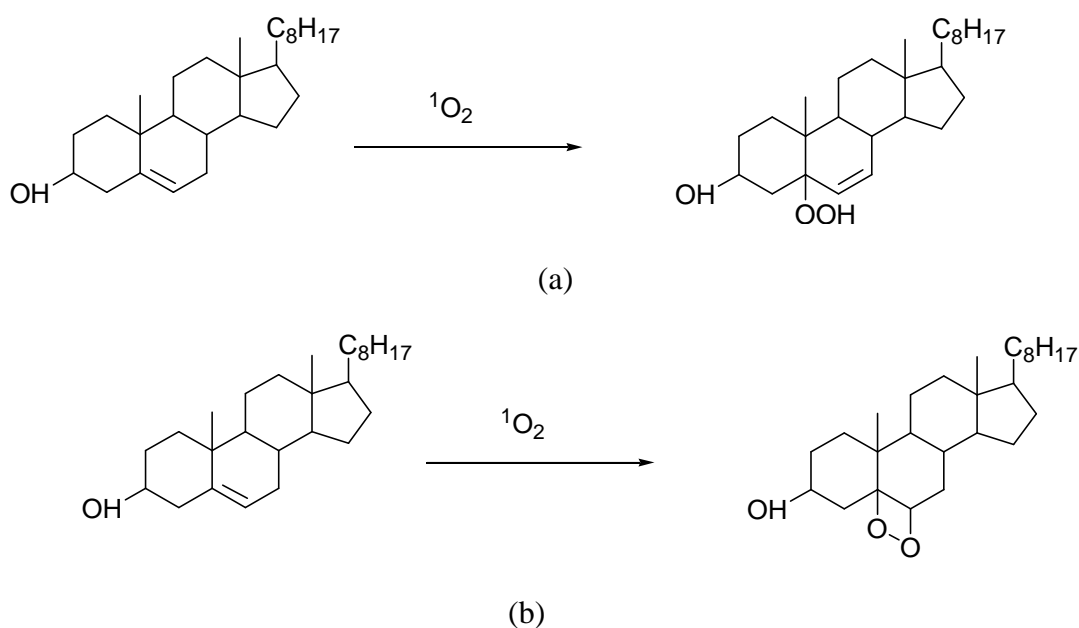


Figure 3.26.: Mécanisme de peroxydation du cholestérol (Girotti A.W., 1998 ; Korytowski W. et Girotti A.W., 1999).

3.4.4. L'action de l'oxygène singulet sur les hydrates de carbones

Les hydrates de carbone sont relativement insensibles à l'oxygène singulet. Mais lors de l'oxydation de l'ADN, le désoxyribose est aussi oxydé. Les polysaccharides tels que l'acide hyaluronique et les protéoglycanes peuvent aussi être oxydés.

3.5. Applications de l'oxygène singulet

L'oxygène singulet ($^1\Delta_g$) généré par l'action combinée d'un sensibilisateur, de lumière et de l'oxygène peut être utilisé:

- Pour la stérilisation du sang ;
- Dans la thérapie photodynamique du cancer ;
- Dans la chimie fine ;

- Dans la dépollution et la désinfection de l'eau (Derosa M.C. and Crutchley R.J., 2002).

Dans le cadre de cette étude, c'est le dernier aspect qui nous intéressera (dépollution et désinfection de l'eau). En effet, l'oxygène singulet est de plus en plus utilisé dans la dépollution des eaux usées et la désinfection de l'eau. L'opération consiste à placer une quantité donnée d'un photosensibilisateur dans l'eau à traiter, suivi d'une exposition à la lumière d'une longueur d'onde dépendant de la zone d'absorption du photosensibilisateur. L'oxygène singulet généré inhibe les microorganismes contenus dans le milieu (Valduga et al., 1993 ; Schafer M. et al., 2000 ; Jori G. et Brown S., 2002 ; Luksiene Z., 2005).

Les toutes premières études réalisées dans ce domaine furent menées par Acher A. et Rosenthal I. (1977) et Acher A. et Juven B. (1977) (voir le point 2.3.). Par la suite, plusieurs études furent réalisées dans ce même cadre. Toutes ces études mettent en évidence la génération de l'oxygène singulet pour la désinfection de l'eau (Bilski P. et al., 1991 ; Jiménez M. et al., 2006 ; Nina A. et al., 2007 ; Rengifo H. et al., 2007 ; Sabbahi S. et al., 2000 ; Jori G. et Brown S., 2004 ; Ergaieg K. et Seux R., 2009 ; Villén L. et al., 2006).

4. Conclusion

Ce chapitre a porté sur la photosensibilisation: réaction au cours de laquelle l'oxygène singulet est généré à partir d'un photosensibilisateur et de lumière.

La capture d'un photon de lumière par un photosensibilisateur provoque l'excitation de ce dernier. L'énergie emmagasinée peut être transférée à l'oxygène fondamental pour la génération d'oxygène singulet. L'action néfaste de l'oxygène singulet sur les microorganismes est connue. Certaines plantes utilisées dans la pharmacopée traditionnelle pour soigner les infections microbiennes et parasitaires sont capables de générer l'oxygène singulet. L'oxygène singulet, ainsi généré, peut être utilisé pour la désinfection de l'eau.

Dans le présent travail, nous nous intéresserons à la désinfection de l'eau par l'oxygène singulet généré par l'activité photosensibilisatrice d'extraits de plantes (voir figure 3.27.). Les plantes utilisées dans le cadre de cette recherche et les molécules responsables de leur activité photosensibilisatrice sont mentionnées dans le tableau 3.4.

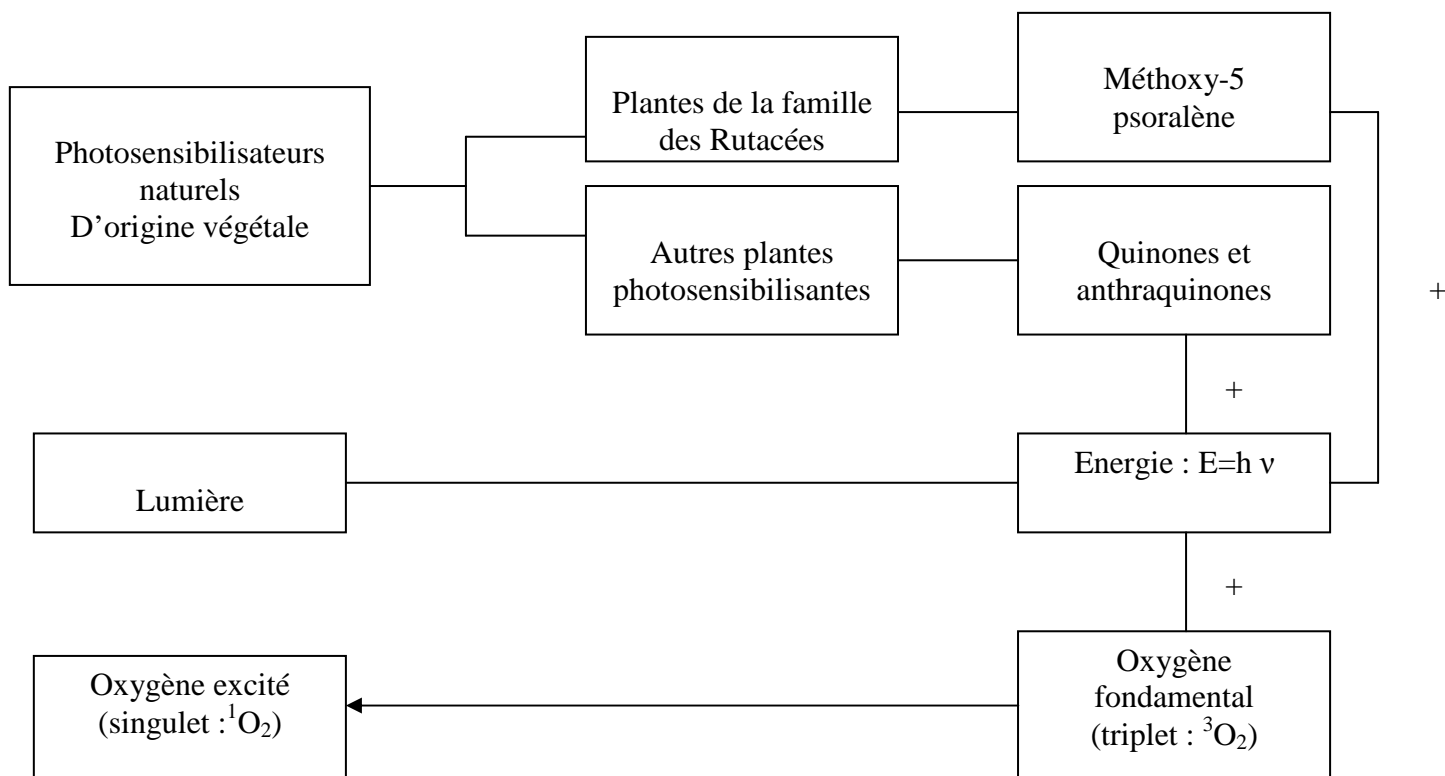


Figure 3.27.: Production d'oxygène singlet à partir d'un photosensibilisateur et de lumière.

Famille	Plantes	Principales Molécules actives
Famille des Rutacées	<i>Citrus bergamia</i> , <i>Citrus limonum</i> et <i>Citrus reticulata</i>	Furocoumarines
Autres Familles	<i>Cassia alata</i> , <i>Cassia occidentalis</i> , <i>Carica papaya</i> , <i>Coleus kilimandschari</i> et <i>Phyllanthus niruri</i>	Quinones et anthraquinones

Tableau 3.4.: Plantes photosensibilisantes utilisées dans le cadre de cette recherche et les molécules responsables de leur activité.

5. Références bibliographiques

Acher A. and Rosenthal I. (January, 1977). Dye-sensitized-photooxydation a new approach to the treatment of organic matter in sewage effluents, *Water Research.*, Volume 11 , p. 557-562.

Acher A. and Juven B. (May, 1977). Destruction of coliforms in water and sewage water by dye sensitized photooxydation, *Applied and Environmental Microbiology*, Vol. 33, n°5, p. 1019-1022.

Alouini Z. and Jemli M. (2001). Destruction of helminth eggs by photosensitized porphyrin, *J. Environ. Monit.*, 3 (5), p. 548–551.

Ameta C.S., Punjabi P.B., Chobisa C.S., Mangal N. and Bhardwaj R. (1990). Singlet Molecular Oxygen, *Asian Journal of Chemistry Reviews*, 1(2), p. 106-124.

Anders A., Poppe W., Herkt C. and Niemann E. (1983). Investigation on the mechanism of photodynamic action of different psoralens with DNA., *Biophys. Struct.*, Mech.10, p. 11-30.

Bonnett R., Krysteve M., Lalov I. and Artarsky S. (2006). Water disinfection using photosensitizers immobilized on chitosan, *Water Research*, Volume 40, p. 1269-1275.

Bilski P., Dabestani R. and Chignell C.F. (1991). Influence of cationic surfactant on the photoprocesses of eosine and rose bengale in aqueous solution, *J.Phys. Chem.*,95, p.5784-5791.

Bordin F. (1999). Photochemical and photobiological properties of furocoumarins and homologues drogues, Vol. 1, *International Journal of Photoenergy*, p. 1-6.

Cain M. , Damman H., Lue R. and Yoon C. (2006). Découvrir la Biologie, De boeck, 241p.

Camino D., Spesia M. and Durantini E. (2006). Photodynamic inactivation of *Escherichia coli* by novel meso-substituted porphyrins by 4-(3-N, N, N-trimethylammonium-propoxy) phenyl and 4-(trifluoromethyl) phenyl groups, *Photochem. Photobiol. Sci.*, 5(1), p. 56–65.

Chenu J. (1992). Plantes médicinales du Congo, Tome I.

Cooper A. and Yogi G. (2002). Evaluation of Methylene blue and Rose Bengal for Dye Sensitized Solar treatment, *Journal of Solar Energy Engineering*, Vol 124, p. 305-310.

Courseille C., Bravic G. et Bideau J. (1982). Etude des interactions Psoralène Acides Nucléiques, *Acta Cryst.*, B38, p.1252-125.

Dahl T., Midden W. and Hartman P. (1989). Comparison of killing of Gram-negative and Gram-positive bacteria by pure singlet oxygen, *J. Bacteriol.*, 171 (4), p. 2188–2194.

Derosa M.C. and Crutchley R.J. (2002). Photosensitized singlet oxygen and its applications, *Coordination Chemistry reviews*, 233-234 , p.351-371.

Dibong S., Mpondo M., Ngoye A., Kwin M. et Betti J. (2011). Ethnobotanique et phytomédecine des plantes médicinales de Douala, Cameroun. *Journal of Applied Biosciences*, 37, p.2496-2507.

Digne.(1997). Actes des 16^{ième} Journées Internationales Huiles essentielles de Dignes.

Engel P.S. and Schexnayder M.A (1972). Effect of ring size on the photochemical behaviour of beta, gamma unsaturated ketones, *J. Am. Chem. Soc.*, 94, p.9252-9254.

Engel P.S. and Schexnayder M.A. (1975). Additions and corrections-systematic modifications in the photochemistry of β , γ - unsaturated ketones, *J. Am. Chem. Soc.*, 97, p.1989-1989.

Ergaieg K. and Seux R. (2009). A comparative study of the photoinactivation of bacteria by meso-substituted cationic porphyrin rose bengal and methylene blue, *Desalination*, 248, p. 32-41.

Foote C.S. (1984). Photosensitized oxidation and singlet, consequences in biology systems; free Radicals in biology Vol.III, ed.by W.A.Pryor, Academic Press, Berlin.

Foote C.S. (1991). Definition of type I and type II photosensitized oxidation, *Photochem. Photobiol.*, 54 (5), p. 659.

Foote C.S. and Clennan E. (1995). Properties and reactions of singlet dioxygen. In Active oxygen in Chemistry. Foote, Valentine J.S., Greenberg A., Liebman J.F.,Eds Chapman and Hall, London, 105-140 p.

Fuller Z. J., Bare W. D., Kneas K. A., Demas J. N. and DeGraff B. (2003). A.Photostability of Luminescent Ruthenium (II) Complexes in Polymers and in Solution, *Anal. Chem.*, 75, p. 2670–2677.

Gallo R. (2009). Cours de Chimie (Infra rouge), Université de Montréal.

Garcia F., Geogiadou Y., Orellana G., Braun A. and Oliveros E. (1996). Singlet Oxygen ($^1\Delta_g$) production by Ruthenium (II) complexes containing polyazaheterocyclic ligands in Methanol and in water., *Helv. Chim. Acta*, 79, p. 1222-1238.

García F. D., Marazuela M. D., Moreno-B M. C. and Orellana G. (1999). Luminescent Nafion Membranes Dyed with Ruthenium (II) Complexes as Sensing Materials for Dissolved Oxygen, *Langmuir*, 15, p. 6451–6459.

Girotti AW (1998). Lipid hydroperoxide generation, turnover and effector action in biological systems, *J. Lipid Res.*, 36, p.1529-1542.

Iesce R., Cermelo F.and Temussi F. (2005). Photooxygenation of heterocycles, *Current Organic Chemistry*, 9, p.109-139.

Jiménez E., Manjon F., Fresnadillo D. and Orellana G. (2005). Solar water disinfection by singlet oxygen photogenerated with polymer-supported Ru (II) sensitizers, *Solar Energy*, Volume 80, Issue 10, p. 1382 – 1387.

Jori G. and Brown S. (2004). Photosensitized inactivation of microorganisms, *Photochem. Photobiol.*, 3 (5), p. 403–405.

Joshi P.C. and Pathak M.A. (1983). Production of singlet oxygen and superoxide radicals by psoralens and their biological significance, *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, 111, p.638-646.

Julie C. (1998). La belle histoire de la bergamote, Magazine steps.

Korywitoski W. and Girotti A.W. (1999). Singlet oxygen adducts of cholesterol: Photogeneration and reductive turnover in membrane systems, *Photochem Photobiology*, 70, p.484-489.

Kühni J., Derieux J. and Belser P. (2007). Quantitative self-sensitized photooxidation of 1, 2 Diarylcylobutane derivatives by singlet oxygen, *Synthesis*, 09, p. 1421-1425.

Lacolley P., Babuty D., Boulanger C., Chaleh B., Loirand G., Pinet F. et Samuel J. (2007). Biologie et Pathologie du Cœur et des vaisseaux, Jhon Libbey, *Eurotext*, 312p.

Lowe N.J., Cripps DV. and Warrin A.P. (1979). Photochemotherapy for mycosis fungoides, *Arch Dermatol.*, 115, p.50-53.

Luksiene Z. (2005). New approach to inactivation of harmful and pathogenic microorganisms by photosensitization, Photosensitization: An Overview, *Food Technol. Biotechnol.*, 43(4), p. 411–418.

Machet V. et Vaillant L. (2006). Dermatologie en gynécologie obstétrique, 2^{ième} éd., Masson, 157p.

Malik Z., Hannania J. and Nitzan Y. (1990). Bactericidal effects of photoactivated porphyrins an alternative approach to antimicrobial drugs, *J. Photochem. Photobiol.*, B: Biol., 5 (3–4), p.281–293.

Marchado A., Miranda J., Campos A. and Nicodem D. (2001). Photophysical properties of two new psoralen analogs, *Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry*, 146, p. 75-81.

Marin C., Marchisio G, Janinet O. and Le Bon B. (2000). Contrôle CLHP des huiles essentielles de citrus: Cas des huiles essentielles de citron.

Masscheleir-Kleiner et Heylen J. (1968). Analyse des laques Rouges anciennes, *Studies in Conservation*, 13, p87-89.

Mehmet K., Hanefi O., Aydin H., Mehemet T., Hasan A. and Veysel K.(2007). Investigation of Anti-inflammatory activity of Bergamot oil., *Eur. J. Gen. Med.*, 4(4), p. 176-179.

Merchat M., Bertoloni G., Giacomini P., Villanueva A. and Jori G. (1996). Meso-substituted cationic porphyrins as efficient photosensitizers of Gram-positive and Gram-negative bacteria, *J. Photochem. Photobiol.*, B: Biol., 32 (3), p. 153–157.

Morrison R. and Boyd R. (1992). Organic Chemistry, Sixth edition, New York University, 984-985p.

Morison W.L., Parrish J.A., Fitzpatrick TB. (1987). Oral psoralen photochemotherapy of atopic eczema. , *J. dermatol.*, 98, p.25-30.

Moureu C., Dufraisse C. et Dean P.M. (1926). Comptes rendus, Acad. Sci. Paris, 182, 1584p.

Muhammad M., Salim U., Zafariqbal and Faqir M. (2006). Genetic Variability to essential oil composition in four Citrus fruit species, *Pak. J.*, 38 (2), p.319-324.

Müller S.A. (1983). Adverse effects of laxatives: fact and fiction, in pharmacology, Vol. 47, suppl.1, p.138.

Naganuna M., Hirose S., Nakayama Y., Nakajima K. and Someya T. (1985). A study of the phototoxicity of lemon Oil, *Dermatological Research*, 278, p 31-36.

Netanel K. and Eylon Y. (2010). Site specific DNA photocleavage and photomodulation by oligonucleotide conjugates, *Oligonucleotides*, Volume 20, p. 263-275.

Nina A., Dmitriy A., Oleg L. and Georgy N. (2007). Photosensitized oxidation by dioxygen as the base for drinking water disinfection, *Journal of Hazardous Materials*, Volume 146, Issue 3, p. 487-49.

Nitzan Y., Gutterman M., Malik Z. and Ehrenberg B. (1992). Inactivation of Gram negative bacteria by photosensitized porphyrins, *Photochem. Photobiol.*, 55 (1), p. 89–96.

Ongoka P., Matini L. Moutou J., Youhouvoulou N. (2007). Caractérisation des indicateurs colorés naturels par abondance des quinones dans les extraits de quelques végétaux, *Journal des Sciences*, p.25-29.

Orwa (2009). *Citrus bergamia*, Agroforestry database 4.0.

Parrish J.A., Fitzpatrick T.B., Tannenbaum L. and Pathak M.A. (1974). Photochemotherapy of psoriasis with oral methoxsalen and long wave ultraviolet light. N., *Engl. J. Med.*, 291, p.1207-1222.

Parrish J.A., Fitzpatrick T.B., Shea C. and Pathak M.A. (1976). Photochemotherapy of vitiligo, *Arch Dermatol.*, 112, p. 1531-1535.

Pathak M.A. et Joshi P.C. (1983). The nature and molecular basis of cutaneous photosensitivity to psoralen and coal., *J. Invest. Dermatol.*, 80, p.66-74.

Peterson J.S. (2004). *Citrus limonum*, Botanical Berkeley Garden, University of California.

Rengifo H., Sanabria J., Machuca F., Dierolf C. F., Pulgarin C. and Orellana G. A. (2007). Comparison of Solar Photocatalytic Inactivation of Waterborne E. coli Using Tris (2, 2-bipyridine) ruthenium (II), Rose Bengal and TiO₂, *J. Solar Energy Eng.*, 129, p.135–140.

Roussel J. (2009). Optique ondulatoire, ENSCR.

- Sabbahi S, Alouini Z. et Jemli M. (2000). Etude de la désinfection Photodynamique des eaux usées par le Rose de Bengale sel dissodique RB-2Na, Proc. Int. conf. on waste water treatment and Reuse Adapted to Mediterranean Area, p137-140.
- Schafer M., Schmitz C., Facius R., Horneck G., Milow B., Funken K.H. and Ortner J. (2000). Systematic study of parameters influencing the action of rose Bengal with visible light on bacterial cells: Comparison between the biological effect and singlet oxygen production, *Potochem. photobiol.*, 71 (5), p. 514-523.
- Séguin M., Descheneau M. et Tardif B. (2010). Physique XXI, Tome C, Ondes et Physique Moderne, De boek, Bruxelles.
- Serrano J., Merchan M. and Serrano L. (2008). Photoreactivity of furocoumarins and DNA in PUVA Therapy: Formation of Psoralen-Thymine Adducts, *J. Phys. Chem. B*, 112, p. 14002-14010.
- Smith R.M. and Sadaquat A. (1979). Anthraquinones from the leaves of *Cassia alata* from Fiji, *New Zealand Journal of Science*, 22, p.123-125.
- Sue C. (2004). Essential Chemistry for safe aromatherapy, Tokyo, p. 81-82.
- Sunda M., Rosillon F. et Taba K.M. (2008). Contribution à l'étude de la désinfection de l'eau par photosensibilisation avec les extraits de plantes, *Eur.Jour.of Water Quality*, Tome 39, Fasc. 2, p 199-209.
- Swingle W. and Reece P.C. (1967). The botany of Citrus and its wild relatives. In: Reuters W., weber HJ and Batchelor LD. (Editors): The *Citrus* industry. Vol.1 ,University of California, Division of agricultural sciences, Berkeley, United states, 190-430p.
- Towers G. (1985). Significance of phototoxic phytochemicals in insect herbivory Jablonsky, *Nature*, 131, p.839 -840.
- Ulrich R. (1952). La vie des fruits: Origine, développement, Structure. Ed. Masson, p.369.
- USDA, NRCS (2009). The plant database, baton rouge, 70874-4490, USA.
- US EPA (2000). National primary drinking water regulations: ground water rule, proposed rules, Federal Register (10), p.30194-30272
- Valduga G., Bertoloni G., Reddi E. and Jori G. (1993). Effect of extracellularly generated singlet oxygen on Gram-positive and Gram-negative bacteria, *J. Photochem. Photobiol.*, B: Biol., 21 (1), p. 81-86.
- Valeur B. (2004). Fluorescence moléculaire, Edition De Boeck et Larsier.
- Valkova S. (2007). UVB phototherapeutic modalities comparison of two treatment for chronic Psoriasis, *Acta Dermatoven APA*, Vol. 16, N°1, p. 26-30.

Villén, L., Manjón, F., García F. D. and Orellana G. (2006). Solar Reactor for Water Disinfection by Sensitised Singlet Oxygen Production in Heterogeneous Medium, *Appl. Catal.*, 69, p.1.

Wasserman H. and Murray R. (1979). Singlet Oxygen, *Organic Chemistry*, Vol 40, Academic Press New York.

Weisenseel P. and Woitalla S. (2005). Toxic mustard plaster dermatitis and phototoxic dermatitis after application of bergamot oil, *MMW Fortschr Med.*, 147, p.51-52.

Winter C.A., Risley EA. and Nuss G.W. (1962). Carragenin-induced edema in hind paws of the rats as assays for anti-inflammatory drugs, *Proc. Soc. Exp. Bio. Med.*, 111, p. 544.

Yurkow J. and Laskin J. (1991). Mechanism of action of Psoralens: Isobologram Analysis reveals that Ultraviolet light potentiation of psoralen action is not additive but synergistic, *Cancer Chemother Pharmacol.*, 27, p. 315-319.

Zacher K.D. and Ippen H. (1984). Contact dermatitis caused by bergamot oil, *Derm Beruf umwelt*, 32(3), p.95.

Zhiri A. et Baudoux D. (2009). Huiles essentielles chémotypées et leurs synergies, Edition Inspir Development, Luxembourg, p. 20- 51.

CONCLUSION DE LA SECTION I

Dans la section I, consacrée essentiellement à la bibliographie, nous avons parcouru les différentes notions devant permettre de mener à bien cette recherche. Les chapitres suivants ont été abordés :

- La situation générale relative à la qualité microbiologique de l'eau. Ce chapitre a mis en exergue le problème d'accès à l'eau potable et ses implications sur la santé publique. Les microorganismes permettant d'évaluer le risque microbiologique de l'eau et les méthodes domestiques de désinfection de l'eau sont également présentés (chloration, ozonation, lampes ultraviolettes). La désinfection solaire (Sodis) devrait être une alternative à toutes ces méthodes. Or, Sodis est tributaire des conditions climatiques. Ce procédé de désinfection peut être amélioré par la photosensibilisation ;
- Le dernier chapitre de cette section est axé sur la notion de photosensibilisation que nous avons abordée à travers ses trois composantes : la lumière, les photosensibilisateurs et l'oxygène singulet. Les différentes classes de photosensibilisateurs, leur mode d'action ainsi que la production d'oxygène singulet ont donc été présentés. Les applications de l'oxygène singulet, notamment pour la désinfection de l'eau, ont été évoquées.

Après avoir présenté l'état de l'art de la problématique traitée dans ce travail, nous pouvons maintenant passer à la partie expérimentale (section 2), tout en expliquant au préalable notre stratégie de recherche.

SECTION II : PARTIE EXPERIMENTALE

CHAPITRE IV

CHAPITRE IV: STRATEGIE DE RECHERCHE

Ce chapitre présente la stratégie qui a permis de mener à bien la présente recherche. Rappelons que l'objectif général de cette recherche consiste à évaluer puis caractériser l'effet photosensibilisateur d'extraits de plantes appliqués à la désinfection de l'eau. Ce travail se doit aussi de répondre aux 4 objectifs spécifiques (OS) suivants:

- OS1: Rechercher les extraits de plantes qui présentent un effet photosensibilisateur ;
- OS2: Mettre en évidence le groupe de substances concernées par le processus de photosensibilisation ;
- OS3: A partir de ce groupe, identifier la (les) molécule(s) responsable(s) et évaluer leur effet photosensibilisateur ;
- OS4: Fixer la (les) molécule(s) sur un support solide tel qu'un polymère ou un filtre tout en conservant leur pouvoir photosensibilisant (voir figure 4.1.).

Pour atteindre ces objectifs, notre étude a exploré deux domaines de recherche : l'un relatif à la caractérisation chimique des photosensibilisateurs ; l'autre à l'étude des performances en termes d'inhibition d'indicateurs de contamination fécale en vue d'une application en désinfection de l'eau.

Les substances étudiées se présentent sous différentes formes, d'une forme relativement brute constituée par les plantes et leurs extraits jusqu'à une molécule chimiquement pure en passant d'une démarche de prospection assez « grossière » à une étude ciblée sur la connaissance des conditions de photosensibilisation.

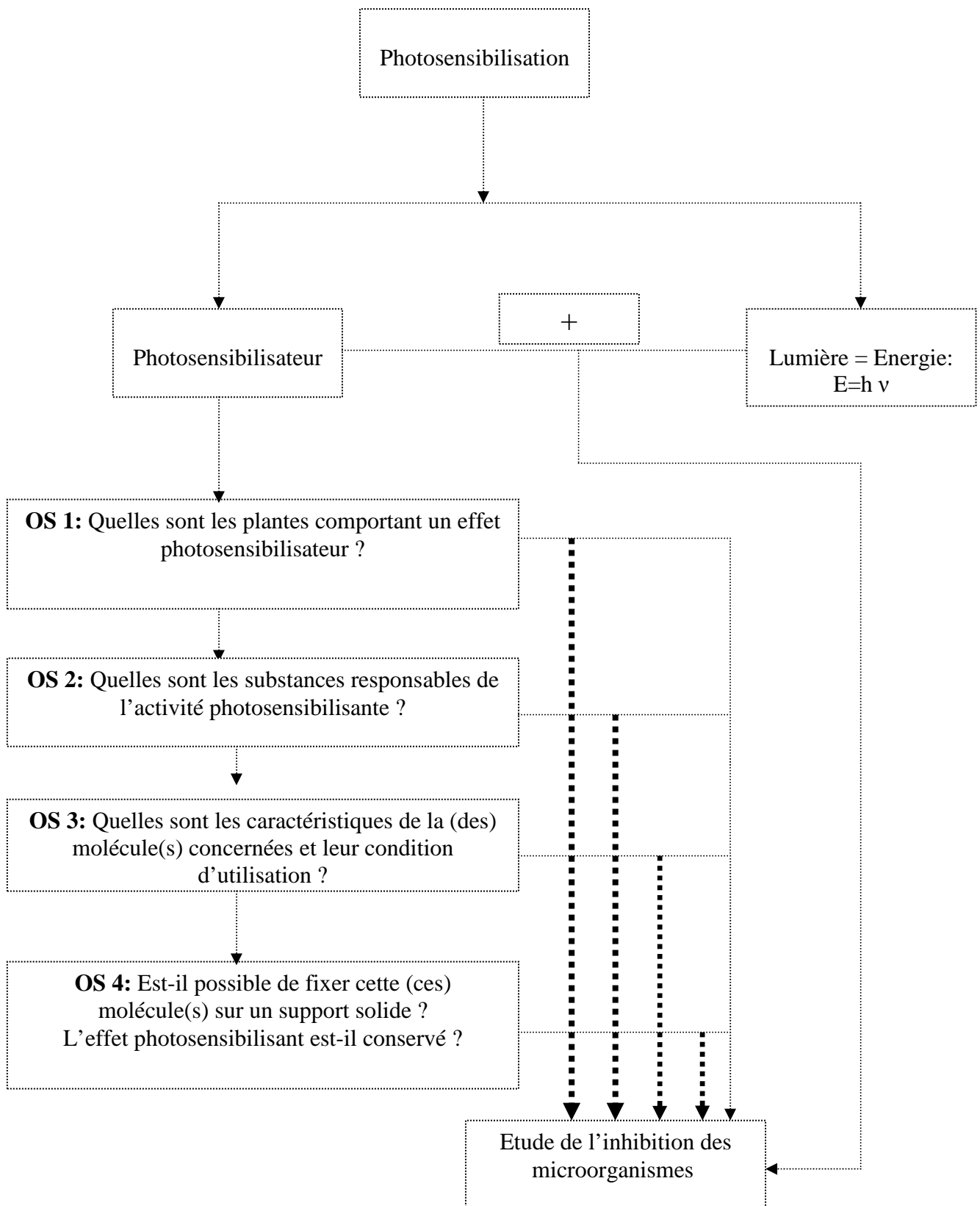


Figure 4.1.: Objectifs spécifiques poursuivis.

L'évolution du travail, d'une phase de recherche à l'autre a été dictée par les apports de la littérature et par nos observations. Celles-ci ont conduit à mettre en évidence les éléments (apports concluants ou contraintes) justifiant l'étape suivante. Le cheminement suivi, présenté à la figure 4.2., est succinctement décrit ci-après.

Etape 1.

Notre point de départ fait référence à l'étude de Taba K.M. et Luwenga E.(1999), relative à la désinfection de l'eau par photosensibilisation avec les extraits aqueux de feuilles de *Cassia alata*, *Cassia occidentalis*, *Carica papaya*, *Cymbopogon stratus*, *Lantana camara* et *Hibiscus rosa simentis*. Dans notre travail, nous avons repris les mêmes plantes en ajoutant *Coleus kilimandschari* et *Phyllanthus niruri*, en raison de leur usage pour le traitement de certaines maladies microbiennes et parasitaires. Les extraits aqueux de ces plantes ont été étudiés et classés en deux catégories: une première, constituée des plantes bactéricides sans effet photosensibilisateur ; une deuxième, constituée des plantes photosensibilisatrices. Il a été démontré que seuls les extraits non alcaloïdiques sont photosensibilisateurs mais les temps d'exposition à la lumière doivent être relativement long (3 heures). Les meilleures performances d'inhibition des coliformes fécaux ont exigé une saturation du milieu en oxygène. Nous avons tenté de nous libérer de cette contrainte en recherchant d'autres plantes.

Etape 2.

La revue de la littérature nous a alors conduit à nous intéresser aux plantes de la famille des Rutacées. Mais cette fois ce sont les huiles essentielles de ces plantes qui ont été étudiées. 3 espèces ont été retenues: *Citrus bergamia*, *Citrus reticulata* et *Citrus limonum*. Une étude comparative entre ces trois espèces a mis en évidence *Citrus bergamia* comme l'espèce la plus active.

Etape 3.

Nous avons donc poursuivi notre investigation de manière plus précise en retenant l'huile essentielle de cette seule espèce. Celle-ci a montré une activité photosensibilisatrice très intéressante vis-à-vis des coliformes fécaux et des entérocoques fécaux. L'examen de la composition chimique de l'huile essentielle de *Citrus bergamia* en spectrométrie de masse a permis de mettre en évidence la molécule responsable de l'effet photosensibilisateur, le méthoxy-5 psoralène (MOP-5), molécule signalée par plusieurs auteurs comme agent photosensibilisateur. Par la suite, nous avons poursuivi nos recherches en étudiant cette seule molécule obtenue chimiquement pure auprès d'une firme de produits chimiques.

Etape 4.

Lors de l'utilisation de cette molécule en solution dans l'eau à désinfecter, après avoir confirmé ses performances en matière de photosensibilisation, nous nous sommes heurtés à la difficulté de récupérer le photosensibilisateur après un premier usage en vue d'utilisations ultérieures.

Etape 5.

C'est alors que tout logiquement, nous nous sommes orientés vers la recherche d'un support solide sur lequel pourrait être fixé le MOP-5. Le polystyrène s'est avéré être un support intéressant, tout en l'exploitant sous deux formes différentes. Il s'agissait également de vérifier si l'effet photosensibilisateur du MOP-5 fixé était conservé.

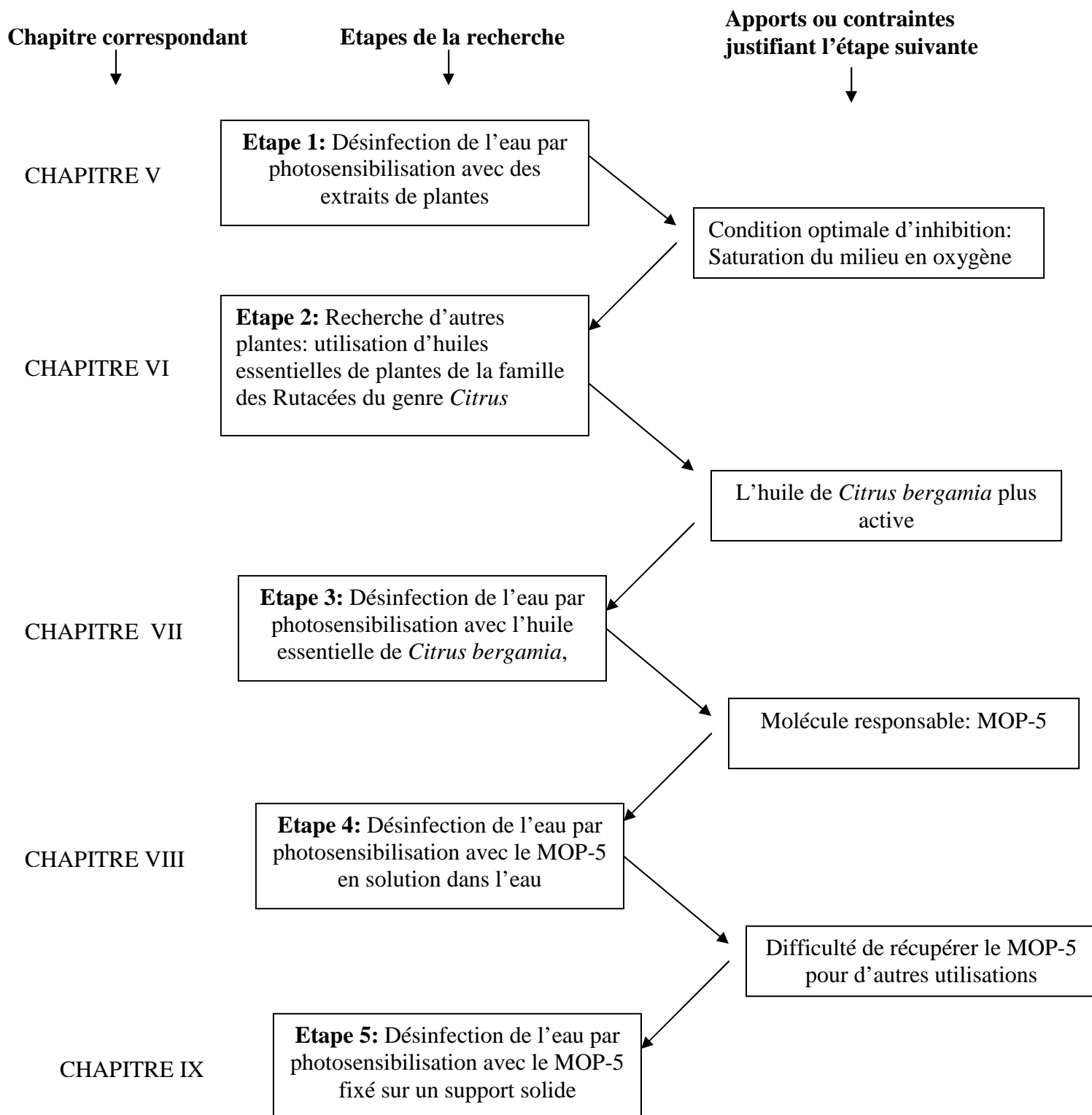


Figure 4.2.: Etapes poursuivies dans cette recherche.

A chacune des étapes de notre recherche correspond un chapitre spécifique (du chapitre 5 au chapitre 9) traditionnellement structuré en 5 parties:

- Introduction ;
- Matériel et méthodes ;
- Résultats et discussion ;
- Conclusion ;
- Références bibliographiques.

Une discussion générale, précédant la conclusion finale, permettra de mener une réflexion critique sur l'ensemble des résultats obtenus et sur les conditions d'application concrète de ces résultats en vue de la production d'eau potable au niveau familial.

CHAPITRE V

CHAPITRE V: CONTRIBUTION A L'ETUDE DE LA DESINFECTION DE L'EAU PAR PHOTSENSIBILISATION AVEC DES EXTRAITS DE PLANTES

Ce chapitre a fait l'objet d'une publication sous la référence:

Sunda M., Rosillon F. et Taba K.M. (2008). Contribution à l'étude de la désinfection de l'eau par photosensibilisation avec les extraits de plantes, *Eur. Jour. of Water Quality*, Tome 39, Fasc. 2, p. 199-209.

1. Introduction

Taba K.M. et Luwenga E. (1999), lors de l'étude de la désinfection de l'eau par photosensibilisation avec des extraits aqueux des feuilles des plantes de *Cassia occidentalis* (C.o.), *Carica papaya* (C.p.), *Cymbopogon stratus* (C.s.), *Lantana camara* (L.c.), *Cassia alata* (C.a.) et *Hibiscus rosa simentis* (H.rs.), remarquèrent que ceux-ci se regroupent en deux catégories:

- d'une part, C.o., C.a. et C.p. présentaient un effet photosensibilisateur ;
- et d'autre part, C.s., L.c. et H.rs. présentaient un effet bactéricide direct, au regard de l'inactivation des coliformes fécaux à l'obscurité. Cependant, il était difficile dans les conditions d'expérimentation de déterminer la nature des composés responsables de l'effet photosensibilisateur. Seul l'isolement bioguidé des substances contenues dans ces extraits devrait permettre de relier avec certitude la nature de la structure à la photosensibilisation (Taba K.M. et Luwenga E., 1999).

C'est ainsi que dans ce travail, nous proposons de fractionner les extraits de ces plantes en fractions alcaloïdiques et non alcaloïdiques et d'étudier leur effet photosensibilisateur séparément. Nous avons élargi l'éventail de plantes en y ajoutant deux espèces: *Phyllanthus niruri* (P.n.) et *Coleus kilimandschari* (C.k.), en raison de leur usage dans le traitement des infections parasitaires et microbiennes (Kerharo J. et Adam J., 1974 ; Kasuku A. et al., 1997).

2. Matériel et méthodes

2.1. Echantillonnage

L'eau polluée provenait d'une fosse septique du Home 30 de l'Université de Kinshasa. Après les tests bactériologiques (présomption, dénombrement et confirmation des coliformes, *E.coli* en l'occurrence), des dilutions au 1/100^{ème} et 1/50^{ème} avec de l'eau distillée ont été effectuées afin de ramener la concentration en coliformes entre 30 et 300 UFC/ml (Rodier J. et al., 2009).

2.2. Préparation des extraits aqueux de plantes

Les feuilles de plantes utilisées dans le traitement de l'eau ont été récoltées sur le site de l'Université de Kinshasa (voir photo 5.1.). Elles ont été identifiées à l'herbarium de l'Institut National pour l'Etude Agronomique au Congo/Université de Kinshasa. Celles-ci appartiennent à différentes familles mentionnées dans le tableau 5.1.

Plantes	Familles
<i>Cassia alata</i>	<i>Caesalpinaceae</i>
<i>Cassia occidentalis</i>	<i>Caesalpinaceae</i>
<i>Carica papaya</i>	<i>Caricaceae</i>
<i>Coleus kilimandschari</i>	<i>Lamiaceae</i>
<i>Cymbopogon stratus</i>	<i>Cymodocea</i>
<i>Lantana camara</i>	<i>Verbenaceae</i>
<i>Phyllanthus niruri</i>	<i>Euphorbiaceae</i>

Tableau 5.1.: Plantes utilisées et familles correspondantes.



Photo 5.1.: Feuille de *Cassia alata* / Kinshasa.

Après séchage des plantes à la température ambiante pendant deux mois (voir photo 5.2.), les extraits aqueux de plantes ont été préparés par décoction de 10 g de feuilles sèche dans 400 ml d'eau distillée. Après 30 minutes d'ébullition, le filtrat est refroidi et utilisé comme tel (voir photo 5.3.).

En vue de mettre en évidence les différentes classes de produits naturels (alcaloïdes totaux, saponines, tanins, caroténoïdes, anthraquinones, flavonoïdes et terpenoïdes), un criblage phytochimique a été effectué sur les extraits aqueux éthanoliques, selon les méthodes classiques (Harborne J., 1973).

2.3. Mode opératoire

A 1 litre d'eau polluée, on ajoute 2 ml d'extraits de plantes. On place 10 ml du mélange dans 15 tubes à essais. Après avoir fermé les tubes à l'aide d'un bouchon, on place un lot de 5 tubes à l'obscurité, un deuxième lot est exposé au soleil et un troisième lot est exposé au soleil sous une saturation en oxygène (barbotage d'oxygène pur). Après chaque heure, on retire un tube de chaque lot pour les analyses bactériologiques (Taba K.M. et Luwenga E., 1999).

2.4. Analyses bactériologiques

Le milieu de culture est composé de: 1 g de tryptophane ; 0,1 g de glucose et 0,1g d'extrait de viande dans 100 ml d'eau distillée. Le mélange est stérilisé à 120°C pendant 15 minutes et conservé au réfrigérateur.

L'ensemencement du milieu est effectué en ajoutant 2 ml du milieu de culture à 5 ml d'eau traitée. Après 48 heures d'incubation, on ajoute le réactif de Kovacs au mélange. L'apparition d'un anneau rouge atteste la présence des coliformes fécaux (Taba K.M. et Luwenga E., 1999). La solution de bleu de méthylène (1g dans 50 ml d'eau distillée) dont les effets photodynamiques sont connus (Sabbahi S. *et al.*, 2000 ; Cooper A. et Yogi D., 2002) a servi de témoin positif, tandis que l'eau polluée sans extraits a servi de témoin négatif.

2.5. Séparation des extraits de plantes

Les groupes chimiques présents dans les extraits de plantes: alcaloïdes, quinones, flavonoïdes, saponines et terpènes peuvent contenir des chromophores capables d'absorber la lumière et d'initier une photosensibilisation. La séparation de ses groupes devrait permettre en principe de savoir lequel est responsable de l'action photodynamique. Ainsi, dans un premier temps, les extraits de plantes ont été fractionnés en extraits alcaloïdiques et non alcaloïdiques comme suit: on chauffe à reflux la poudre de la matière organique dans l'éthanol pendant 4hrs. Après filtration, l'éthanol est concentré à pression réduite. Le résidu obtenu est traité avec du HCl 0,5 N puis extrait plusieurs fois avec l'acétate d'éthyle.

Les phases organiques sont combinées et concentrées pour donner un résidu, la fraction non alcaloïdique. La phase aqueuse est alcalinisée avec du NaOH 15 % jusqu'à pH 10 et extraite plusieurs fois avec l'acétate d'éthyle. Cette phase organique est concentrée sous vide pour donner un résidu d'alcaloïdes totaux (voir figure 5.1.).



Photo 5.2.: Séchage de plantes / Kinshasa.



Photo 5.3.: Concentration d'extraits de plantes / Université de Kinshasa.

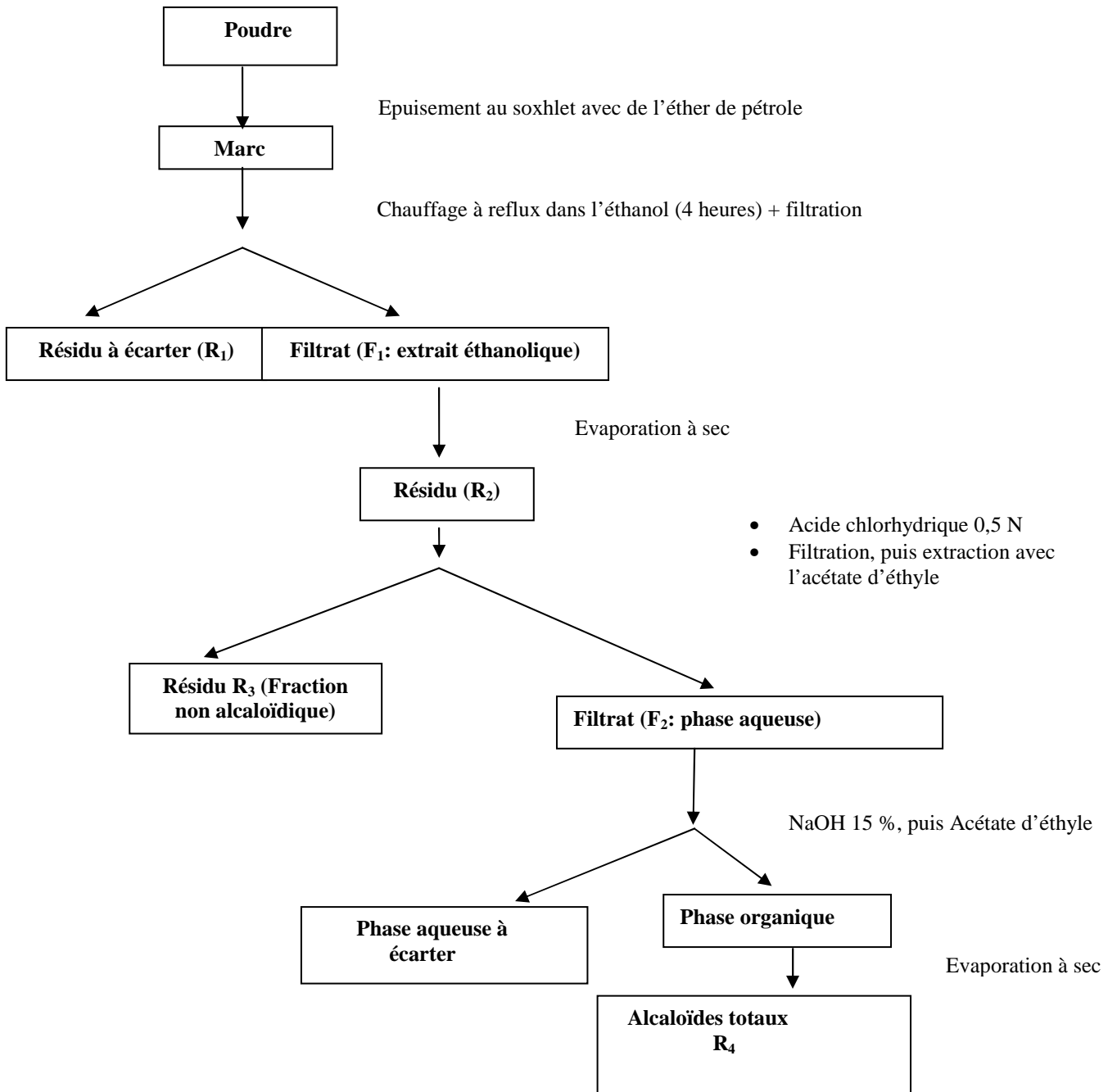


Figure 5.1.: Extraction des fractions alcaloïdiques et non alcaloïdiques.

3. Résultats et discussion

3.1. Traitement de l'eau polluée par les extraits aqueux de plantes

Dans les tableaux 5.2., 5.3. et 5.4., la présence des coliformes fécaux est indiquée par le signe positif (indole +). Par contre, le signe négatif indique l'absence de ces derniers (indole -).

Au regard des résultats repris dans le tableau 5.2., les extraits aqueux de *Lantana camara*, *Cymbopogon stratus* et *Hibiscus rosa simentis* ont montré un effet bactéricide mis en évidence par l'inactivation des microorganismes (coliformes fécaux) à l'obscurité. Dans la suite du travail, les extraits de ces plantes ont été écartés suite à leur activité bactéricide. Pour les extraits aqueux de *Cassia occidentalis*, *Cassia alata*, *Carica papaya* et de *Coleus kilimandschari*, nous avons remarqué un effet photosensibilisateur.

L'inactivation des coliformes dans l'eau s'est faite après 5 heures (hrs) sous la lumière solaire, en absence de photosensibilisateur. La durée moyenne d'insolation diminue à 3 heures (hrs) en présence de photosensibilisateur. La saturation du milieu en oxygène pur réduit davantage le temps d'insolation nécessaire à l'inactivation des bactéries à moins de 2 hrs (voir tableau 5.2.).

Temps d'exposition (heure)	Obscurité					Rayons solaires (+Oxygène)									
	1H	2H	3H	4H	5H	1H		2H		3H		4H		5H	
						R	R, O ₂	R	R, O ₂	R	R, O ₂	R	R, O ₂	R	R, O ₂
<i>Carica papaya</i>	+	+	+	+	+	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-
<i>Cassia occidentalis</i>	+	+	+	+	+	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-
<i>Cassia alata</i>	+	+	+	+	+	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-
<i>Phyllanthus niruri</i>	+	+	+	+	+	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-
<i>Coleus kilimandschari</i>	+	+	+	+	+	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-
<i>Lantana camara</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Hibiscus rosa simentis</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Cymbogon stratus</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Eau polluée sans extraits	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
Bleu de méthylène	+	+	+	+	+	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-

Tableau 5.2.: Traitement de l'eau polluée avec 2 ml d'extraits aqueux de plantes.

Légende:

(-): Absence des coliformes fécaux

R: Rayons solaires

(+): Présence des coliformes fécaux

R, O₂: Rayons solaires + Oxygène

Ces observations laissent supposer que l'oxygène singulet généré dans le milieu est responsable de la désinfection de l'eau, car en absence de la lumière solaire et du photosensibilisateur, aucune désinfection n'a été observée. L'action photodynamique n'est envisagée que lorsqu'il y a conjugaison de trois paramètres, à savoir la lumière, le sensibilisateur et l'oxygène (Sabbahi S. *et al.*, 2000 ; Cooper A. et Yogi D., 2002).

3.2. Traitement de l'eau polluée par les extraits alcaloïdiques et non alcaloïdiques

Chaque extrait, alcaloïdique que non alcaloïdique, a été soumis aux mêmes tests de photosensibilisation que les extraits aqueux totaux.

Il a été remarqué que les extraits alcaloïdiques inactivent les micro-organismes à l'obscurité et aussi en présence de la lumière solaire. Cette inactivation pourrait être due à un effet bactéricide généré par les alcaloïdes présents dans le milieu (voir tableau 5.3.). Le fait que l'inactivation soit indépendante de la durée de l'exposition à la lumière milite en faveur d'un effet bactéricide important. D'ailleurs, l'effet bactéricide remarqué pour les extraits aqueux de *Lantana camara*, *Cymbopogon stratus* et de *Hibiscus rosa simentis* peut être attribué à la présence, dans ces extraits, des alcaloïdes, qui sont cités par plusieurs auteurs (Porter K., (S.d) ; Lance K., 2003 ; Iteman I., 2004 ; Davenport W., 2006) comme étant, pour la plupart, toxiques, et à l'absence des quinones (voir tableau 5.5.).

Temps d'exposition (heure)	Obscurité					Rayons solaires + O ₂				
	1H	2H	3H	4H	5H	1H	2H	3H	4H	5H
<i>Carica papaya</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Cassia occidentalis</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Cassia occidentalis</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Phyllanthus niruri</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Coleus kilimandschari</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Eau polluée sans extrait	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
Bleu de méthylène	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-

Tableau 5.3.: Traitement de l'eau polluée avec 2 ml d'extraits alcaloïdiques.

Légende:

(-): Absence des coliformes fécaux

R: Rayons solaires

(+): Présence des coliformes fécaux

R, O₂: Rayons solaires +oxygène

Le signe positif (+) atteste la présence d'indole dans le tube. Par contre, le signe négatif (-) traduit l'absence d'indole dans le tube.

Temps d'exposition (heure)	Obscurité					Rayons solaires +O ₂				
	1H	2H	3H	4H	5H	1H	2H	3H	4H	5H
<i>Carica papaya</i>	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-
<i>Cassia occidentalis</i>	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-
<i>Cassia alata</i>	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-
<i>Phyllanthus niruri</i>	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-
<i>Coleus kilimandschari</i>	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-
Eau polluée sans extraits	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
Bleu de méthylène	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-

Tableau 5.4.: Traitement de l'eau polluée avec 2 ml d'extraits non alcaloïdiques.

Légende:

(-): Absence des coliformes fécaux

R: Rayons solaires

(+): Présence des coliformes fécaux

R, O2: Rayons solaires +oxygène

Les extraits non alcaloïdiques ont montré un effet photosensibilisateur (voir tableau 5.4.). Cet effet serait dû à la présence des anthraquinones et des quinones qui sont citées par Karyakin comme des photosensibilisateurs potentiels (Karyakin, 1961) et dont la structure avoisine celle du bleu de méthylène et de l'éosine, deux photosensibilisateurs classiques. D'ailleurs, plusieurs auteurs citent les quinones comme d'excellents générateurs d'oxygène singulet (Isela *et al.*, 1997 ; Taba et Luwenga, 1999 ; Fufezan *et al.*, 2007). En présence de la lumière, ces composés sont donc capables de générer l'oxygène singulet ; ce dernier ainsi généré attaque et endommage la plupart des micro-organismes présents dans le milieu (Sabbahi *et al.*, 2000 ; Cavalcante A. *et al.*, 2002). C'est ce qui a d'ailleurs été remarqué lors du traitement de l'eau polluée avec les extraits non alcaloïdiques de *Cassia occidentalis*, *Cassia alata*, *Carica papaya* et de *Coleus kilimandschari* (voir tableau 5.4.).

Nos résultats sont similaires à ceux trouvés par Taba et Luwenga (1999), lors de la désinfection de l'eau par photosensibilisation avec des extraits aqueux des feuilles de plantes de *Cassia occidentalis* (C.o.), *Carica papaya* (C.p.), *Cymbopogon stratus* (C.s.), *Lantana camara* (L.c.), *Cassia alata* (C.a.) et *Hibiscus rosa simentis* (H.rs.). En effet, Taba et Luwenga (1999), ont remarqué que ces extraits se regroupent en deux catégories: d'une part, C.a., C.o. et C.p. présentaient un effet photosensibilisateur qui permet d'inactiver les coliformes fécaux déjà avec une concentration de 2 ml pour 1 l d'eau polluée, en présence ou non d'oxygène pur ; et d'autre part, les extraits aqueux de C.s., L.s. et H.rs., qui présentaient un effet bactéricide direct au regard de l'inactivation des coliformes fécaux à l'obscurité. Néanmoins, il était difficile dans les conditions expérimentation d'attribuer l'activité bactéricide trouvée pour les extraits de C.s., L.s. et H.rs. à un groupe chimique donné.

Nos expériences montrent que l'activité bactéricide mise en évidence par Taba K.M. et Luwenga E. (1999), dans les extraits aqueux de C.s., L.c. et H.rs. est directement liée à l'absence des quinones et anthraquinones et à la présence des alcaloïdes. Ces derniers ont révélé une importante activité bactéricide conduisant à l'inactivation des coliformes fécaux en présence des rayons solaires tout comme à l'obscurité (voir tableaux 5.3. et 5.5.).

L'activité photodynamique trouvée par Taba K.M. et Luwenga E. (1999) dans les extraits du premier groupe devrait être liée à la présence des quinones et anthraquinones, qui sont cités par Masscheleir-Kleiner L. et Heylen J.B. (1968) comme étant des colorants naturels. De ce fait, ces molécules sont capables d'emmagasiner l'énergie solaire, celle-ci étant ensuite transférée à l'oxygène, ce dernier passe dès lors de l'état fondamental, forme triplet, à l'état excité, forme singulet, tout en endommageant drastiquement les coliformes fécaux présents dans le milieu. Ceci est conforme aux résultats trouvés dans plusieurs études, mettant en évidence les colorants classiques pour générer l'oxygène singulet dans la désinfection de l'eau (Sabbahi *et al.*, 2000 ; Cooper A. et Yogi T., 2002).

	<i>Carica papaya</i>	<i>Cassia occidentalis</i>	<i>Cassia alata</i>	<i>Phyllanthus niruri</i>	<i>Coleus kilimandschari</i>	<i>Cymbopogon stratus</i>	<i>Lantana camara</i>	<i>Hibiscus rosa-simentis</i>
Alcaloïdes totaux	+	+	+	+	+	+	++	++
Quinones ou Anthraquinones	++	++	+	+	+	-	-	-
Terpéniques ou stéroïdes	+	++	+	+	+	+++	++	-
Saponines	+	+	+	+	+	-	+++	-
Tanins	+	+	+	+	-	+	++	-
Flavonoïdes	+	+	+	+	-	+	+	-

Tableau 5.5.: Criblage phytochimique des extraits de plantes (Taba K.M. et Luwenga E., 1999).

Légende:

(+): Test positif ; (-) : Test négatif ; (++) : Substances en quantité moyenne
(+++): Substances en grande quantité

4. Conclusion

L'étude de la désinfection de l'eau par photosensibilisation avec les extraits de plantes a révélé que les extraits aqueux de *Cassia occidentalis*, *Cassia alata*, *Carica papaya* et de *Coleus kilimandschari* présentent un effet photosensibilisateur. Quant aux extraits aqueux de *Lantana camara*, *Cymbopogon stratus*, *Hibiscus rosa simentis* et *Phyllanthus niruri*, un effet bactéricide a pu être mis en évidence.

L'examen des extraits alcaloïdiques et non alcaloïdiques de *Cassia occidentalis*, *Cassia alata*, *Carica papaya* et de *Coleus kilimandschari* a révélé un effet photodynamique pour les extraits non alcaloïdiques. Par contre, les extraits alcaloïdiques ont révélé un effet bactéricide au regard de l'inactivation des coliformes fécaux à l'obscurité.

Les études supplémentaires s'avèrent nécessaires notamment en ce qui concerne l'application d'une méthode quantitative de comptage des micro-organismes et le contrôle de la sensibilité des streptocoques fécaux vis-à-vis des extraits de plantes. Par ailleurs, la séparation de la fraction non alcaloïdique en classes de molécules similaires (anthraquinones, flavonoïdes, anthocyanes, etc..) peut être intéressante dans la mesure où elle permettrait de tester chaque groupe en vue d'attribuer l'effet photosensibilisateur à un groupe déterminé. Aussi, pour exploiter au mieux les avantages offerts par cette méthode, nous suggérons qu'elle soit appliquée à une eau de consommation prélevée à partir d'eau de surface utilisée sans traitement dans certains milieux ruraux.

Une contrainte limitant l'activité photosensibilisatrice des extraits de plantes est la saturation du milieu en oxygène. Nous chercherons alors d'autres plantes dont l'activité photosensibilisatrice ne dépend pas de cette condition de saturation.

5. Références Bibliographiques

Cavalcante A., Martinez G., Mascio P., Merck C. and Agnez L. (2002). Cytotoxicity and mutagenesis induced by singlet oxygen in wild type and DNA repair deficient *Escherichia coli* strains, *Elsevier DNA Repair*, 1, p.1051-1056.

Coopre T. and Yogi D. (2002). Evaluation of Methylene Bleu and Rose Bengal for dye sensitized solar Water Treatment, *Journal of Solar Energy Engineering*, Vol. 124/304, p.305-310.

Davenport W. (2006). Plant Poisoning, Alkaloids, Isoquinoline and quinoline, *emedecine specialties*, p.1-10.

Fufezan C., Gross C.M., Sjödin M., Rutherford W., Krieger L. and Kirilovsky D.(2007). Influence of the potential of the primary quinone electron acceptor on photoinhibition in photosystem II, *J. Biol. Chem.*, p.12492-12502.

Harborne J. (1973). *Phytochemical methods: A guide to modern technic of plant analysis*, Chapman et Hall, London, p.49-188.

Isela G., Sonia G., Arnaldo M. and Norman A. (1977). Quinones and hydroquinones as generators and quenchers of singlet molecular oxygen, *Can.J.Chem*, 75(4), p.428-432.

- Iteman I. (2004). Cyanobactéries et toxicité, Colloque int.: CSSD « les cyanobactéries pour la santé, la science et le Développement », p.19.
- Karyakin A.Q.V. (1961). Spectroscopic determination of peroxide compounds during photochemical oxidation, *Russ. Chem. Rev.*, vol.30, n°8, p.460-469.
- Kasuku A.W., Lula et Paulus J. (1997). Plantes pour combattre la malaria, ed. Paulines, Kinshasa, p.10.
- Kerharo J. and Adam J.G. (1974). Pharmacopée sénégalaise traditionnelle, Plantes Médicinales et toxiques, Vigot Frères, p.1011.
- Lance K. (2003). Managing the effects of alkaloid toxicity in range cattle, *CHS Nutrition*, p.1.
- Masscheleir-Kleiner L. et Heylen J.B. (1968). Analyse des laques rouges anciennes, *Studies in Conservation*, 13, p.87-89.
- Porter J.K. (s.d). Analyse des toxines d'endophyte: La fétuque et autre engazonne toxique au bétail, *Journal de la Science animale*, Vol.73, p.871-880.
- Rodier J., Legube B. et Merlet. N. (2009). L'analyse de l'eau, 9^{ième} éd., Dunod, p.735.
- Sabbahi S., Alouini Z. et Jemli M. (2000). Etude de la désinfection photodynamique des eaux usées par le rose de bengale sel dissodique RB-2Na, *Proc. int. conf. on waste water treatment and Reuse Adapted to Mediterranean Area*, p.137-140.
- Taba K.M. et Luwenga (1999). L'effet de la photosensibilisation des extraits de plantes dans la désinfection de l'eau, *Med.Fac., Landbouww., Univ. Gent*, p.177-181.

CHAPITRE VI

CHAPITRE VI: DESINFECTION DE L'EAU PAR PHOTOSENSIBILISATION AVEC LES HUILES ESSENTIELLES DE *Citrus bergamia*, *Citrus limonum* et *Citrus reticulata*

Ce chapitre a fait l'objet d'une communication sous la référence:

Sunda M., Rosillon F., Taba K.M. et Lami N. (2009). Désinfection de l'eau par photosensibilisation avec les huiles essentielles de *Citrus bergamia*, *Citrus reticulata* et *Citrus limonum*, 8^{ème} congrès International du Gruttee, Nancy, Actes p. 86-89.

1. Introduction

La désinfection de l'eau par photosensibilisation avec les extraits de feuilles de plantes a donc montré que les extraits de *Cassia alata*, *Cassia occidentalis*, *Carica papaya*, *Coleus kilimandschari* et *Phyllanthus niruri* ont un effet photosensibilisateur. Cette activité a été mise en évidence par l'inhibition des coliformes fécaux après trois heures d'ensoleillement. Celle-ci passe de trois heures à une heure lorsque le milieu est saturé en oxygène (barbotage).

Dans le présent travail, nous avons étudié la désinfection de l'eau par photosensibilisation avec les huiles essentielles extraites de plantes de la famille des Rutacées (*Citrus bergamia*, *Citrus limonum* et *Citrus reticulata*), riches en molécules photoactives qui n'exigent pas une saturation du milieu en oxygène (Molière P. et al., 1990 ; Chouchi D. et Barth D., 1999).

2. Matériel et méthodes

2.1. Echantillonnage

2.1.1. L'eau polluée

L'eau polluée provenait de la rivière Mandebbras, en Belgique. Après les tests bactériologiques (dénombrement et confirmation des coliformes fécaux), des dilutions avec de l'eau distillée ont été effectuées afin de ramener la concentration en coliformes fécaux à une valeur comprise entre 30 et $3 \cdot 10^2$ coliformes / ml (Rodier J. et al., 2009).

2.1.2. Les zestes de fruits

Les fruits de plantes de *Citrus bergamia*, *Citrus limonum* et *Citrus reticulata* dont les zestes ont été utilisés pour l'extraction des huiles essentielles provenaient de la commune de Nd'jili à Kinshasa / R.D. Congo. Ils ont été identifiés à l'Herbarium de l'Institut National pour l'Etude Agronomique au Congo / Université de Kinshasa. Afin de mettre en évidence les différentes classes de produits naturels, un criblage phytochimique a été effectué selon les méthodes classiques (Harborne J.B., 1973).

2.2. Extraction des huiles essentielles

1 kg de zestes de chacune des espèces testées a été soumis à la distillation par entraînement à la vapeur pendant 2 heures pour l'extraction des huiles essentielles.

2.3. Préparation des échantillons d'eau polluée avec des huiles essentielles

A 200 ml d'eau polluée, on ajoute 0,2 ml d'huile essentielle, puis on agite vigoureusement (x2). On place 10 ml du mélange dans 18 tubes en verre (pyrex). Après avoir fermé les tubes à l'aide d'un bouchon, on place un lot de 9 tubes à l'obscurité et un deuxième lot est exposé au soleil (15-21°C, journée ensoleillée et ciel complètement dégagé pendant 4 heures: 12-16 heures, Saison: Printemps, Arlon, Belgique). L'eau polluée sans extraits a servi de témoin négatif et le bleu de méthylène, dont l'activité photosensibilisante est connue, a servi de témoin positif. Après chaque heure, on retire un tube de chaque lot pour les analyses bactériologiques (Taba K.M. et Luwenga E., 1999 ; Sunda M. et al., 2008). L'ensemencement est réalisé par incorporation de 1 ml de l'eau traitée dans les boîtes de pétri (incorporation en gélose dans le milieu Rapid'Ecoli 2 Agar). Après 24 heures d'incubation à 44,5°C, on procède au comptage des colonies de coliformes fécaux les unes après les autres. Ces expériences ont été effectuées à trois reprises. Les différents points repris dans chaque figure représentent la moyenne de trois mesures. Pour chaque série de données, l'erreur standard a été calculée (Moyenne ± SD).

3. Résultats et discussion

3.1. Extraction des huiles essentielles

Les résultats de l'extraction des huiles essentielles sont repris dans le tableau 6.1. 1 kg de zestes produit 9,5 grammes d'huile de *Citrus reticulata*, 5 grammes de *Citrus limonum* et 7 grammes de *Citrus bergamia* respectivement.

	<i>Citrus bergamia</i>	<i>Citrus limonum</i>	<i>Citrus reticulata</i>
Rendement	0,7 %	0,5 %	0,95 %

Tableau 6.1.: Résultats de l'extraction des huiles essentielles de *Citrus bergamia*, *Citrus limonum* et *Citrus reticulata*.

Les résultats obtenus dans ce travail pour l'extraction des huiles essentielles de *Citrus bergamia*, *Citrus limonum* et *Citrus reticulata* sont en accord avec ceux trouvés par Muhammad et al. (2006), lors de l'extraction des huiles essentielles de la famille des Rutacées qui obtient en moyenne un rendement de l'ordre de 1 % pour l'huile essentielle de cette famille.

3.2. Tests de Photosensibilisation

Les résultats des tests de traitement de l'eau polluée par photosensibilisation avec les huiles essentielles sont présentés dans les figures 6.1., 6.2. et 6.3. Un abattement non significatif en coliformes fécaux a été noté après quatre heures d'ensoleillement pour l'eau polluée non traitée et exposée au soleil (témoin négatif). Une inhibition complète a été remarquée après une heure d'ensoleillement pour l'eau traitée avec l'huile essentielle de *Citrus bergamia* et exposée au soleil. Pour l'eau traitée avec les huiles essentielles de *Citrus*

limonum et *Citrus reticulata* et exposée au soleil, il a été remarqué une inhibition complète des coliformes fécaux après deux heures d'ensoleillement.

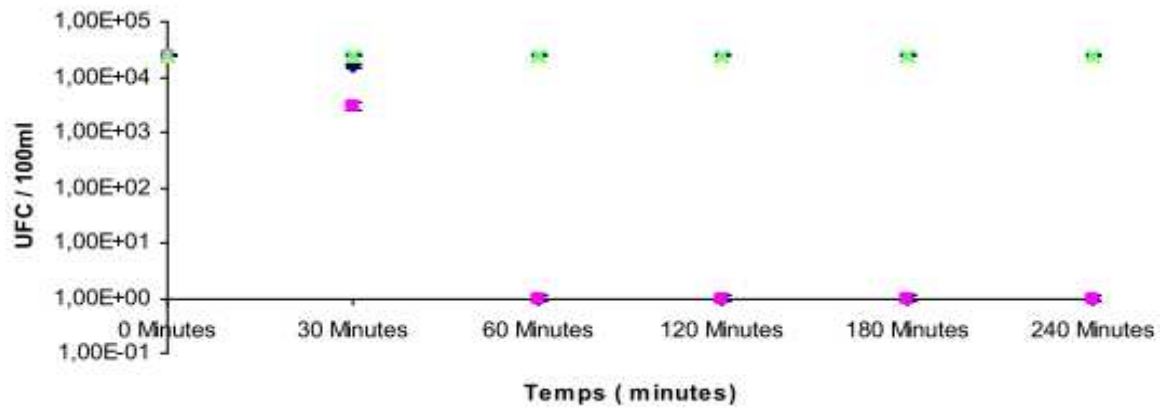


Figure 6.1.: Abattement des coliformes fécaux en fonction du temps suite au traitement avec 1 ml d'huile de *Citrus bergamia* / litre.

- ◆ : Eau polluée traitée avec l'huile de *Citrus bergamia* (1ml / litre) et exposée au soleil
- : Eau polluée traitée avec le bleu de méthylène et exposée au soleil
- ▲ : Eau non traitée et exposée au soleil
- ✕ : Eau traitée avec l'huile de *Citrus bergamia* (1ml / 1 litre) et gardée à l'obscurité

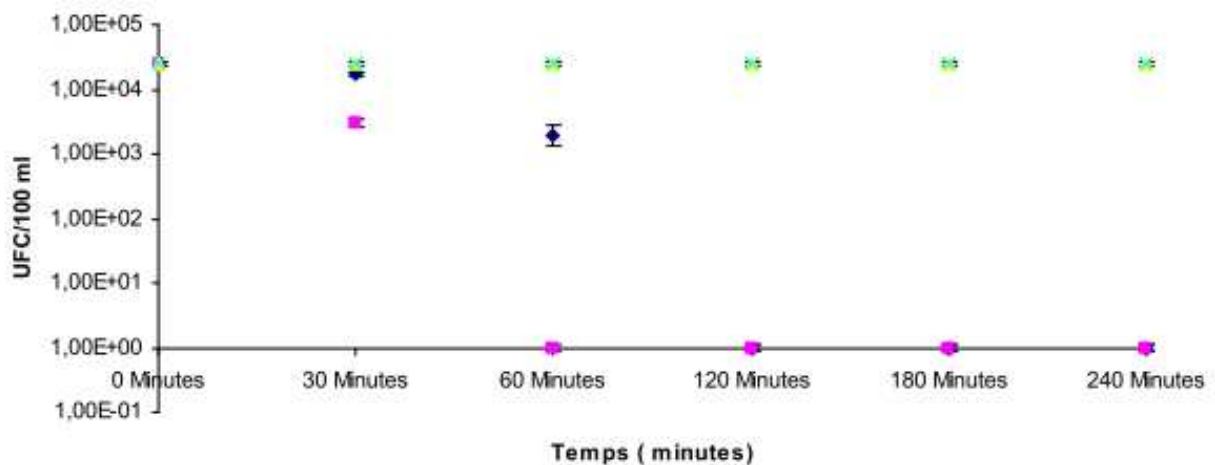


Figure 6.2.: Abattement des coliformes fécaux en fonction du temps suite au traitement avec 1 ml d'huile de *Citrus limonum* / litre.

- ◆ : Eau polluée traitée avec l'huile de *Citrus limonum* (1ml / 1 litre) et exposée au soleil
- : Eau polluée traitée avec le bleu de méthylène et exposée au soleil
- ▲ : Eau non traitée et exposée au soleil
- ✕ : Eau traitée avec l'huile de *Citrus limonum* (1ml / 1 litre) et gardée à l'obscurité

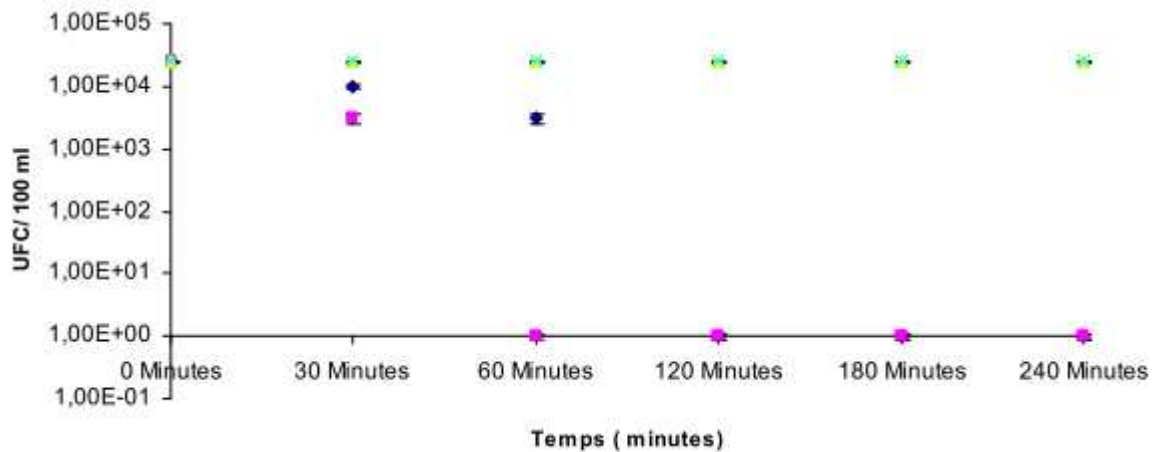


Figure 6.3.: Abattement des coliformes fécaux en fonction du temps suite au traitement avec 1 ml d'huile de *Citrus reticulata* / litre.

- ◆ : Eau polluée traitée avec l'huile de *Citrus reticulata* (1ml / litre) et exposée au soleil
- : Eau polluée traitée avec le bleu de méthylène et exposée au soleil
- ★ : Eau non traitée et exposée au soleil
- ✕ : Eau traitée avec l'huile de *Citrus reticulata* (1ml / litre) et gardée à l'obscurité

Par contre, pour les échantillons d'eau polluée traités avec les huiles essentielles et gardés à l'obscurité, aucune inhibition n'a été constatée. Ceci laisse supposer que les huiles essentielles présentent une très bonne activité dans la désinfection de l'eau par photosensibilisation (en présence des rayons solaires). Le fait que le taux d'inhibition soit complet après une heure d'enseillement pour l'huile de *Citrus bergamia* et deux heures pour les huiles essentielles de *Citrus reticulata* et *Citrus limonum* laisse suggérer que l'huile essentielle de *Citrus bergamia* est plus efficace dans la désinfection de l'eau que les deux autres. Cette différence pourrait être due à la différence de concentration du bergaptène (méthoxy-5 psoralène), une coumarine photoactive ayant un intérêt thérapeutique majeur. Cette molécule, sous la lumière U.V.A., subit une photoexcitation et s'intercale entre deux brins d'ADN ou d'ARN et réalise un pontage entre deux bases azotées (la thymine). Cette insertion va bloquer la réplication de l'ADN (Cain L. et al., 2006 ; Machet V. et Vaillant L., 2006) et provoquer par la suite la mort de la cellule bactérienne. En outre, en présence des rayons solaires, le métoxy-5 psoralène subit une photoréaction du type II, indépendante de la première, en générant l'oxygène singulet (1O_2) dans le milieu. Ce dernier ainsi généré endommage les coliformes fécaux présents dans le milieu (Pathak M.A. et Joshi P.C., 1983). En outre, le screening chimique a montré une plus grande quantité de coumarines dans les zestes de *Citrus bergamia* que dans ceux de *Citrus reticulata* et *limonum* (voir tableau 6.2.).

Nos résultats montrent qu'on peut sensiblement améliorer Sodis, une méthode de désinfection de l'eau de plus en plus utilisée dans les pays en développement. En effet, la méthode Sodis préconise, à une température d'environ 30°C, six heures d'enseillement pour l'élimination des micro-organismes présents dans le milieu (Meierhofer R. et Wegelin M., 2002). Nos résultats montrent qu'il est possible d'améliorer ce procédé de désinfection (Sodis) par l'emploi des huiles essentielles. Ceci aurait pour avantage de réduire le temps d'enseillement de 6 heures à 1 heure. Ces résultats montrent également que l'application des huiles essentielles dans la désinfection de l'eau pourrait être une alternative pour remplacer le chlore, afin de pallier au problème de toxicité que poseraient certains de ses dérivés. Ceci s'appliquerait mieux dans la plupart des pays en développement, où l'énergie solaire est

abondante. Car sous le coup de la chaleur solaire, il se forme une émulsion entre l'eau et l'huile ; celle-ci facilite alors le contact entre l'eau polluée et les huiles essentielles. C'est ce qui a d'ailleurs été remarqué dans ce travail. En plus, l'utilisation de ces huiles dans la désinfection de l'eau serait bénéfique, dans la mesure où elles sont de plus en plus utilisées en aromathérapie en usage interne pour enrayer l'inappétence et pour soigner plusieurs maladies, notamment l'hypertension, la dépression, les fatigues digestives, hépatiques et pancréatiques, etc.. (Zhiri A. et Baudoux D., 2009).

	<i>Citrus bergamia</i>	<i>Citrus reticulata</i>	<i>Citrus limonum</i>
Terpènes	+	+	+
Coumarines	++	+	+
Alcaloïdes totaux	-	-	-
Flavonoïdes	+	+	+
Quinones	-	-	-

Tableau 6.2.: Criblage phytochimique des huiles essentielles de *Citrus bergamia*, *Citrus limonum* et *Citrus reticulata*.

Légende:

(+): Test positif (-): Test négatif (++) : Substances en grande quantité

4. Conclusion

L'étude de la désinfection de l'eau par photosensibilisation avec les huiles essentielles de *Citrus bergamia*, *Citrus limonum* et *Citrus reticulata* montre une inhibition complète des coliformes fécaux présents dans l'eau après une heure d'ensoleillement pour l'huile de *Citrus bergamia*. Pour les huiles essentielles de *Citrus limonum* et *Citrus reticulata*, nous avons remarqué une inhibition complète des coliformes fécaux après 2 heures d'ensoleillement. En ce qui concerne l'eau polluée traitée avec les huiles essentielles et gardée à l'obscurité, aucune inhibition n'a été notée.

L'activité photosensibilisatrice trouvée dans ces huiles pourrait être due à la présence des molécules photoactivables présentes dans ces huiles, notamment le méthoxy-5 psoralène. Etant donné que l'huile essentielle de *Citrus bergamia* a montré une bonne activité, une étude approfondie de celle-ci s'avère indispensable, notamment en ce qui concerne sa composition chimique et son activité vis-à-vis des bactéries Gram positif (Gram+) et le comportement des microorganismes après la désinfection.

5. Références bibliographiques

- Cain L., Dammam H., Lue R. et Yoon C. (2006). Découvrir la Biologie, De boeck, p. 241.
- Chouchi D. and Barth D. (1999). Rapid identification of some coumarin derivatives in deterpenated *Citrus* peel oil by gas chromatography, *J. Chromat. A*, 672 (1-2), p.177-83.
- Harborne J.B. (1973). Phytochemical methods: a guide to modern technic of plant analysis, Chapman & Hall, London, p. 49-188.
- Machet V. et Vaillant L. (2006). Dermatologie en gynécologie obstétrique, 2^{ème} éd., Masson, p. 157.
- Meierhofer R. and Wegelin M. (2002). Solar Water Disinfection: A guide for the application of Sodis (cited 2007 June 18).
- Molière P., Huppe G., Averbeck D., Young A.R., Santus R. and Dubertret L. (1990). In vitro photostability and photosensitivity properties of bergamot oil: Effet of a cinnamate sunscreen, *J. of photochemistry and photobiology*, 7, p.199-208.
- Muhammad M., Salim U., Zafariqbal and Faqir M. (2006). Genetic Variability to essential oil composition in four *Citrus* fruit species, *Pak. J.*, 38 (2), p.319-324.
- Pathak M.A. et Joshi P.C. (1983). The nature and molecular basic of cutaneous photosensitivity to psoralen and coal., *J. Invest. Dermatol.*, 80, p.66-74.
- Rodier J., Legube B. et Merlet. N. (2009). L'analyse de l'eau, 9^{ème} éd., Dunod, p.735.
- Sunda M., Rosillon F. et Taba K.M. (2008). Contribution à l'étude de la désinfection de l'eau par photosensibilisation avec les extraits de plantes, *Eur. Jour. of Water Quality*, Tome 39, Fasc. 2, p. 199-209.
- Taba K.M. et Luwenga E. (1999). L'effet de la photosensibilisation des extraits de plantes dans la désinfection de l'eau, *Med.Fac.Landbouww, Univ.Gent*, 64/1.
- Zhiri A. et Baudoux D. (2009). Huiles essentielles chémotypées et leurs synergies, Edition Inspir Development, Luxembourg, p. 20-51.

CHAPITRE VII

CHAPITRE VII: DESINFECTION DE L'EAU PAR PHOTOSENSIBILISATION AVEC L'HUILE ESSENTIELLE DE *CITRUS BERGAMIA*

1. Introduction

Suite à notre précédente étude, nous retiendrons l'huile la plus performante en vue de poursuivre l'étude du processus de photosensibilisation.

L'activité désinfectante sera donc étudiée en examinant particulièrement les éléments suivants:

- La photoréactivité de l'huile essentielle de *Citrus bergamia* sous irradiation ultraviolette (U.V.A.) ;
- La sensibilité des coliformes et entérocoques fécaux vis-à-vis de cette huile ;
- Le comportement des coliformes et entérocoques fécaux après la désinfection de l'eau.

2. Matériel et méthodes

2.1. L'eau polluée

L'eau polluée provenait de la rivière Semois, en Belgique. Cette eau contenait 25.10^3 UFC coliformes fécaux / 100 ml et 20.10^3 UFC entérocoques fécaux / 100 ml.

2.2. Extraction de l'huile essentielle de *Citrus bergamia*

L'huile essentielle extraite lors de la précédente étude a été utilisée.

2.3. Analyse spectrométrique de l'huile essentielle de *Citrus bergamia*

L'analyse de l'huile essentielle de *Citrus bergamia* a été réalisée par la spectrométrie de masse (S.M.). La méthode APCI⁺ (Atmospheric Pressure Chemical Ionisation, Positive mode) a été utilisée (Dugo. *et al.*, 2000). Cette analyse a été réalisée au laboratoire de Chimie et Biologie Industrielle de Gembloux Agro-Bio Tech / Université de Liège. Les conditions expérimentales sont reprises dans le tableau 7.1.

Ion source type: APCI	Ion polarity: Positive	Alternating ion polarity: off
Mass range Mode: Ultra scan	Scan Begin: 100 m/z	Scan end: 500 m/z
Capillarity exit: 109.8 volt	Skim: 1 40.0 Volt	Trap drive: 33.1
Accumulation time: 1439 μ s	Averages: 10 spectra	Auto MS/MS: off

Tableau 7.1.: Les paramètres expérimentaux utilisés pour l'analyse spectrométrique de l'huile de *Citrus bergamia*.

2.4. Préparation des échantillons d'eau avec l'huile essentielle

Les boîtes en verre de pyrex de 100 ml ont été utilisées comme réacteurs. La concentration de 0.05 ml / 50 ml d'eau (1 ml d'huile essentielle / 1 litre d'eau) d'huile essentielle de *Citrus bergamia* a été utilisée pour les expériences. Un lot constitué d'échantillons d'eau traités et un autre lot constitué d'échantillons non traités (blancs) ont été exposés à la radiation ultraviolette (lampe UV, marque B-100 AP, émettant entre 320-400 nm, avec un maximum à 365 nm). Cette lampe a été utilisée pour éviter les fluctuations de l'intensité lumineuse des rayons solaires. Aussi, l'huile essentielle de *Citrus bergamia* contient des molécules photoactives qui absorbent dans cette zone (320-400 nm). En outre, cette zone est contenue dans le spectre solaire qui touche la surface de la terre. Les expériences ont été réalisées avec une intensité lumineuse de 8900 μ W.Cm⁻². Celle-ci a été mesurée avec un pyranomètre CMP3 (Kipp & Zoonen, Netherland). La lampe a été positionnée à 25 cm des échantillons d'eau. Un autre lot constitué d'échantillons d'eau traités avec l'huile essentielle de *Citrus bergamia* a été gardé à l'obscurité. A 0, 10, 20, 30, 60 et 120 minutes, des prélèvements sont effectués dans chaque lot pour la mise en culture. Ces expériences ont été réalisées à trois reprises. Les différents points repris dans chaque figure représentent la moyenne de trois mesures. Pour chaque série de données l'erreur standard a été calculée (Moyenne \pm SD).

2.5. Analyses bactériologiques

Les analyses bactériologiques ont été réalisées par mise en culture sur milieux gélosé Rapid'E Coli et Bile esculine, respectivement pour les coliformes fécaux et entérocoques fécaux. Après la mise en culture, on incube à 44,5°C pendant 24 heures. Après incubation, les colonies sont dénombrées les unes après les autres.

3. Résultats et discussion

3.1. Caractérisation de l'huile essentielle de *Citrus bergamia*

L'analyse spectrométrique de l'huile essentielle de *Citrus bergamia* a révélé plusieurs composés (voir figure 7.1.) parmi lesquels le limonène (136: M+1), l'alpha-pinène (137: M+1), l'anthranilate de méthyle (M+1: 166) et le méthoxy-5 psoralène (217: M+1). De tous ces composés, le méthoxy-5 psoralène est cité par plusieurs auteurs comme molécule à activité photosensibilisatrice (Naganuna M. et al., 1985 ; Yoko A. et al., 2008).

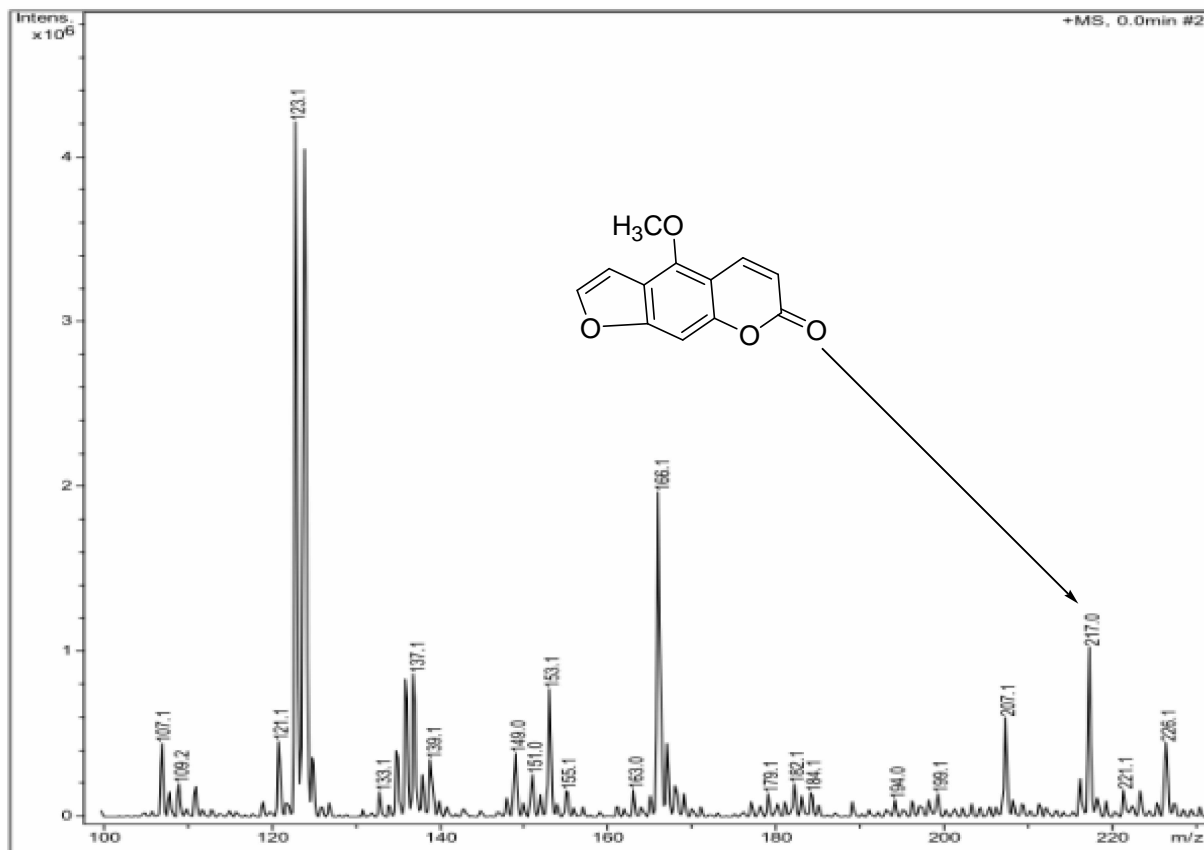


Figure 7.1.: Spectre de masse de l'huile essentielle de *Citrus bergamia* (LC/MS).

3.2. Désinfection de l'eau avec l'huile essentielle de *Citrus bergamia*: photosensibilisation et post photosensibilisation

3.2.1. Photosensibilisation

Les échantillons d'eau traités avec l'huile essentielle de *Citrus bergamia* ont été irradiés pendant deux heures, puis gardés à l'obscurité pendant 24 heures. Les résultats de cette étude sont repris dans la figure 7.2.

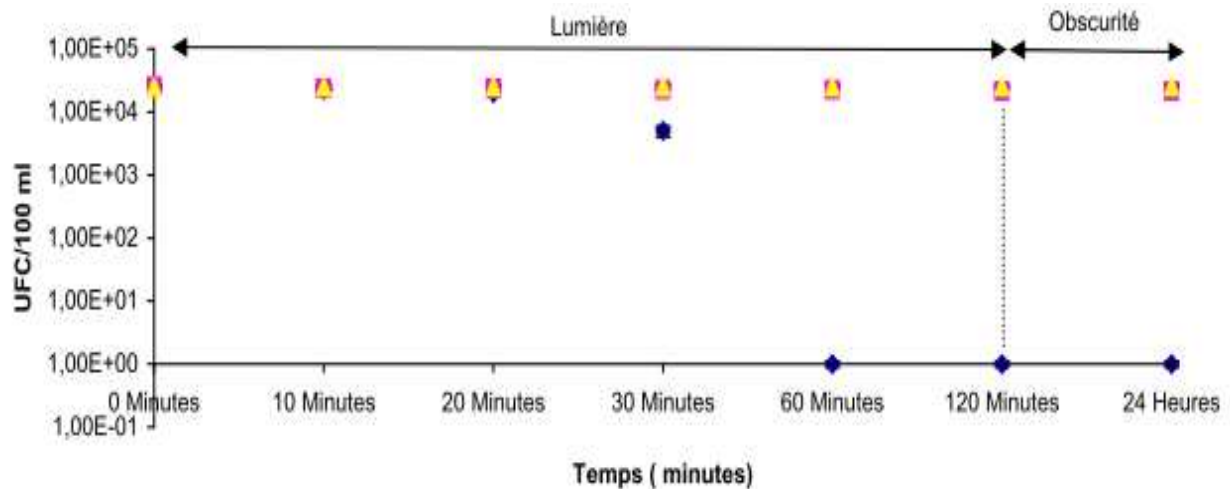


Figure 7.2.: Abattement des coliformes fécaux en fonction du temps dans l'eau traitée avec 1 ml d'huile de *Citrus bergamia* / litre d'eau.

- (—■) Eau non traitée et irradiée pendant deux heures, puis gardée à l'obscurité pendant 24 heures.
- (—◆) Eau traitée avec l'huile de *Citrus bergamia* et irradiée pendant deux heures, puis gardée à l'obscurité pendant 24 heures.
- (—▲) Eau traitée avec l'huile de *Citrus bergamia* et gardée en permanence à l'obscurité

L'eau traitée avec l'huile essentielle de *Citrus bergamia* et irradiée a montré des abattements fort intéressants. En effet, après 60 minutes d'irradiation, il a été constaté un abattement de l'ordre de plus de 4 unités logarithmiques. Aucune inhibition significative n'a été notée après 60 minutes dans l'eau non traitée avec l'huile essentielle de *Citrus bergamia* et irradiée (témoin) (voir figure 7.2.). Il a été aussi constaté une inhibition complète des coliformes fécaux après une heure d'irradiation pour les échantillons d'eau traités avec l'huile essentielle de *Citrus bergamia* et irradiés. En ce qui concerne les échantillons d'eau non traités et irradiés, un abattement non significatif a été noté après une heure. Aucune inhibition n'a été notée dans l'eau traitée avec l'huile essentielle de *Citrus bergamia* et gardée à l'obscurité du début à la fin des expériences. Ces observations laissent supposer que l'action conjuguée de l'huile essentielle et de la radiation ultraviolette induit une photoréaction qui conduit à l'inhibition des coliformes fécaux présents dans l'eau. Cette photoréactivité induite par l'huile essentielle de *Citrus bergamia* est essentiellement due à la présence de méthoxy-5 psoralène (voir figure 7.1., pic (M+1: 217)). Cette molécule est de plus en plus utilisée pour soigner certaines maladies de la peau, notamment le psoriasis et le vitiligo. Celle-ci est aussi utilisée, à cause de sa photoréactivité, en photothérapie PUVA (Psoralène-UVA thérapie). Ce traitement consiste à administrer par voie orale un médicament à base de méthoxy-5 psoralène et à exposer par la suite le patient sous la lumière solaire ou ultraviolette.

Le méthoxy-5 psoralène est capable de réagir avec l'ADN de la cellule bactérienne avec lequel il forme un complexe à l'obscurité. Ce complexe n'a pas d'effet biologique significatif sur l'ADN. Mais en présence des UVA, il se développe une réaction de photoaddition conduisant à la formation des liaisons covalentes entre le méthoxy-5 psoralène et les bases azotées, notamment la pyrimidine. Ceci aboutit à l'inhibition de la duplication de l'ADN et la transcription de l'ARN (Cain L. et *al.*, 2006 ; Machet V. et Vaillant L., 2006). Ces perturbations entraînent par la suite la mort de la cellule bactérienne. Cette réaction, appelée photoréaction du type I, est favorisée dans les milieux anoxiques. Par contre, en

présence de l'oxygène, le méthoxy-5 psoralène conduit à une photoréaction du type II. Cette réaction consiste au transfert de l'énergie emmagasinée par le méthoxy-5 psoralène à l'oxygène. Ce dernier subit une excitation et passe de l'état fondamental, triplet, à l'état excité, singulet. L'oxygène singulet généré dans le milieu inhibe les cellules bactériennes (Pathak M.A. et Joshi P.C., 1983).

Lors de l'étude de la désinfection de l'eau par photosensibilisation avec les extraits de plantes, Sunda et al. (2008) avaient remarqué que les extraits de *Cassia alata*, *Cassia occidentalis*, *Carica papaya*, *Coleus kilimandschari* et *Phyllanthus niruri* arrivaient à inhiber complètement les microorganismes présents dans le milieu après trois heures d'irradiation. Cette inhibition passait de trois heures à moins d'une heure, lorsque le milieu était saturé en oxygène (barbotage). Cette étude montre une plus grande efficacité de l'huile essentielle de *Citrus bergamia*, avec laquelle on peut avoir une inhibition complète des coliformes fécaux présents dans le milieu après une heure d'irradiation sans saturation du milieu en l'oxygène.

Ces résultats sont en accord avec ceux trouvés dans plusieurs études menées sur la désinfection de l'eau par l'utilisation des sensibilisateurs de lumière. Ces études mettent en évidence la génération de l'oxygène singulet, par les sensibilisateurs de lumière, pour la désinfection de l'eau (Sabbahi S. et al., 2000 ; Cooper T. et Yogi D., 2002 ; Jiménez E. et al., 2006 ; Bonnett R. et al., 2006).

3.2.2. Post photosensibilisation

Pour vérifier si dès l'arrêt du processus il n'y a pas de réactivation possible des coliformes fécaux, les échantillons d'eau traités avec l'huile de *Citrus bergamia* et irradiés pendant deux heures, puis gardés à l'obscurité pendant 24 heures ont été analysés. Les résultats de ces analyses sont repris dans la figure 7.2.

Aucune réapparition des coliformes fécaux n'a été remarquée après la phase de photosensibilisation. Ceci laisse supposer que l'action conjuguée de lumière et de l'huile essentielle de *Citrus bergamia* conduit à une activité bactéricide (inhibition définitive).

3.3. Désinfection de l'eau dans les échantillons non traités avec l'huile essentielle de *Citrus bergamia* et irradiés: Photolyse et post photolyse

3.3.1. Photolyse

Les résultats de tests des échantillons d'eau non traités avec l'huile essentielle de *Citrus bergamia* et irradiés sont repris dans la figure 7.2.

Un abattement de l'ordre de 0,2 unité logarithmique a été noté pour les échantillons d'eau non traités et irradiés après deux heures. Cette inhibition constatée pourrait se justifier par l'action directe des UVA sur les coliformes fécaux présents dans l'eau.

Il est signalé qu'en présence des UVA, certains composants cellulaires ou chromophores endogènes (NAD, FAD, Hème, Porphyrine, quinones,...) peuvent absorber le photon lumineux et subir une excitation. En présence de l'oxygène, il y aurait production d'espèces réactives de l'oxygène (Ryter W. et al., 2006). Ces derniers sont capables d'induire un stress dans la cellule, en attaquant les constituants cellulaires. Ceci peut conduire à la mort de la cellule bactérienne.

3.3.2. Post photolyse

Les résultats de tests de désinfection de l'eau non traitée, irradiée pendant 2 heures et gardée par la suite à l'obscurité pendant 24 heures sont repris dans la figure 7.2.

Une légère augmentation des coliformes fécaux de l'ordre de 0,02 unité logarithmique a été notée à l'obscurité pour les échantillons d'eau non traités. Cette augmentation pourrait se justifier par:

- (a) La réparation de l'ADN de la cellule bactérienne dans la phase d'obscurité. En effet, après avoir subi des dommages par l'action directe des UVA, si ces dommages ne sont pas graves, l'ADN peut effectuer une réparation, retrouvant ainsi son état initial ;
- (b) Les coliformes restants dans le milieu peuvent continuer à se multiplier en se servant des nutriments les coliformes inhibés (détruits) lors de la phase d'irradiation (Angela G. et Pulgarin C., 2004).

3.4. Sensibilité des Entérocoques fécaux vis-à-vis de l'huile essentielle de *Citrus bergamia*

Jusqu'à présent, nous avons étudié le comportement des bactéries Gram- vis-à-vis de l'huile de *Citrus bergamia*. Mais comment réagissent les bactéries Gram+ ? Quelques tests de désinfection de l'eau par photosensibilisation ont été réalisés en utilisant les entérocoques fécaux comme indicateurs de contamination. Les résultats de ces tests sont repris dans la figure 7.3.

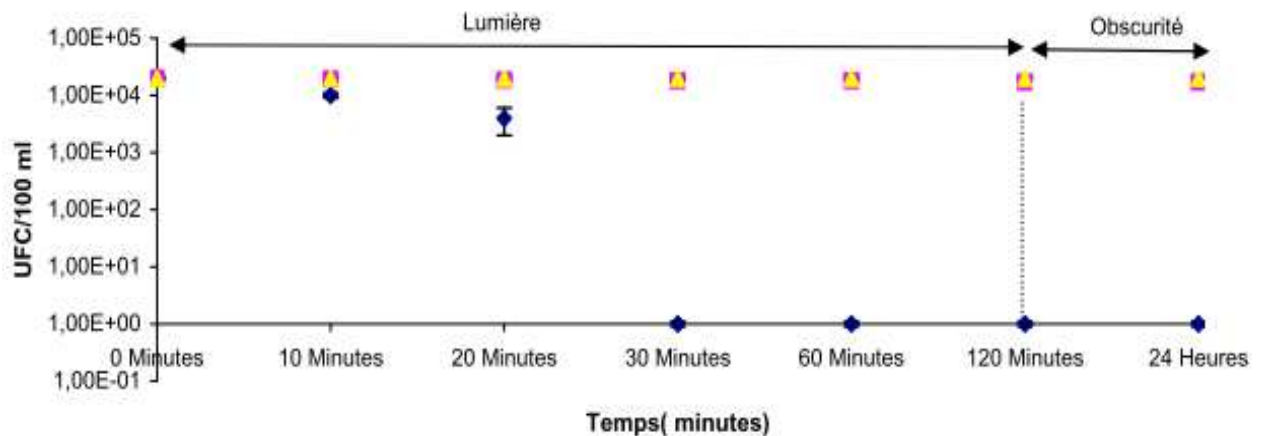


Figure 7.3.: Abattement des entérocoques fécaux en fonction du temps dans l'eau traitée avec 1 ml d'huile de *Citrus bergamia* / litre d'eau.

- (—■) Eau non traitée et irradiée pendant deux heures, puis gardée à l'obscurité pendant 24 heures
- (—◆) Eau traitée avec l'huile de *Citrus bergamia* et irradiée pendant deux heures, puis gardée à l'obscurité pendant 24 heures
- (—▲) Eau traitée avec l'huile de *Citrus bergamia* et gardée à l'obscurité, puis gardée à l'obscurité pendant 24 heures.

Une faible inhibition d'entérocoques fécaux a été notée du début à la fin des expériences dans l'eau non traitée et irradiée. L'eau traitée avec l'huile essentielle de *Citrus bergamia* et gardée à l'obscurité n'a montré aucune inhibition. Pour ce qui est de l'eau traitée

avec l'huile essentielle de *Citrus bergamia* et irradiée, nous avons noté une inhibition complète d'entérocoques fécaux présents dans le milieu après 30 minutes d'irradiation. Ces résultats laissent supposer que sous irradiation ultraviolette, l'huile essentielle de *Citrus bergamia* induit une photoréaction qui conduit à l'inhibition des entérocoques fécaux présents dans l'eau (voir figure 7.3.).

Ces résultats montrent que les entérocoques fécaux sont plus sensibles à la désinfection par photosensibilisation que les coliformes fécaux (Gram-). Cette différence de sensibilité pourrait être due à la différence de la constitution de leurs membranes cellulaires. En effet, la membrane cellulaire des bactéries Gram- présente une couche de lipopolysaccharides qui joue le rôle de barrière contre l'oxygène singulet. En plus, cette couche est constituée d'acides gras insaturés et de protéines qui constituent à leur tour un piège pour l'oxygène singulet. La membrane des bactéries Gram+, dépourvue de cette couche, est facilement détruite par l'oxygène singulet. Après la destruction de la membrane, l'oxygène singulet pénètre dans la cellule et attaque les constituants cellulaires. Cela conduit à la mort cellulaire. C'est donc la présence de la couche de lipopolysaccharides qui rend les bactéries Gram- plus résistantes à l'attaque des oxydants que les bactéries Gram+. Bien que résistante, la membrane cellulaire des bactéries Gram- finit toujours par être détruite par l'oxygène singulet. Il s'ensuit une mort certaine de la cellule bactérienne.

Les résultats trouvés dans ce travail sont en accord avec ceux mentionnés par plusieurs auteurs. En effet, lors de l'étude de l'activité photodynamique du colorant curcumin vis-à-vis des bactéries Gram- et Gram+, Dahl T. et *al.* (1989a) ont remarqué que les bactéries (Gram+) étaient moins résistantes par rapport aux bactéries Gram-. Etudiant le pouvoir oxydant de l'oxygène singulet vis-à-vis des bactéries Gram- et Gram+, Dahl T. et *al.* (1989b) ont constaté que les bactéries Gram- sont plus résistantes que les bactéries Gram+. Rincon A. et Pulgarin C. (2004), lors de l'étude de la désinfection photocatalytique de l'eau, ont observé que les entérocoques fécaux sont moins résistants que les coliformes fécaux. Ces derniers sont moins résistants qu'*Escherichia coli*. Dans l'ordre de sensibilité des bactéries à la désinfection de l'eau par photosensibilisation, on trouve donc :

Entérocoques fécaux >> coliformes fécaux > E. Coli.

4. Conclusion

L'étude de désinfection de l'eau par photosensibilisation avec l'huile essentielle de *Citrus bergamia* a montré une inhibition complète des coliformes fécaux présents dans l'eau après une heure d'irradiation ultraviolette. Par contre, pour les échantillons d'eau traités avec la même huile essentielle et gardés à l'obscurité pendant deux heures, aucune inhibition n'a été constatée. Ces résultats laissent supposer que l'huile essentielle de *Citrus bergamia* est photosensibilisatrice. L'activité photosensibilisatrice remarquée dans l'huile essentielle de *Citrus bergamia* est liée à la présence de méthoxy-5 psoralène, une molécule citée par plusieurs auteurs comme un puissant photosensibilisateur.

Afin d'évaluer la sensibilité des entérocoques fécaux vis-à-vis de l'huile essentielle de *Citrus bergamia*, quelques tests de désinfection de l'eau par photosensibilisation ont été réalisés. Les résultats de ces tests montrent une inhibition complète d'entérocoques fécaux présents dans l'eau après 30 minutes d'irradiation. Les entérocoques fécaux sont plus sensibles à la désinfection de l'eau par photosensibilisation que les coliformes fécaux. Cette différence pourrait être due à la constitution de leurs membranes cellulaires.

Dans les échantillons d'eau traités avec l'huile essentielle de *Citrus bergamia*, irradiés pendant deux heures, puis gardé à l'obscurité pendant 24 heures, aucune réactivation des microorganismes (coliformes fécaux et entérocoques fécaux) n'a été notée.

D'autres études s'avèrent nécessaires, notamment en ce qui concerne l'application de la désinfection de l'eau avec l'huile essentielle de *Citrus bergamia* sous la lumière solaire (ensoleillement et post ensoleillement), étant donné que la présente étude a été réalisée sous irradiation ultraviolette. Mais notre priorité pour la poursuite de cette recherche portera sur la molécule responsable de l'activité photosensibilisatrice remarquée dans cette huile. Il s'agira par la suite d'étudier le processus de photosensibilisation en utilisant le méthoxy-5 psoralène à l'état pur (en solution).

5. Références bibliographiques

Bonnett R., Krysteve M., Lalov I. and Artarsky S. (2006). Water disinfection using photosensitizers immobilized on chitosan, *Water Research*, Volume 40, p. 1269-1275.

Cain L., Damman H., Lue R. et Yoon C. (2006). Découvrir la Biologie, De bœck, 241p.

Cooper A. and Yogi D. (2002). Evaluation of methylene bleu and rose bengal for dye sensitized solar water treatment, *Journal of Solar Energy Engineering*, Vol. 124/304, p.305-310.

Dahl T.A., Gowan M.C., Shand M. and Srinivasan V. (1989a). Photokilling of bacteria by the nature dye curcumin, *Arch. Microbiology*, 151, p.183-185.

Dahl T.A., Midden W. and Hartman P.(1989b). Comparison of killing of Gram – and Gram + bacteria by pure Singlet Oxygen, *American Society for microbiology*, p. 2188-2194.

Dugo P., Mondello L., Dugo L., Stancanelli R. and Dugu G. (2000). LC-MS for the identification of oxygen heterocyclic compounds in *Citrus* essential oils, *Journal of pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 24, p.147-154.

Jiménez E., Manjon F. Fresnadillo D. and Orellana G. (2005). Solar water disinfection by singlet oxygen photogenerated with polymer-supported Ru (II) sensitizers, *Solar Energy*, Volume 80, Issue 10, p. 1382 – 1387.

Machet L. et vaillant V. (2006). Dermatologie en gynécologie obstétrique, 2^{ième} éd., Masson, 157p.

Meierhofer R. and Wegelin M. (2002). Solar Water Disinfection: A guide for the application of Sodis (cited 2007 June 18).

Naganuma M., Hirose S., Nakayama Y., Nakajima K. and Someya T. (1985). A study of the phototoxicity of lemon oil, *Dermatological Research*, 278, p 31-36.

Pathak M.A. and Joshi P.C. (1983). The nature and molecular basic of cutaneous photosensitivity to psoralen and coal, *J. Invest Dermatol.*, 80, p.66-74.

Rincon G. et Pulgarin C. (2004). Bactericidal action of illuminated TiO₂ on pure E.Coli and natural consortia: post-irradiation events in the dark and assessment of effective disinfection time, *applied catalysis B: Environmental*, 49, p.99-112.

Ryter S., Alam J. and Choi A. (2006). Heme Oxygenase-1 / Carbon Monoxide: From Basic Science to Therapeutic Applications, *Physiol. Rev.*, 86, p.583–650.

Sabbahi S, Alouini Z. et Jemli M. (2000). Etude de la désinfection photodynamique des eaux usées par le Rose de Bengal sel dissodique RB-2Na, Proc. Int. conf. on waste water treatment and reuse adapted to Mediterranean Area, p.137- 140.

Sunda M., Rosillon F. et Taba K.M. (2008). Contribution à l'étude de la désinfection de l'eau par photosensibilisation avec les extraits de plantes, *European Journal of Water Quality*, Tome 39, Volume 2, p.199-209.

Yoko A., Kazue S., Katsushige S., Yukari K. and Seiji S. (2008). Singlet oxygen scavenging activity and cytotoxicity of essential oils from *Rutaceae*, *J. Clin. Biochem Nutr.*, 43, p.6-12.

CHAPITRE VIII

CHAPITRE VIII: DESINFECTION DE L'EAU PAR PHOTSENSIBILISATION AVEC LE METHOXY-5 PSORALENE EN SOLUTION

1. Introduction

Nous avons démontré précédemment que la désinfection de l'eau par photosensibilisation avec l'huile essentielle de *Citrus bergamia* a présenté une activité photosensibilisatrice intéressante. Rappelons que celle-ci est essentiellement due à la présence, dans l'huile, de méthoxy-5 psoralène, une furocoumarine photoactivable.

Il nous paraissait opportun de mieux comprendre l'activité de cette molécule, non plus en utilisant l'huile brute, mais à partir du composé pur obtenu auprès d'un fournisseur de produits chimiques. Cette molécule sera utilisée dans un premier temps en solution.

2. Matériel et méthodes

2.1. Prélèvement de l'eau à analyser

L'eau utilisée dans ce travail a été prélevée dans la rivière Semois, en Belgique. Celle-ci contenait approximativement 10^4 UFC de coliformes fécaux / 100 ml et 10^3 UFC d'entérocoques fécaux / 100 ml.

2.2. Le Méthoxy-5 psoralène

Le méthoxy-5 psoralène utilisé dans ce travail provenait de Sigma Aldrich, Belgique (Référence: 65320).

2.3. Tests de désinfection de l'eau par photosensibilisation avec le MOP-5

Les boîtes en verre de pyrex de 100 ml ont été utilisées comme réacteurs. Dans chaque réacteur, nous avons ajouté (0,006 ; 0,2 et 0,340 g/l) de méthoxy-5psoralène. Un échantillon d'eau non traitée a été utilisé comme témoin. Les échantillons ont été par la suite irradiés avec une lampe ultraviolette de marque UVP (B-100 AP) à 365 nm (Le méthoxy-5 psoralène absorbe dans l'UVA à 320-400nm (Bordin F., 1999). La lampe a été positionnée à 25 cm d'échantillons d'eau. L'intensité lumineuse a été mesurée avec un pyranomètre de marque CMP3 (Keep and Zoonen, the netherland). Un autre échantillon traité avec le MOP-5 a été gardé à l'obscurité. Après des temps d'irradiation de 0, 10, 15, 30, 60 et 120 minutes, des prélèvements ont été réalisés dans chaque réacteur pour les analyses bactériologiques. Ces expériences ont été réalisées à 15 reprises. Les différents points repris dans chaque figure représentent la moyenne de 15 mesures. Pour chaque série de données l'erreur standard a été calculée (Moyenne \pm SD).

2.4. Les analyses Bactériologiques

Les milieux Rapid'Ecoli et Bile esculine ont été utilisés pour la culture des coliformes et entérocoques fécaux respectivement. Après des temps d'irradiation de 0, 5, 10, 15, 60 et 120, 1 ml d'eau provenant d'échantillons des tests de photosensibilisation a étéensemencé. Après 24 heures d'incubation à 44,5°C, un comptage des colonies a été réalisé.

2.5. Etude cinétique

L'étude cinétique a été réalisée suivant la loi de Chick H. (1908). Selon cette loi, l'inhibition microbienne suit une cinétique de premier ordre. Cette loi est donnée par l'équation suivante:

$\ln(N/N_0) = -kct$ (1), où,

N: Nombre de microorganismes au temps t

N_0 : Nombre de microorganismes au temps zéro (t_0)

K: constante cinétique caractérisant l'inhibition microbienne (min^{-1})

C: concentration du photosensibilisateur (g/l)

T: temps d'irradiation (minute)

L'ordre de réaction est donné par l'équation:

$K = C^n t$ (2), où

C: concentration du désinfectant

n: Ordre de la réaction (premier ordre: $0,8 \leq n \leq 1,2$)

3. Résultats et discussion

3.1. Sensibilité des coliformes fécaux vis-à-vis du MOP-5

3.1.1. Résultats des tests de désinfection

Les résultats de tests de désinfection de l'eau par photosensibilisation avec le MOP-5 sont repris dans les graphiques 8.1. à 8.4.

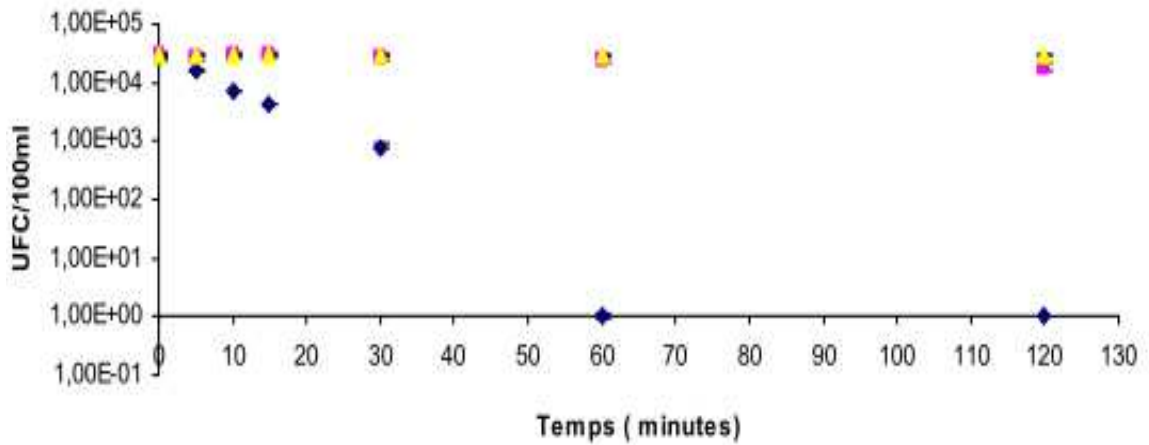


Figure 8.1.: Abattement des coliformes fécaux en fonction du temps en utilisant 0,006 g de MOP-5 / litre d'eau.

- (♦) Eau traitée avec 0,006 g de MOP-5 / litre et irradiée
- (▲) Eau traitée avec 0,006 g de MOP-5 / litre et gardée à l'obscurité
- (■) Eau non traitée et irradiée

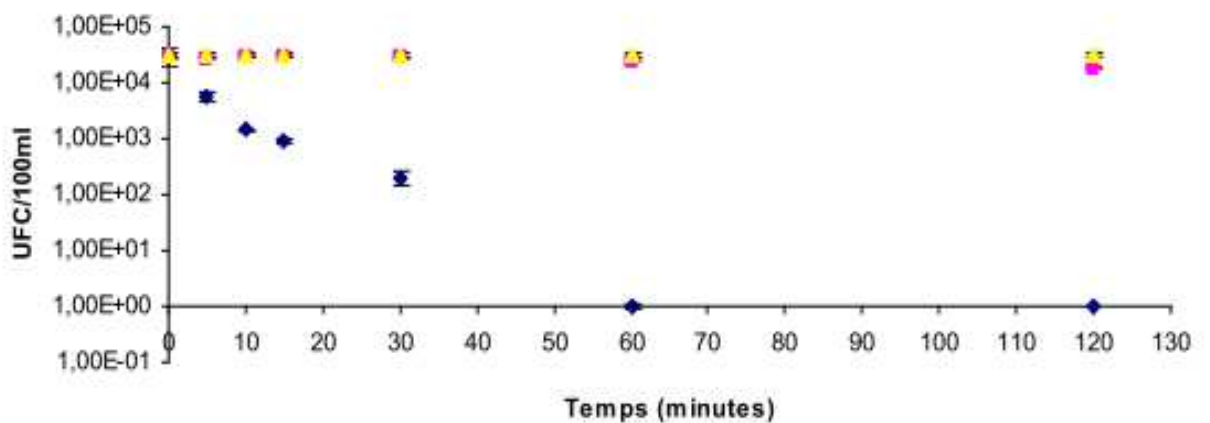


Figure 8.2.: Abattement des coliformes fécaux en fonction du temps en utilisant 0,2 g de MOP-5 / litre d'eau.

- (♦) Eau traitée avec 0,2 g de MOP-5 / litre et irradiée,
- (▲) Eau traitée avec 0,2 g de MOP-5 / litre et gardée à l'obscurité
- (■) Eau non traitée et irradiée

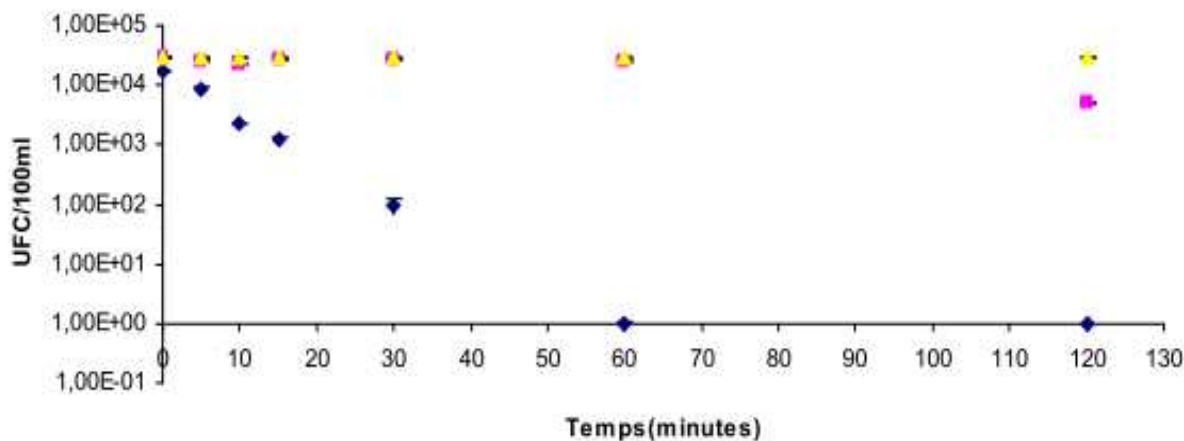


Figure 8.3.: Abatement des coliformes fécaux en fonction du temps en utilisant 0,340 g de MOP-5/litre.

- (♦) Eau traitée avec 0,340 g de MOP-5 / litre et irradiée
- (▲) Eau traitée avec 0,340 g de MOP-5 / litre et gardée à l'obscurité
- (■) Eau non traitée et irradiée

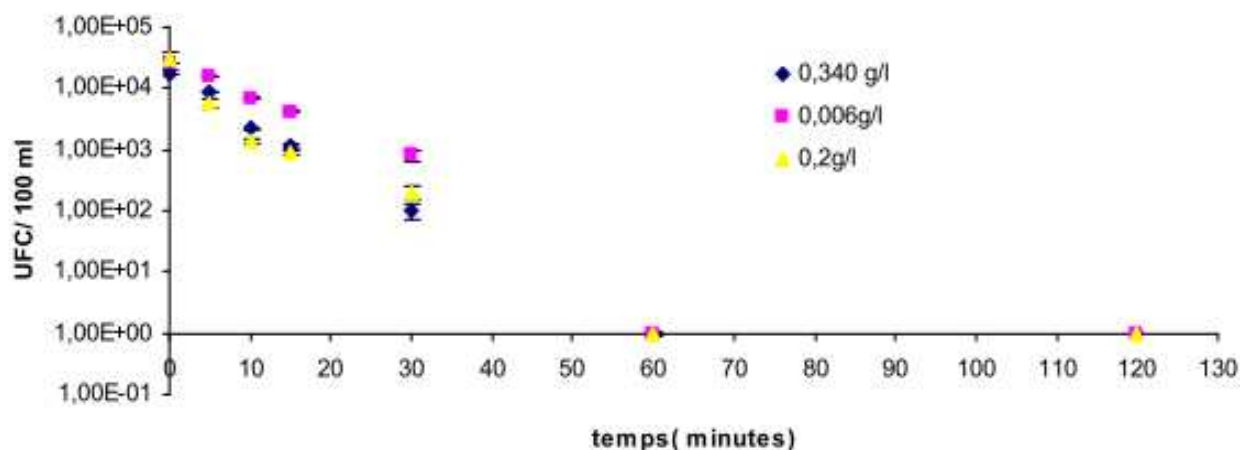


Figure 8.4.: Abatement des coliformes fécaux en fonction du temps: Comparaison des différentes concentrations.

- (♦) Eau traitée avec 0,340 g de MOP-5 / litre et irradiée
- (▲) Eau traitée avec 0,2 g de MOP-5 / litre et irradiée
- (■) Eau traitée avec 0,006 g de MOP-5 / litre et irradiée

Ces résultats montrent une inhibition complète des coliformes fécaux après 60 minutes d'irradiation dans l'eau traitée avec le MOP-5 pour toutes les concentrations utilisées. Aucune inhibition des coliformes fécaux n'a été notée pour tous les échantillons traités avec le MOP-5 et gardés à l'obscurité. En ce qui concerne les échantillons d'eau non traités et irradiés (témoins), nous avons noté une inhibition non significative. Le fait qu'aucune inhibition ne soit notée pour les échantillons d'eau traités et gardés à l'obscurité et qu'une inhibition négligeable soit notée pour les échantillons d'eau non traités et irradiés, laisse suggérer que le méthoxy-5 psoralène est photosensibilisateur. En présence de lumière, celui-ci initie une

réaction de photosensibilisation qui serait responsable de l'inhibition des microorganismes présents dans le milieu.

La photoréactivité de cette molécule est due à la sensibilité des liaisons 4-3 et 4'-5' (voir figure 8.5.). Anders A. et *al.* (1983), étudiant les interactions psoralène et ADN, ont montré que la densité électronique dans le méthoxy-5 psoralène serait plus élevée dans la liaison 3-4 que 4'-5'. Ainsi, la double liaison 4-3 serait le site réactionnel privilégié du méthoxy-5 psoralène. Lorsque cette molécule est soumise à l'irradiation U.V.A., elle absorbe l'énergie et passe de l'état fondamental à l'état excité (transition π - π^*). A cet état, il se passerait une réaction de cycloaddition [2+2] entre le méthoxy-5 psoralène et les bases azotées (Thymine ou Pyrimidine) au niveau de la double liaison 3-4. Par la suite, la double liaison 4'-5' réagirait. Cette série de réactions, appelées photoréaction de type I, ont pour conséquence l'inhibition de la réplication de l'ADN (Decout J.L. et *al.*, 1983). Il s'ensuit une mort certaine de la cellule bactérienne. Cette réaction de type I serait favorisée dans les milieux anoxiques (Pathak M.A. et Joshi P.C., 1983). Dans ce cas, l'action du méthoxy-5 psoralène, sous irradiation ultraviolette, est reliée à sa capacité de former des ponts covalents entre les deux chaînes de l'ADN après intercalation de la molécule (Courseille C. et *al.*, 1982). Les composés d'addition ainsi obtenus résultent d'une double cycloaddition avec les bases azotées (pyrimidine ou thymine) (Courseille C. et *al.*, 1982).

En présence de l'oxygène, il se passe une photoréaction de type II. En effet, le méthoxy-5 psoralène, à partir de l'état excité, peut subir une conversion intersystème pour transférer son énergie à l'oxygène présent dans le milieu. L'oxygène passe de l'état fondamental à l'état excité (oxygène singulet). L'oxygène singulet généré dans le milieu endommage tous les coliformes fécaux présents dans le milieu.

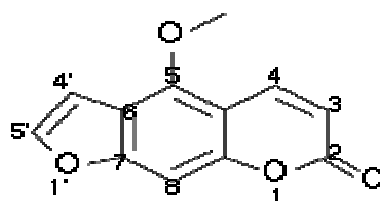


Figure 8.5.: Méthoxy-5 psoralène.

Nos résultats sont en accord avec ceux trouvés récemment par Aquacat, un projet financé par l'Union Européenne. En effet, Ces résultats mettent en évidence la production de l'oxygène singulet par des agents photosensibilisateurs basés sur des complexes Ru(II) polyazahétérocycliques. Ces complexes, en présence de lumière solaire, subissent une photoexcitation et cèdent l'énergie emmagasinée à d'autres molécules capables de produire des radicaux libres et l'oxygène singulet, une molécule très réactive pouvant tuer les bactéries (Aquacat, 2008). L'oxygène singulet, ainsi généré, est exploité pour purifier l'eau (Garcia F. et *al.*, 1996 ; Jiménez E. et *al.*, 2005 ; Villen L. et *al.*, 2006 ; Derosa M.C. et Crutchley R.J., 2006 ; Nina A. et *al.*, 2007 ; Ergaieg K. et Seux R., 2009).

3.1.2. Etude cinétique

Les résultats des constantes cinétiques sont repris dans le tableau 8.1. et les figures 8.6. ; 8.7. et 8.8. respectivement pour l'eau traitée avec le MOP-5 utilisé à une concentration de 0,006 ; 0,2 et 0,340 g/l.

Concentrations (g/l)	k (min ⁻¹)
0,006 g/l	0,11
0,2 g/l	0,15
0,340 g/l	0,17

Tableau 8.1.: Constantes cinétiques en fonction des différentes concentrations de MOP-5 utilisées.

Ces résultats montrent que l'efficacité de la désinfection varie suivant l'ordre ci-après :

$$0,340 \text{ g/l} > 0,2 \text{ g/l} > 0,006 \text{ g/l}$$

Ceci pourrait se justifier par le fait que plus la concentration du photosensibilisateur augmente, plus l'efficacité de la désinfection augmente. Ce phénomène a été mis en évidence dans plusieurs travaux réalisés sur la désinfection photodynamique de l'eau (Taba K.M. et Luwenga E., 1999 ; Sunda et *al.*, 2008). Mais il faut noter que dans le cadre de ce travail, les écarts notés entre les différentes constantes cinétiques ne sont pas énormes.

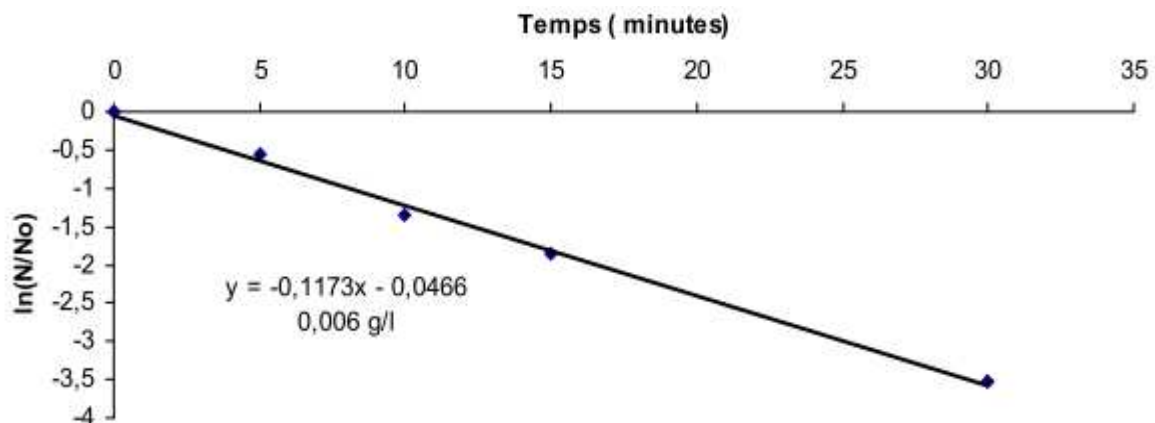


Figure 8.6.: Inhibition des coliformes fécaux en fonction du temps en utilisant 0,006 g de MOP-5 / l.

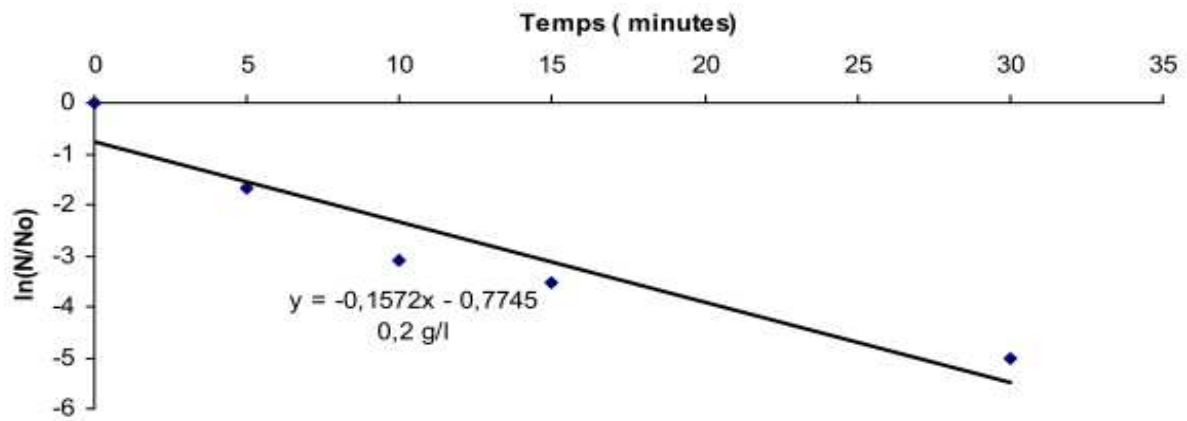


Figure 8.7.: Inhibition des coliformes fécaux en fonction du temps en utilisant 0,2 g de MOP-5 /l.

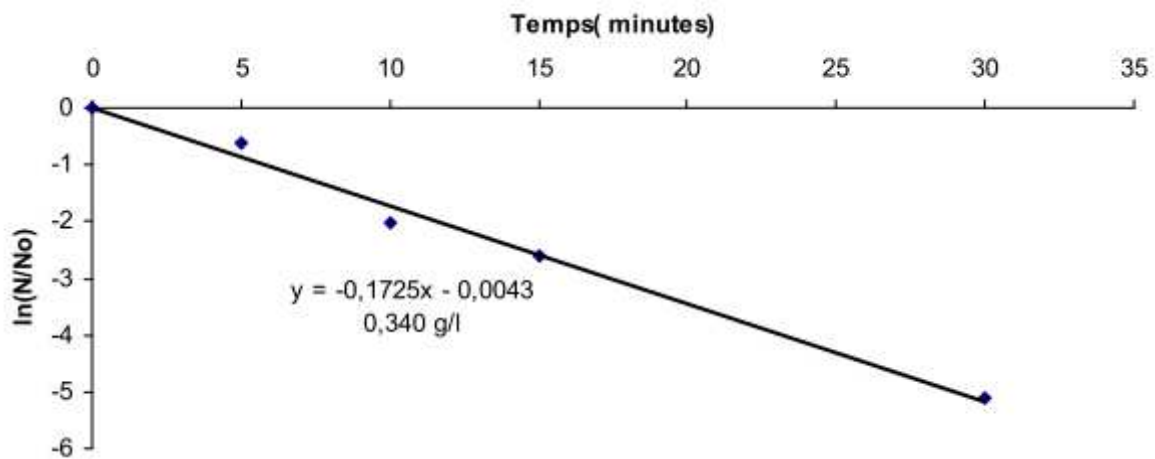


Figure 8.8.: Inhibition des coliformes fécaux en fonction du temps en utilisant 0,340 g de MOP-5 /l.

3.1.3. Influence de l'intensité lumineuse sur l'abattement des coliformes fécaux

Les résultats de l'abattement des coliformes fécaux en fonction de l'intensité lumineuse (fluence) sont repris dans la figure 8.9. pour les concentrations de 0,006 ; 0,2 et 0,340 g/l.

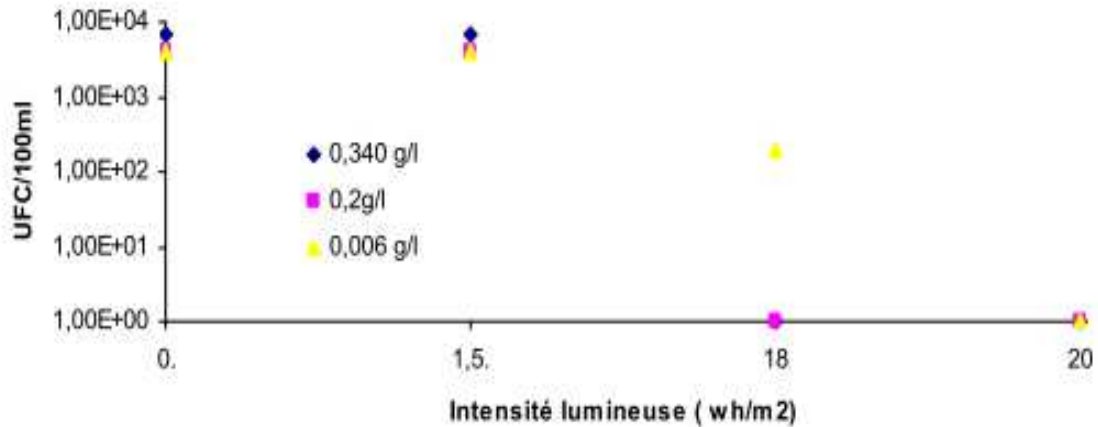


Figure 8.9.: Influence de l'intensité lumineuse sur l'inhibition des coliformes fécaux.

- (■) Eau traitée avec 0,2 de MOP-5 / litre
- (▲) Eau traitée avec 0,006 g de MOP-5 / litre
- (◆) Eau traitée avec 0,340 g de MOP-5 / litre

Aucune inhibition n'est notée avec une dose de 1,5 wh / m² (presque le début des analyses). A 18 wh / m², une inhibition complète est notée pour les concentrations de 0,340 et 0,2 g/l. Par contre, pour la concentration de 0,006 g/l, à cette même fluence, nous avons remarqué un abattement de l'ordre d'une unité (UFC). L'inhibition complète des coliformes fécaux dans l'eau traitée avec 0,006 g / l est remarquée après une variation de deux unités (20 wh / m²). Ceci montre que l'inhibition des coliformes fécaux croît avec l'intensité lumineuse.

3.2. Sensibilité des entérocoques fécaux vis-à-vis de MOP-5

Les résultats des tests de désinfection de l'eau par photosensibilisation avec le MOP-5 sont repris dans les figures 8.10. à 8.13.

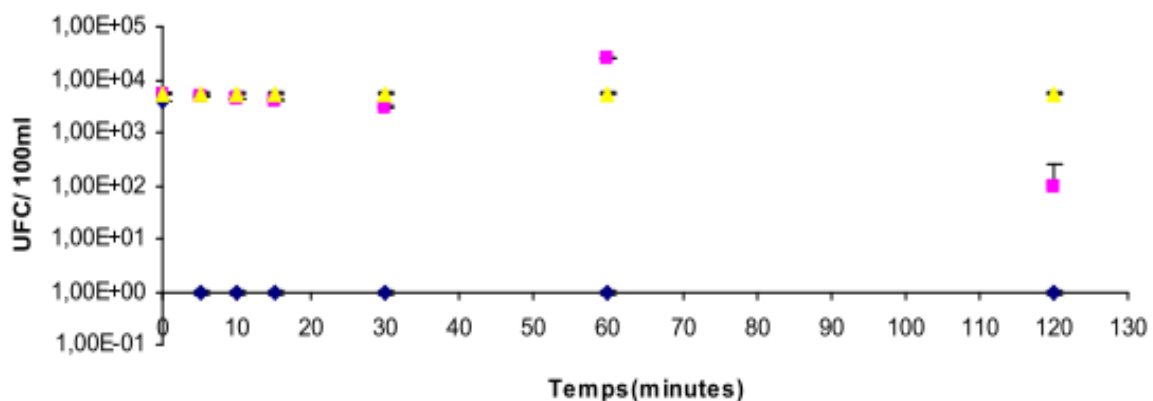


Figure 8.10.: Abattement des entérocoques fécaux en fonction du temps (0,006g de MOP-5 / litre).

- (◆) Eau traitée avec 0,006 g de MOP-5 / litre et irradiée
- (▲) Eau traitée avec 0,006 g de MOP-5 / litre et gardée à l'obscurité
- (■) Eau non traitée et irradiée

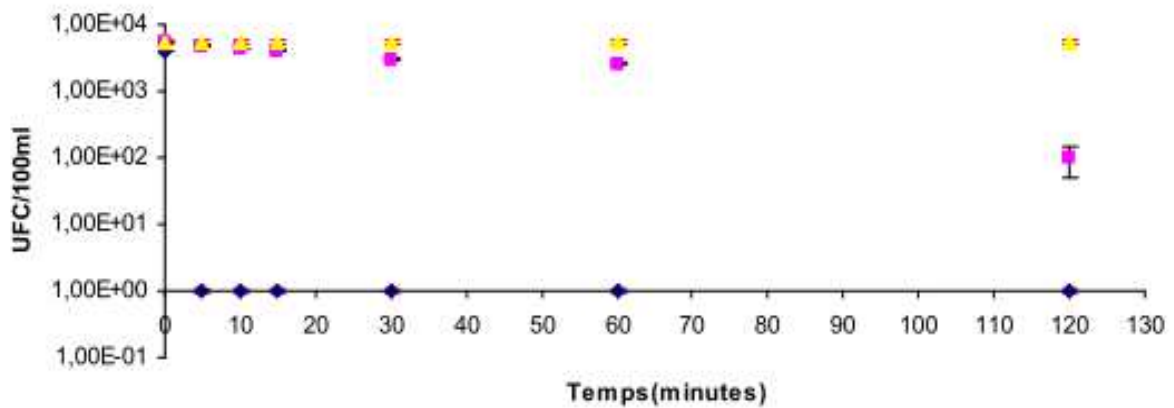


Figure 8.11.: Abattement des entérocoques fécaux en fonction du temps (0,20 g de MOP-5 / litre).

- (♦) Eau traitée avec 0,20 g de MOP-5 / litre et irradiée
- (▲) Eau traitée avec 0,20 g de MOP-5 / litre et gardée à l'obscurité
- (■) Eau non traitée et irradiée

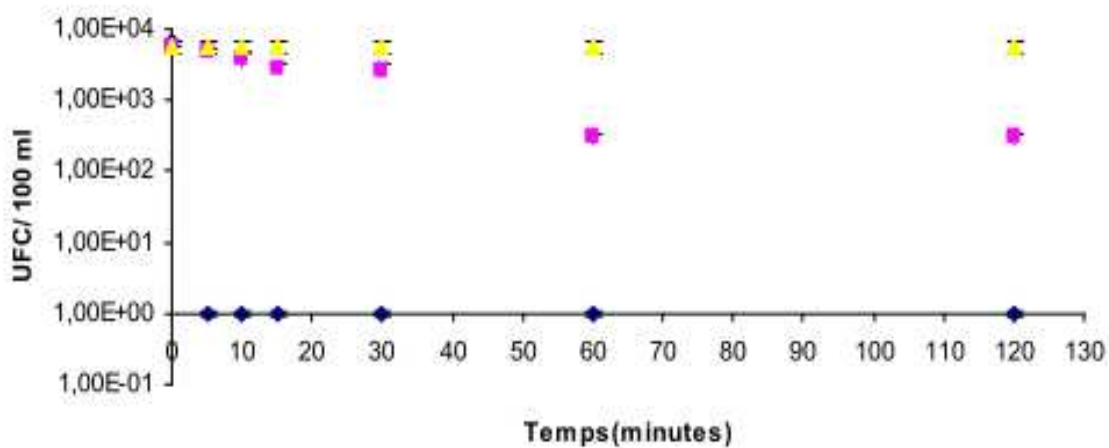


Figure 8.12.: Abattement des entérocoques fécaux en fonction du temps (0,340 g de MOP-5 / litre).

- (♦) Eau traitée avec 0,340 g de MOP-5/litre et irradiée
- (▲) Eau traitée avec 0,340 g de MOP-5/litre et gardée à l'obscurité
- (■) Eau non traitée et irradiée

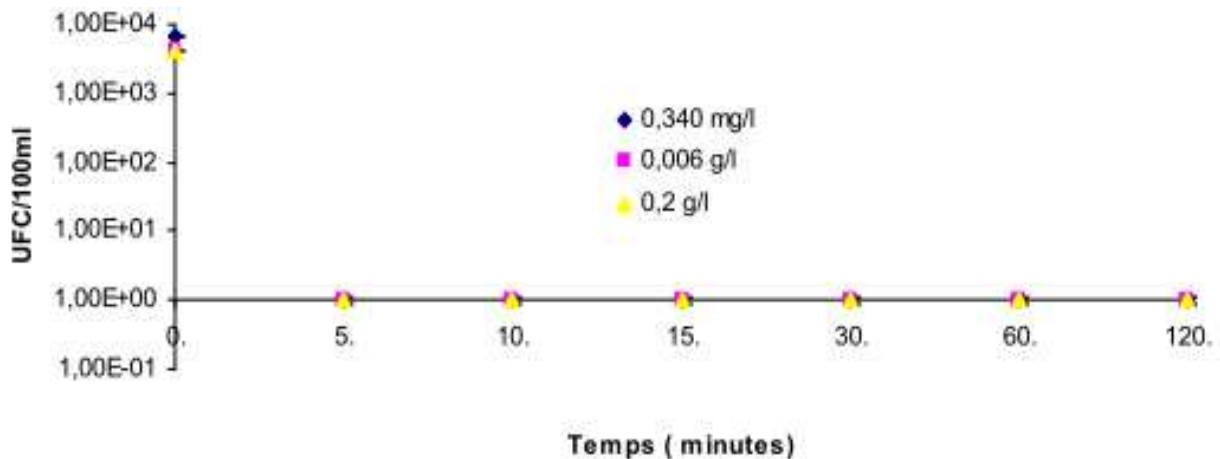


Figure 8.13.: Abattement des entérocoques fécaux en fonction du temps : comparaison des concentrations.

- (◆) Eau traitée avec 0,340 g de MOP-5 / litre et irradiée
- (▲) Eau traitée avec 0,20 g de MOP-5 / litre et irradiée
- (■) Eau traitée avec 0,006 g de MOP-5 / litre et irradiée

Ces résultats montrent une inhibition complète d'entérocoques fécaux présents dans le milieu après 5 minutes d'irradiation pour toutes les concentrations utilisées (0,006 ; 0,2 et 0,340 g/l).

Ces résultats confirment ceux observés au chapitre précédent.

4. Conclusion

L'étude de la désinfection de l'eau par photosensibilisation avec le méthoxy-5 psoralène a montré une inhibition complète des coliformes fécaux présents dans le milieu après 60 minutes d'irradiation pour toutes les concentrations utilisées (0,06 ; 0,20 et 0,340 g/l). L'étude cinétique a montré que les constantes cinétiques se classent suivant l'ordre que voici : 0,11 ; 0,15 et 0,17 min^{-1} , respectivement pour les concentrations de 0,006 ; 0,2 et 0,340 g/l.

En ce qui concerne les entérocoques fécaux, l'inhibition complète a été notée après cinq minutes d'irradiation pour toutes les concentrations (0,06 ; 0,20 et 0,340 g/l). La différence de sensibilité entre les coliformes fécaux et entérocoques fécaux pourrait se justifier par la constitution de leurs membranes cellulaires (voir chapitre VII).

L'inhibition remarquée aussi bien pour les coliformes fécaux que les entérocoques fécaux est due à la photoréactivité de méthoxy-5 psoralène. Cette molécule, en présence d'une source lumineuse subit l'excitation et passe de l'état fondamental à l'état excité. La forme excitée initie une réaction de photosensibilisation qui serait responsable de l'inhibition des coliformes et entérocoques fécaux.

Malgré l'activité remarquée pour cette molécule, celle-ci reste dans l'eau après la désinfection. La fixation de cette dernière sur un support solide permettrait de la récupérer après la désinfection de l'eau. Aussi, la dernière étape de notre recherche portera sur la

fixation du méthoxy-5 psoralène sur un support solide et l'étude de l'efficacité désinfectante de cette forme fixée sur support.

5. Références Bibliographiques

Anders A., Popper W., Herkt C. and Niemann E. (1983). Investigation on the mechanism of photodynamic action of different psoralens with DNA, *Biophys. Struct., Mech*, 10, p. 11-30.

Aquacat (2008). L'utilisation de l'oxygène singulet pour la désinfection de l'eau potable, Octobre 2008.

Bordin F.(1999). Photochemical and photobiological properties of furocoumarins and homologous drug, *International Journal of Photoenergy*, Vol. 1, p.1-6.

Courseille C., Georges B. et Jean B. (1982). Etude des interactions Psoralène Acides Nucléiques, *Acta Cryst.*, B38, p.1252-125.

Decout J. L., Georges H. and Lhomme J. (1983). Synthetic models related to DNA-intercaling molecules-highly selective and reversible photoreaction between the thymine and psoralen rings, *Journal de Chimie*, vol. 8, n° 7-1984, p. 433.

Derosa M.C. and Crutchley R.J. (2002). Photosensitized singlet oxygen and its applications, *Coordination Chemistry reviews*, 233-234 , p.351-371.

Ergaieg K. and Seux R. (2009). A comparative study of the photoinactivation of bacteria by meso-substituted cationic porphyrin rose bengal and methylene blue, *Desalination*, 248, p. 32-41.

Garcia F., Geogiadou Y., Orellana G., Braun A. and Oliveros E. (1996). Singlet Oxygen ($^1\Delta_g$) production by Ruthenium (II) complexes containing polyazaheterocyclic ligands in Methanol and in water, *Helv. Chim. Acta*, 79, p. 1222-1238.

Jiménez E., Manjon F. Fresnadillo D. and Orellana G. (2005). Solar water disinfection by singlet oxygen photogenerated with polymer-supported Ru (II) sensitizers, *Solar Energy*, Volume 80, Issue 10, p. 1382 – 1387.

Nina A., Dmitriy A., Oleg L. and Georgy N. (2007). Photosensitized oxidation by dioxygen as the base for drinking water disinfection, *Journal of Hazardous Materials*, Volume 146, Issue 3, p. 487-49.

Pathak M.A. and Joshi P.C. (1983). The nature and molecular basic of cutaneous photosensitivity to psoralen and coal., *J. Invest Dermatol.*, 80, p.66-74.

Sunda M., Rosillon F. et Taba K.M. (2008). Contribution à l'étude de la désinfection de l'eau par photosensibilisation avec les extraits de plantes, *European Journal of Water Quality*, Tome 39, Volume 2, p.199-209.

Taba K.M. et Luwenga E. (1999). L'effet de la photosensibilisation des extraits de plantes dans la désinfection de l'eau, *Med. Fac. Landbouww, Univ.Gent*, 64/1.

Villen L., Manjón, F., García F. D. and Orellana G. (2006). Solar Reactor for Water Disinfection by Sensitised Singlet Oxygen Production in Heterogeneous Medium, *Appl. Catal.*, 69, p.1-9.

CHAPITRE IX

CHAPITRE IX: DESINFECTION DE L'EAU PAR PHOTOSENSIBILISATION AVEC LE METHOXY-5 PSORALENE FIXE SUR LE POLYSTYRENE

1. Introduction

La désinfection de l'eau par photosensibilisation avec le méthoxy-5 psoralène (MOP-5) a montré une très bonne activité photosensibilisatrice. Malgré cette activité, ce dernier reste en solution après la désinfection de l'eau. Pour la suite de cette recherche, il nous a paru intéressant de le fixer sur un support solide pour pouvoir l'enlever après la désinfection de l'eau. Nous avons choisi le polystyrène en tant que support. Deux sortes de polystyrène ont été utilisés (A et B).

2. Matériel et méthodes

2.1. Désinfection de l'eau avec le MOP-5 fixé sur le polystyrène A

2.1.1. Prélèvement de l'eau à analyser

L'eau utilisée dans ce travail provenait de la rivière Semois, en Belgique. Cette eau contenait approximativement $25 \cdot 10^3$ UFC coliformes fécaux / 100 ml.

2.1.2. Le méthoxy-5 psoralène

Le méthoxy-5 psoralène utilisé dans ce travail provient de Sigma Aldrich, Belgique (Référence: 65320).

2.1.3. Le polystyrène

Le polystyrène utilisé dans ce travail provient de Sigma Aldrich, Belgique (Référence: 12973). Ses caractéristiques sont les suivantes: (Chlorure de benzoyle polystyrène, 100-300 mesh, charge: 1,5 mmol/g). Pour la suite du travail, ce polystyrène sera désigné polystyrène A.

2.1.4. Fixation du méthoxy-5 psoralène sur le polystyrène A

Le méthoxy-5 psoralène a été fixé sur le polystyrène A par mélange des 3 solutions suivantes:

- Solution 1: 35 mg (0,16 mmol) du méthoxy-5 psoralène (2, voir figure 9.1.) dans 3 ml de dichlorométhane ;
- Solution 2: 250 mg (0,36 mmol) du polystyrène (1, voir figure 9.1.) dans 3 ml de dichlorométhane ;
- Solution 3: 0,5 g (1,9 mmol) de chlorure d'étain (SnCl_4) dans 2ml de dichlorométhane (3).

Cette réaction a été réalisée sous agitation, pendant 48 heures, à la température ambiante (voir figure 9.1.). Le produit de la réaction a été filtré, puis lavé par le dichlorométhane. Par la suite, celui-ci a été soigneusement lavé plusieurs fois avec l'eau distillée, puis séché. Le produit de la réaction se présente sous forme de poudre brune (voir

figure 9.1.-3) ((Rdt : 93,7 % ; Infra Rouge (FT-IR, Kbr, -CO=: 1729 cm^{-1} ; -OH: 3416 cm^{-1}) Voir figure 9.3.)).

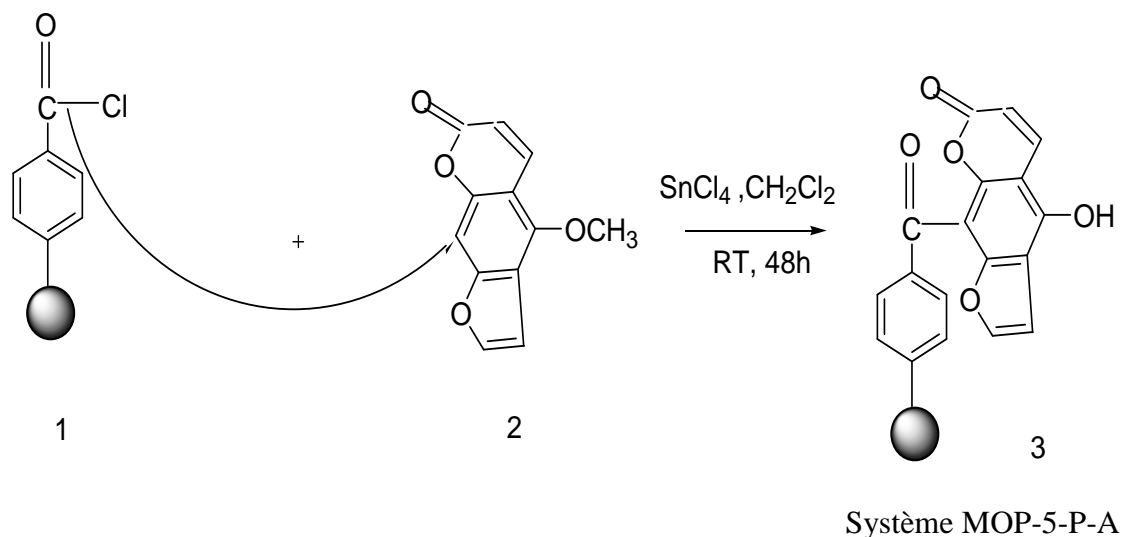


Figure 9.1.: Fixation du Méthoxy-5 psoralène sur le polystyrène A.

2.1.5. Mode opératoire de tests de désinfection

Dans deux erlenmeyers contenant 100 ml d'eau à analyser, on ajoute 20 mg du MOP-5-P-A (0,9 mg de MOP-5 / l) fixé sur le polystyrène (1 et 2). Un troisième erlenmeyer contenant l'eau non traitée est utilisée comme témoin (3). Les échantillons 1 et 3 sont soumis à l'agitation (à l'aide d'un agitateur magnétique) et irradiés à 365 nm avec une lampe UV, de marque UVA (B-100 AP). La lampe a été positionnée à 25 cm des échantillons d'eau. L'échantillon 2 est gardé à l'obscurité. Après 0, 15, 30, 60, 120 et 180 minutes d'irradiation, 1 ml d'eau provenant des tests de photosensibilisation est prélevé dans chaque lot pour la mise en culture. L'incubation est réalisée à 44,5°C pendant 24 heures.

2.1.6. Analyses bactériologiques

Les milieux Rapid'Ecoli et Bile esculine ont été utilisés pour la culture des coliformes et entérocoques fécaux respectivement. A chaque 0, 15, 30, 45, 60, 120, 180 minutes, 1 ml d'eau provenant d'échantillons des tests de photosensibilisation a étéensemencé. Après 24 heures d'incubation à 44,5°C, un comptage des colonies a été réalisé.

2.1.7. Etude cinétique

L'étude cinétique a été réalisée suivant la loi de Chick H. (1908). (Voir chapitre VIII, point 2.5.).

2.2. Désinfection de l'eau avec le MOP-5 fixé sur le polystyrène B

2.2.1. Eau polluée

Les échantillons d'eau ont été prélevés à la rivière Semois en Belgique. Cette eau contenait approximativement 10^4 et 10^3 UFC / 100ml, respectivement pour les coliformes fécaux et entérocoques fécaux.

2.2.2. Méthoxy-5 psoralène (MOP-5)

Le méthoxy-5 psoralène provenait de Sigma Aldrich, Belgique (Référence: 65320).

2.2.3. Polystyrène

Le polystyrène provenait de Sigma Aldrich, Belgique (Polystyrene monocarboxy terminated $M_w \sim 200000$ by GPC) (Référence: 701645). Pour la suite des expériences, ce polystyrène sera désigné polystyrène B.

2.2.4. Fixation du méthoxy-5 psoralène sur le polystyrène B

Le méthoxy-5 psoralène a été fixé sur le polystyrène comme suit:

Etant donné que la fonction acide carboxylique n'est pas très réactionnelle par rapport à la fonction chlorure d'acyle, celle-ci a été transformée en chlorure d'acyle avec le chlorure de thionyle comme suit:

170 mg de polystyrène (P-COOH) (1) (voir figure 9.2.) a été mélangé avec 0,5 ml de chlorure de thionyle (SOCl_2) dans un ballon de 50 ml. Par la suite, quelques gouttes de diméthyle formamide (DMF) ont été ajoutées. Le mélange a été par après chauffé à reflux (82°C) pendant 48 heures. On obtient le produit (2).

Par la suite, 2 ml d'acide trifluoroacétique (TFA) ont été mélangés avec le produit (2), puis 6 mg de MOP-5 (3). Le mélange a été chauffé à reflux à 82°C , sous agitation, pendant deux heures (Woods L. et Harold L., 1960) (Voir figure 9.2.). Le produit (Cristaux blanc, qui au fil de la réaction, forment un solide en forme de film) (4) a été plusieurs fois lavé avec l'eau distillée et séché (Rdt : 98 %) avant d'être utilisé dans les tests de photosensibilisation.

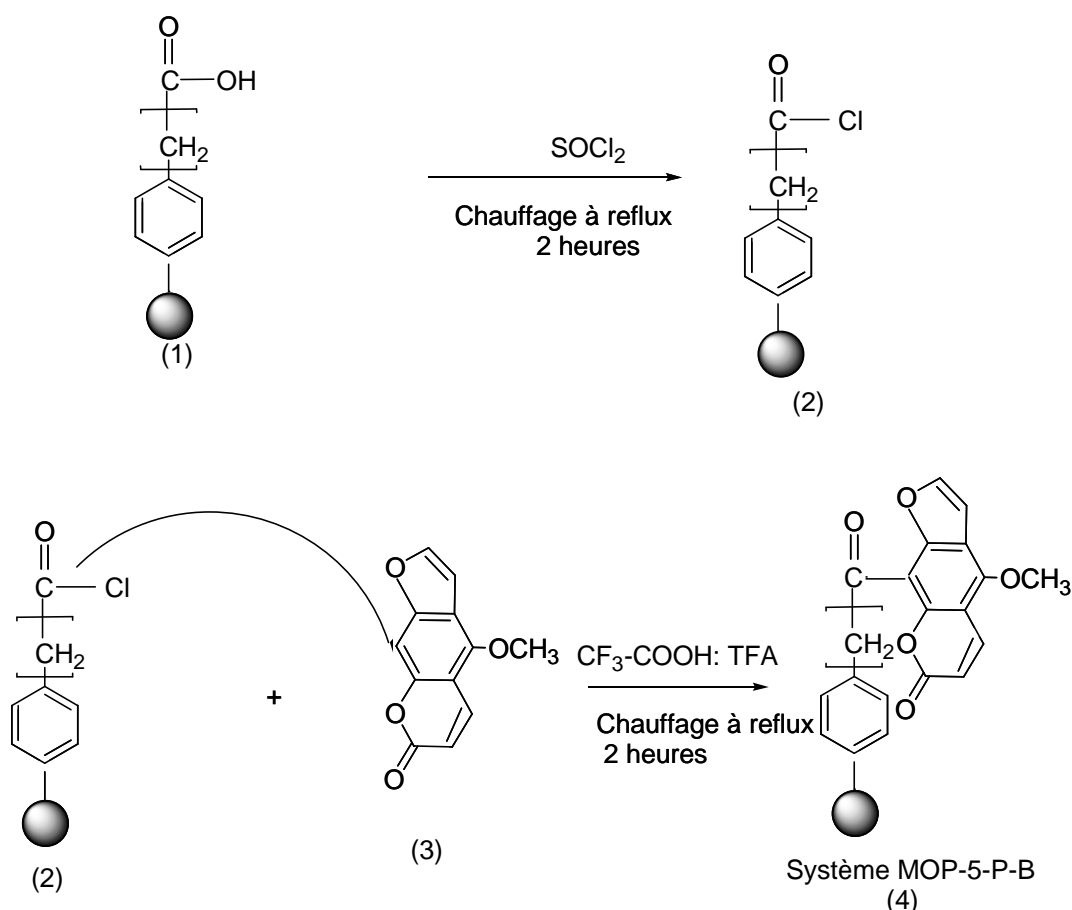


Figure 9.2.: Fixation de MOP-5 sur le polystyrène B.

2.2.5. Tests de photosensibilisation avec le MOP-5 psoralène fixé sur le polystyrène B (MOP-5-P-B)

Les boîtes en verre de pyrex de 100 ml ont été utilisées comme réacteurs. Dans chaque réacteur, nous avons ajouté le système MOP-5-P-B. Un autre échantillon non traité et irradié a été utilisé comme témoin. Par la suite, les échantillons ont été irradiés avec une lampe de marque UVP (B-100AP) à 365 nm. La lampe a été positionnée à 25 cm des échantillons d'eau. L'intensité lumineuse a été mesurée avec un pyranomètre CMP3. Un échantillon traité avec le MOP-5-P-B et gardé à l'obscurité a été utilisé comme témoin négatif. A chaque 0, 2, 6, 13, 15, 30 et 60 minute(s), des prélèvements ont été réalisés dans chaque réacteur pour les analyses bactériologiques. Ces expériences ont été réalisées à dix reprises. Les différents points repris dans chaque figure représentent la moyenne de dix mesures. Pour chaque série de données l'erreur standard a été calculée (Moyenne \pm SD).

2.2.6. Analyses bactériologiques

Les milieux Rapid'Ecoli et Bile esculine ont été utilisés pour la culture des coliformes et entérocoques fécaux respectivement. A chaque 0, 2, 4, 6, 13, 15, 30 et 60 minute(s) 1 ml d'eau provenant d'échantillons des tests de photosensibilisation a été ensemencé. Après 24 heures d'incubation à 44,5°C, un comptage des colonies a été réalisé.

2.2.7. Etude cinétique

L'étude cinétique a été réalisée suivant la loi de Chick H. (1908). (Voir chapitre VIII, point 2.5.).

3. Résultats et discussion

3.1. Caractérisation du MOP-5 fixé sur le polystyrène A

La figure 9.3. donne les résultats de la spectroscopie infra-rouge de la réaction entre le MOP-5 et le polystyrène. Après le dépouillement du spectre, nous avons remarqué la présence d'une large bande à 3416 cm^{-1} , caractéristique d'un groupement $-\text{OH}$. Celui-ci provient probablement du clivage du groupement $-\text{OCH}_3$ (voir figure 9.1.). Nous avons en outre remarqué une absorption à 1729 cm^{-1} , caractéristique du groupement carbonyle ($-\text{C}=\text{O}$) du méthoxy-5 psoralène (voir aux annexes). Celui-ci met en évidence la fixation du MOP-5 sur le polystyrène.

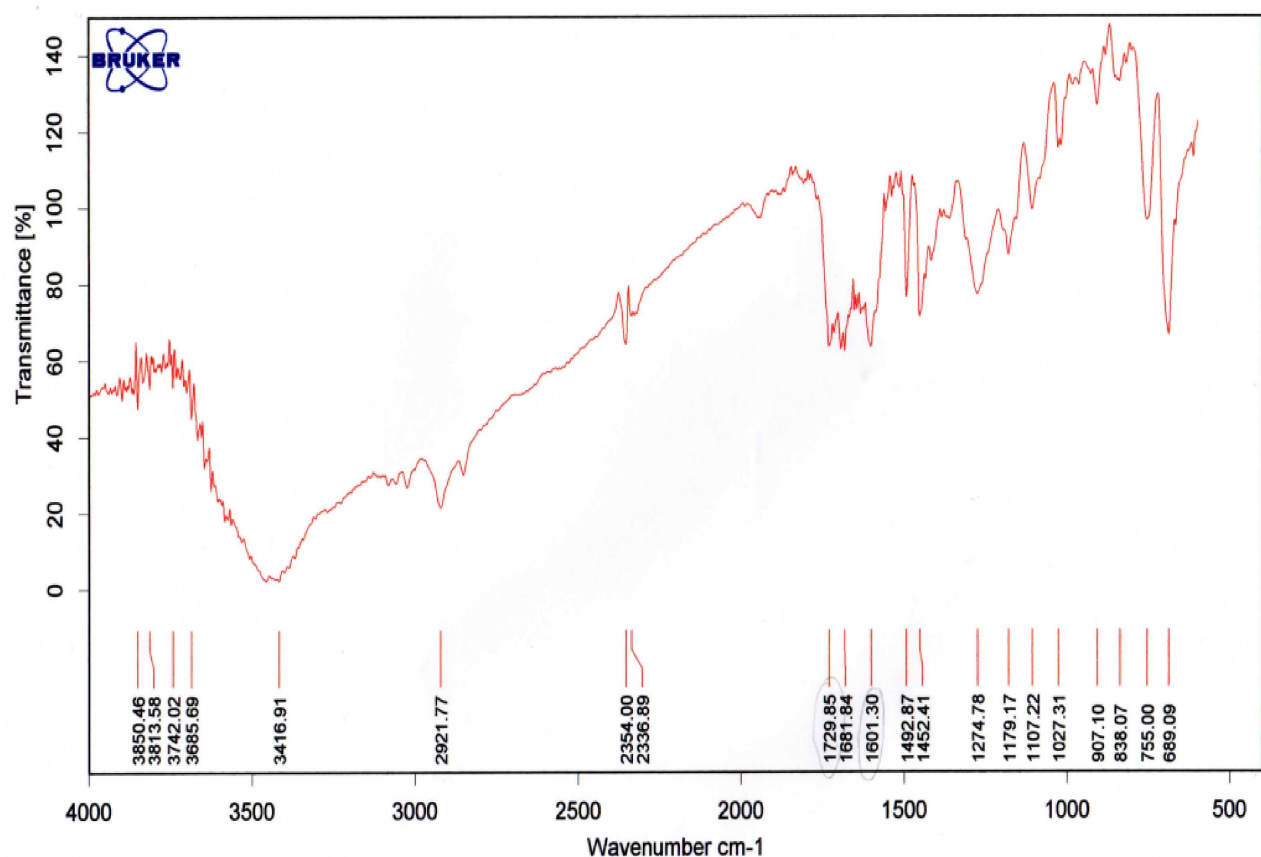


Figure 9.3.: Spectre infra rouge du méthoxy-5 psoralène fixé sur le polystyrène A.

3.2. Tests de désinfection de l'eau par photosensibilisation avec le méthoxy-5 psoralène fixé sur le polystyrène A (MOP-5-P-A)

Les résultats des tests de désinfection de l'eau par photosensibilisation avec le méthoxy-5 psoralène fixé sur le polystyrène sont repris dans la figure 9.4.

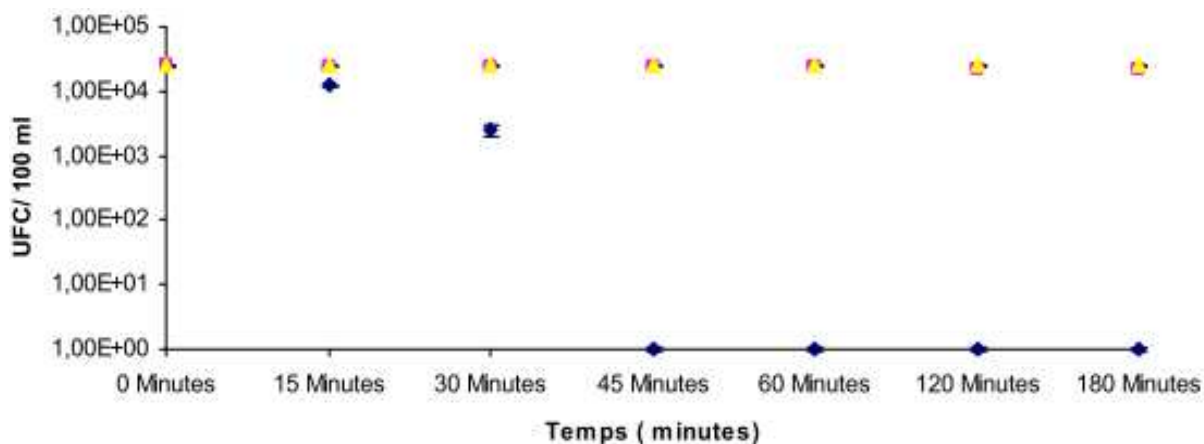


Figure 9.4.: Inhibition des coliformes fécaux en fonction du temps dans l'eau traitée avec le MOP-5-P-A (0,9 mg de MOP-5 / litre d'eau).

- (▲): Eau traitée avec le MOP-5-P-A (0,9 mg de MOP-5 / litre d'eau) et irradiée
- (■): Eau non traitée et irradiée
- (◆): Eau traitée avec le MOP-5-P-A (0,9 mg de MOP-5 / litre d'eau) et gardée à l'obscurité

Au regard des résultats obtenus dans ce travail, le méthoxy-5 psoralène fixé sur le polystyrène (MOP-5-P-A) révèle une très bonne activité dans la désinfection de l'eau par photosensibilisation (Inhibition complète des coliformes fécaux après 45 minutes d'irradiation) (voir figure 9.4.). Quant à l'échantillon d'eau non traité et exposé à la radiation ultraviolette, aucune inhibition significative n'a été constatée. Ceci laisse supposer que le méthoxy-5 psoralène garde ses propriétés photosensibilisatrices après greffage sur le polystyrène. Nous avons remarqué une activité accrue du méthoxy-5 psoralène greffé sur le polystyrène par rapport au méthoxy-5 psoralène en solution (voir chapitre VIII). Il semblerait donc que le greffage du méthoxy-5 psoralène sur le polystyrène augmente l'activité photosensibilisatrice de cette molécule. Ceci pourrait être dû à l'apport du groupement chromophore (carbonyle $-C=O$) apporté par le polystyrène au méthoxy-5 psoralène. Ce groupement facilite la résonance dans la molécule et donc la réactivité. En ce qui concerne la cinétique, nous avons remarquée que l'inhibition des coliformes fécaux en fonction du temps suit une cinétique de premier ordre ($n \sim 1$).

La récupération du système MOP-5-P-A pour une deuxième application se fait difficilement, car celui-ci se présente sous forme de poudre. Il faut donc procéder par la décantation. Ceci prend du temps et semble être moins pratique. Afin de résoudre ce problème, nous avons fixé le MOP-5 sur un support qui permet de l'enlever facilement après la désinfection.

3.3. Désinfection de l'eau par photosensibilisation avec le polystyrène B (MOP-5-P-B)

Dans la présente étude, nous avons fixé le MOP-5 sur le polystyrène (Polystyrène monocarboxy terminated, $M_w \sim 200000$ by GPC). Cette réaction conduit à la formation d'un produit qui se présente sous forme d'un film et qui est facilement récupérable après la désinfection de l'eau.

3.3.1. Sensibilité des coliformes fécaux vis-à-vis du système MOP-5-P-B

Les résultats de tests de désinfection de l'eau photosensibilisation avec le MOP-5 fixé sur le polystyrène sont repris dans la figure 9.5.

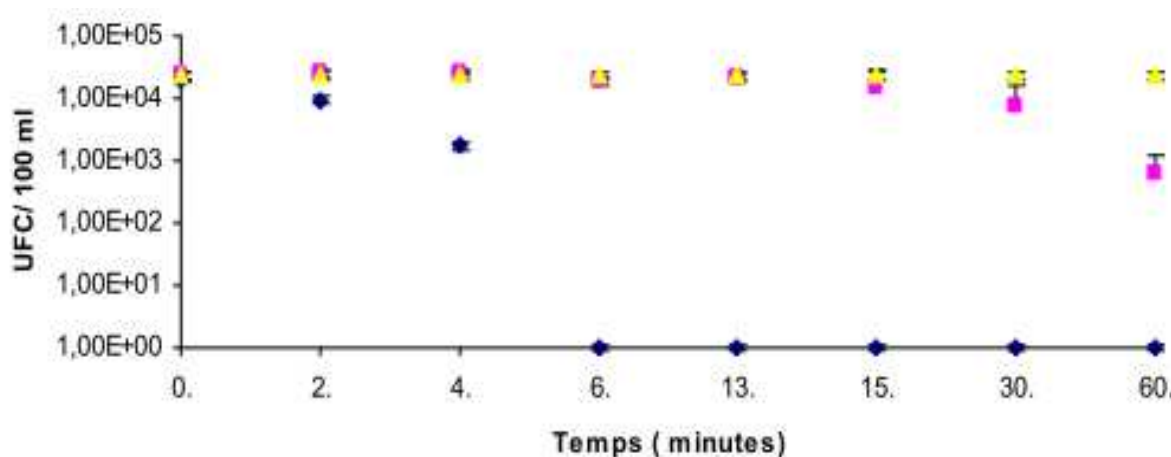


Figure 9.5.: Inhibition des coliformes fécaux en fonction du temps dans l'eau traitée avec le système MOP-5-P-B (5,88 mg de MOP-5 / litre d'eau).

- (■) Eau traitée avec le système MOP-5-P-B (5,88 mg de MOP-5 / litre d'eau) et irradiée.
- (▲) Eau traitée avec le système MOP-5-P-B (5,88 mg de MOP-5 / litre d'eau) et gardée à l'obscurité.
- (◆) Eau non traitée et irradiée

Aucune inhibition des coliformes fécaux n'a été constatée après une heure de traitement de l'eau avec MOP-5-P-B à l'obscurité. En ce qui concerne l'eau non traitée et irradiée, nous avons noté un abattement négligeable après 60 minutes d'irradiation. L'inhibition complète des coliformes fécaux a été notée après six minutes d'irradiation dans l'eau traitée avec le MOP-5-P-B et irradiée. Ceci laisse supposer que le système MOP-5-P-B est photosensibilisant. Aussi, ces résultats montrent que le MOP-5 garde ses propriétés photosensibilisantes après immobilisation sur le polystyrène. En comparant ces résultats à ceux obtenus avec la forme libre de MOP-5, nous constatons que le système MOP-5-P-B présente une photoactivité accrue par rapport à la forme libre à la même concentration (Voir Chapitre VIII).

Ceci pourrait se justifier :

- premièrement, par le fait que l'eau traitée avec la forme libre présente une turbidité très élevée (dispersion de MOP-5 dans l'eau) par rapport à celle traitée avec le système MOP-5-P-B. Cette turbidité ne permet pas une bonne transmission de lumière. Par contre, pour l'eau

traitée avec le système MOP-5-P-B, la bonne transmission de la lumière conduit à une photoexcitation facile de la molécule de MOP-5 fixé sur le polystyrène. Celle-ci, étant dans sa forme excitée, inhibe les microorganismes présents dans le milieu (Pathak M.A. et Joshi P.C., 1983 ; Decout J. L. et *al.*, 1983 ; Foote C.S., 1984 ; Beani J.C., 1997 ; Bordin F., 1999). Ceci pourrait être aussi à la base de l'activité élevée remarquée pour le système MOP-5-P-B par rapport au système MOP-5-P-A (poudre).

- Deuxièmement, cette différence pourrait être due par l'apport du groupement chromophore ($-C=O$) du polystyrène au méthoxy-5 psoralène.

3.3.1.1. Etude cinétique

L'étude cinétique a été réalisée suivant la loi de Chick et Watson (1908). Les résultats de cette étude sont donnés dans la figure 9.6.

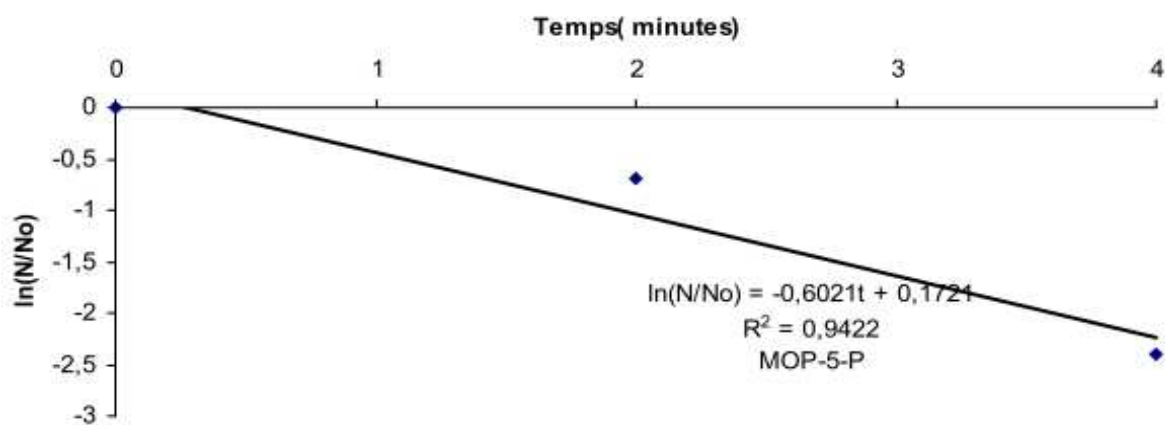


Figure 9.6.: Abattement des coliformes fécaux en fonction du temps dans l'eau (5,88 mg de MOP-5 / l).

L'ordre de la réaction a été déterminée par l'équation : $K=C^n t.$, où:
 t : temps
 C: concentration du photosensibilisateur
 n: ordre de réaction
 k: la constante cinétique

La réaction est de premier ordre si n est compris entre 0,8 et 1,2: $0,8 < n < 1,2$

Exploitant cette relation, nous avons trouvé que l'inhibition des coliformes fécaux en fonction du temps suit une cinétique de premier ordre ($n = 1$).

3.3.1.2. Influence de l'intensité lumineuse sur l'abattement des coliformes fécaux

Les résultats de l'influence de l'intensité lumineuse sur l'abattement des coliformes fécaux sont donnés dans les figures 9.7. et 9.8.

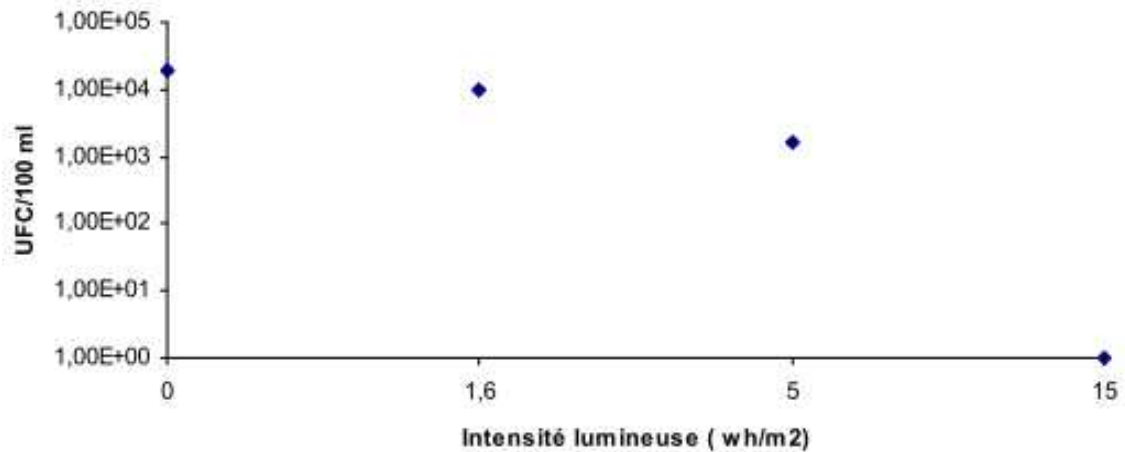


Figure 9.7.: Influence de l'intensité lumineuse sur l'abattement des coliformes fécaux par MOP-5-P-B (5,88 mg de MOP-5 / litre d'eau).

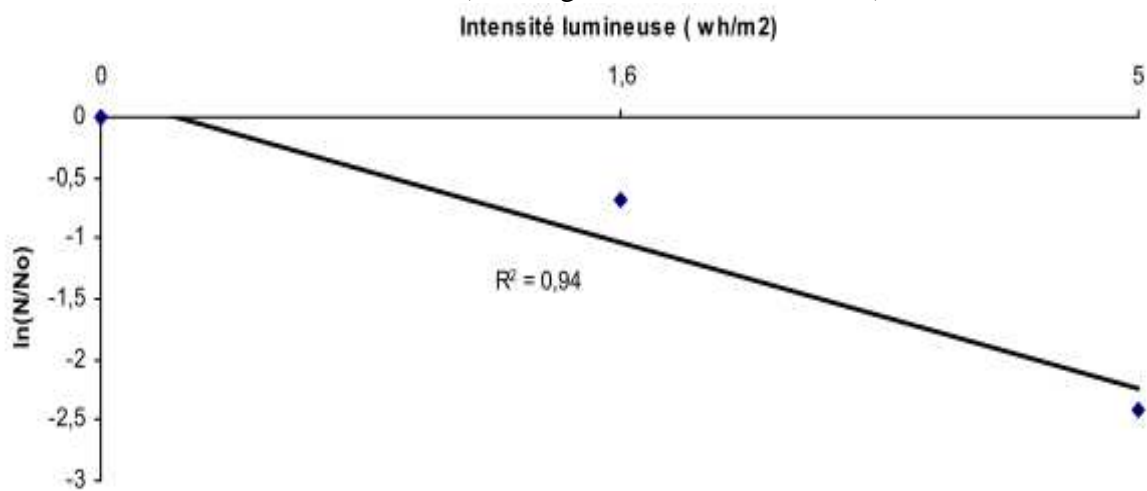


Figure 9.8.: Abattement des coliformes fécaux en fonction de l'intensité lumineuse (5,88 mg de MOP-5 / l).

Nous avons remarqué une corrélation entre l'abattement des coliformes fécaux et l'intensité lumineuse caractérisée par un coefficient de corrélation $R^2 = 0,94$.

3.3.2. Sensibilité des entérocoques fécaux vis-à-vis de MOP-5 fixé sur le polystyrène-B (MOP-5-P-B)

Les résultats de tests de désinfection de l'eau par photosensibilisation avec le MOP-5-P-B sont repris dans la figure 9.9.

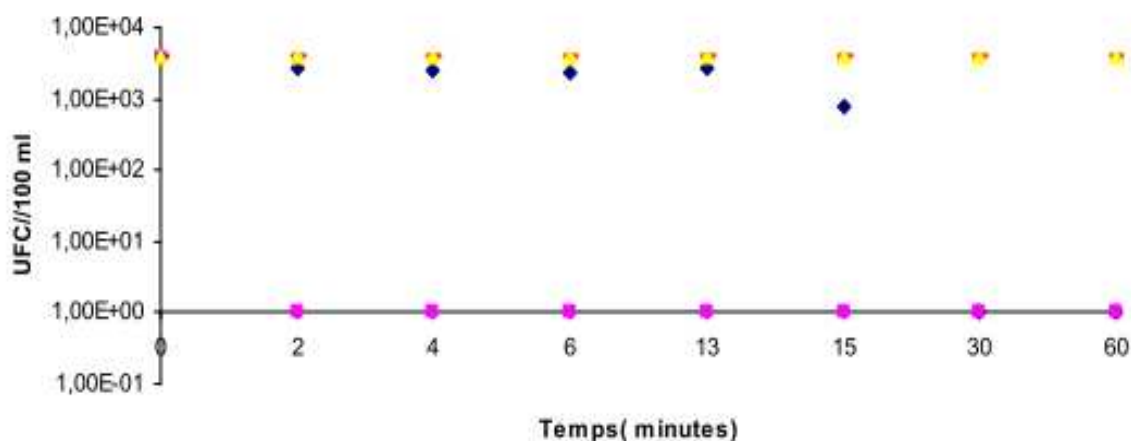


Figure 9.9.: Inhibition d'entérocoques fécaux en fonction du temps dans l'eau traitée avec le système MPO-5-P-B (5,88 mg de MOP-5 / litre d'eau).

- (■) Eau traitée avec le système MOP-5-P-B (5,88 mg de MOP-5-B / litre d'eau) et irradiée
- (▲) Eau traitée avec le système MOP-5-P-B (5,88 mg de MOP-5-B / litre d'eau) et gardée à l'obscurité
- (◆) Eau non traitée et irradiée

Ces résultats montrent une inhibition complète des entérocoques fécaux présents dans l'eau non traitée et irradiée après 30 minutes. Aucune inhibition n'a été notée dans l'eau traitée avec le MOP-5-P-B et gardée à l'obscurité. Nous avons noté une inhibition complète d'entérocoques fécaux dans l'eau traitée avec le MOP-5-P-B après deux minutes d'irradiation. Ceci laisse suggérer que le système MOP-5-P-B, sous irradiation, initie une photoréaction qui conduit à l'inhibition d'entérocoques fécaux présents dans l'eau. L'inhibition complète d'entérocoques fécaux notée après 30 minutes d'irradiation dans l'eau non traitée est due l'action combinée du rayonnement ultraviolet et de la température. L'action combinée des UVA et de la chaleur sur les microorganismes est connue (Wegelin et *al.*, 1994 ; Meierhofer R. et Wegelin M., 2002). Mais cette activité est faible par rapport à celle induite par l'action combinée de l'UVA (lumière) et du photosensibilisateur (Garcia F. et *al.*, 1996 ; Taba K.M. et Luwenga E., 1999 ; Villen L. et *al.*, 2006 ; Sunda et *al.*, 2008 ; Sunda et *al.*, 2009).

3.3.3. Etude du maintien de l'activité du système MOP-5-P-B dans le temps

Une deuxième application du système MOP-5-P-B n'a montré aucune activité photosensibilisatrice vis-à-vis des coliformes fécaux (Voir figure 9.10.). Cette perte d'activité pourrait se justifier par la formation des liaisons covalentes entre les molécules de méthoxy-5 psoralène, conduisant à la formation des photodimères (cycloaddition [2.2]).

Cherchant à résoudre ce problème, nous avons exploré deux voies:

1. L'irradiation du système (MOP-5-P-B) avec une lampe halogène émettant entre 340-750 nm (Halogen reflector lamp GU10, 50 Watts) ;
2. L'irradiation du système (MOP-5-P-B) avec une longueur d'onde inférieure à 320 nm. Dans ce cas, nous avons utilisé une lampe ultraviolette émettant à une longueur d'onde de 254 nm (Camag UV-lamp, 8 watts).

La première voie, celle d'irradiation du système MOP-5-P-B avec une lampe halogène n'a montré aucune régénération. Exploitant la deuxième voie, nous avons remarqué la régénération du système après deux heures d'irradiation à 254 nm (voir figure 9.11.).

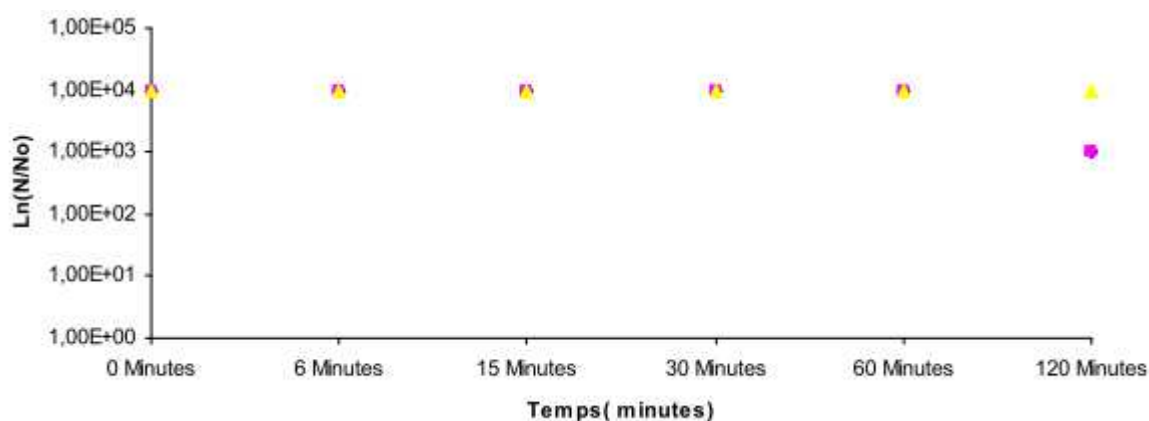


Figure 9.10.: Inhibition des coliformes fécaux en fonction du temps avec le système MOP-5-P-B (5,88 mg de MOP-5 / litre) (deuxième application).

- (◆) Eau traitée avec le système MOP-5-P-B (5,88 mg de MOP-5 / litre) et irradiée
- (▲) Eau traitée avec le système MOP-5-P-B (5,88 mg de MOP-5 / litre) et gardée à l'obscurité
- (■) Eau non traitée et irradiée

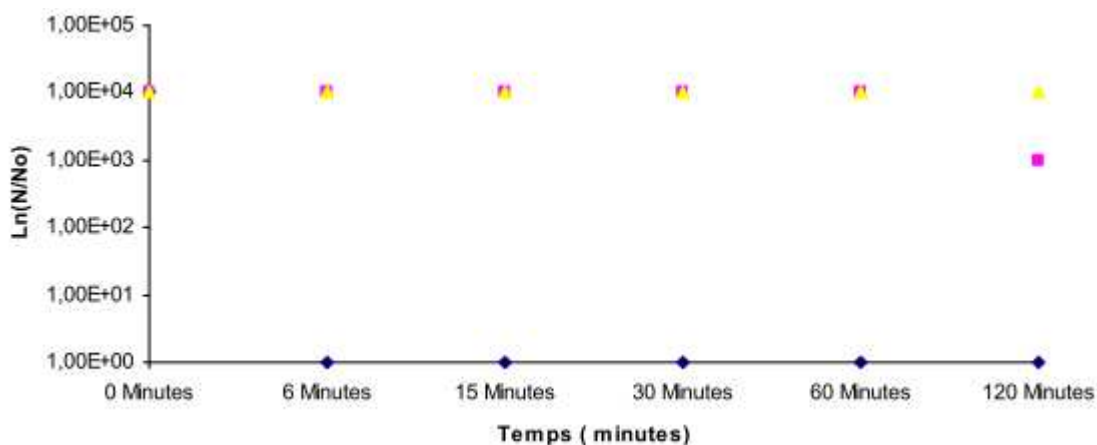


Figure 9.11.: Inhibition des coliformes fécaux en fonction du temps avec le système MOP-5-P-B régénéré.

- (◆) Eau traitée avec le système MOP-5-P-B régénéré et irradiée
- (▲) Eau traitée avec le système MOP-5-P-B régénéré et gardée à l'obscurité
- (■) Eau non traitée et irradiée

Etant donné qu'aucune régénération n'a été remarquée après deux heures d'irradiation avec la lampe halogène et que la régénération de celui-ci soit remarquée après deux heures d'irradiation ultraviolette, suppose que la régénération du système (MOP-5-P-B) dépend de la longueur d'onde utilisée et donc de l'énergie. Pour une faible énergie ($\lambda > 320$ nm: cas de la

lampe halogène) aucune régénération n'est constatée. Pour une grande énergie ($\lambda < 320$ nm: cas de la lampe ultraviolette), nous avons remarqué la régénération du système. Cette énergie conduirait à l'ouverture des liaisons formées entre les molécules de méthoxy-5 psoralène (Photodimères). Ces liaisons sont donc réversibles. Cette réversibilité est mise en évidence par la régénération du système MOP-5-P-B.

4. Conclusion

L'étude de la désinfection de l'eau par photosensibilisation avec le méthoxy-5 psoralène fixé sur le polystyrène A a montré une inhibition complète des coliformes fécaux après quarante-cinq minutes. Malgré l'efficacité du système MOP-5-P-A, la récupération de ce dernier après la désinfection de l'eau est difficile. Cherchant à résoudre ce problème, nous avons fixé le MOP-5 sur un support solide qui faciliterait sa récupération après la désinfection (polystyrène B).

L'étude de la désinfection de l'eau par photosensibilisation avec le méthoxy-5 psoralène fixé sur le polystyrène B (MOP-5-P-B) a montré une inhibition complète après 6 et 2 minutes d'irradiation respectivement pour les coliformes et entérocoques fécaux.

Ces résultats montrent que la forme fixée présente une activité photosensibilisatrice accrue par rapport à la forme libre: l'inhibition complète des coliformes fécaux a été notée après 60 minutes (voir chapitre VIII) et 6 minutes d'irradiation respectivement pour la forme libre (en solution) et fixée (MOP-5-P-B). En ce qui concerne les entérocoques fécaux, l'inhibition complète a été notée après 2 et 5 minutes respectivement pour la forme fixée et la forme libre.

Etudiant la cinétique de l'inhibition microbienne du système MOP-5-P-B, nous avons remarqué que celle-ci suit une cinétique de premier ordre ($n=1$; $R = 0,94$).

Une deuxième application du système MOP-5-P-B n'a montré aucune activité photosensibilisatrice. Ceci est dû à la formation des photodimères entre les molécules de MOP-5. La régénération du système MOP-5-P-B passe par l'irradiation de ce dernier à une longueur d'onde inférieure à 320 nm. D'autres tests avec le système MOP-5-P-B s'avèrent indispensables pour examiner son efficacité dans le temps.

5. Références Bibliographiques

Beani J.C. (1997). Phototoxicité: Aspects théoriques et applications, Schmitt D. in: Biologie de la peau humaine, Paris, 245-265p.

Bordin F. (1999). Photochemical and photobiological properties of furocoumarins and homologues drogues, Vol. 1, *International Journal of Photoenergy*, p. 1-6.

Chick H. (1908). An investigation of the laws in disinfection, *J. Hyg.*, 8, p.92-158.

Decout J. L., Georges H. and Lhomme J. (1983). Synthetic models related to DNA-intercalating molecules-highly selective and reversible photoreaction between the thymine and psoralen rings, *Journal de Chimie*, vol. 8, n° 7-1984, p. 433.

Foote C.S. (1984). Photosensitized oxidation and singlet, consequences in biology systems; free Radicals in biology, Vol.III, ed.by W.A.Pryor, Academic Press, Berlin.

Garcia F., Geogiadou Y., Orellana G., Braun A. and Oliveros E. (1996). Singlet Oxygen ($^1\Delta_g$) production by Ruthenium (II) complexes containing polyazaheterocyclic ligands in methanol and in water, *Helv. Chim. Acta*, 79, p. 1222-1238.

Meierhofer R. et Wegelin M. (2002). Solar Water Disinfection: A guide for the application of Sodis (cited 2007 June 18).

Pathak M.A. and Joshi P.C. (1983). The nature and molecular basic of cutaneous photosensitivity to psoralen and coal, *J. Invest Dermatol.*, 80, p.66-74.

Sunda M., Rosillon F. et Taba K.M. (2008). Contribution à l'étude de la désinfection de l'eau par photosensibilisation avec les extraits de plantes, *European Journal of Water Quality*, Tome 39, Volume 2, p.199- 209.

Sunda M. Rosillon F., Taba K.M. et Lami N. (2009). Désinfection de l'eau par photosensibilisation avec les huiles essentielles de *Citrus bergamia*, *Citrus reticulata* et *Citrus limonum*, 8^{ième} congrès International du Gruttee, Nancy, France, 86-89p.

Taba K.M. et Luwenga E. (1999). L'effet de la photosensibilisation des extraits de plantes dans la désinfection de l'eau, *Med.Fac.Landbouww, Univ.Gent*, p.177-181.

Woods L. and Harold L.(1960). Acylation of coumarins in the presence of trifluoroacetic acid, *Kansas Academy of Science*, Vol. 63, N° 3, p. 165-168.

Villén, L., Manjón, F., García F. D. and Orellana G. (2006). Solar reactor for water disinfection by Sensitized singlet oxygen production in heterogeneous medium, *Appl. Catal.*, 69, p.1-9.

Wegelin W., Canonica S., Meslmsner K., .Peraro F. et Metzler A. (1994). Désinfection solaire de l'eau, *Water research*, Vol. 26, N°3, p 154-169.

CHAPITRE X

CHAPITRE X: DISCUSSION GENERALE

La présentation séquentielle de nos résultats à travers les 5 chapitres précédents correspondant aux 5 étapes de recherche ne permet pas d'avoir une vision d'ensemble. Alors que les discussions de ces chapitres étaient essentiellement en liaison directe avec les résultats obtenus, il nous paraissait intéressant de mener une réflexion générale critique sur la manière dont le programme de recherche a été développé et sur les conditions d'application concrète des résultats obtenus en vue de la production d'eau potable au niveau familial. Mais d'abord, examinons l'objet principal de ce travail qui est l'étude du pouvoir sensibilisateur des plantes appliqué à la désinfection de l'eau.

1. Confirmation de l'effet photosensibilisateur justifiant le pouvoir désinfectant des substances testées

L'effet photosensibilisateur des plantes, en lien avec la désinfection de l'eau, a bien été confirmé à chacune des étapes de notre travail. L'action inhibitrice vis-à-vis des bactéries est observée dans des conditions caractéristiques de la photosensibilisation, à savoir:

- Exposition obligatoire à la lumière pour obtenir une inhibition significative ;
- En absence de lumière, activité pratiquement nulle pendant la durée des tests réalisés en laboratoire ;
- En phase de post-photosensibilisation, aucune réactivation des bactéries n'a été observée ;
- Le photosensibilisateur peut être utilisé plusieurs fois sans perdre son pouvoir.

Il convient cependant de nuancer ce dernier point sachant que seule la forme fixée sur le polystyrène modifié a pu être testée. L'efficacité est retrouvée lors d'un second essai après réactivation du support suite à une exposition à une lumière de 254 nm. Il conviendrait de confirmer ce phénomène en réutilisant le même photosensibilisateur de nombreuses fois.

2. Réflexion relative aux conditions d'expérimentation

Le thème de ce travail peut faire appel à un vaste champ d'investigation tant le monde des plantes est immense. Nous avons exploré une dizaine de plantes et à partir des premières investigations, nous avons centré notre analyse sur les substances porteuses d'un effet photosensibilisateur. Nous reviendrons ici sur les conditions d'expérimentation, particulièrement, la nature du photosensibilisateur, la lumière utilisée et les analyses bactériologiques.

2.1. La nature du photosensibilisateur

Au fil des étapes de notre recherche, nous avons été confrontés à diverses formes de photosensibilisateurs. Partant d'une forme brute (des extraits aqueux de plantes), nous avons utilisé au final une molécule chimiquement pure fixée sur un support solide. Plus précisément, les photosensibilisateurs se présentaient sous les formes suivantes:

- 1) Des extraits aqueux de plantes ;
- 2) Des extraits alcaloïdiques ;
- 3) Des huiles essentielles ;
- 4) Une molécule chimiquement pure libre en solution dans l'eau ;

- 5) Cette même molécule fixée sur un premier support solide, le polystyrène A ;
- 6) Toujours cette même molécule fixée sur un second support, le polystyrène B.

Cette succession de formes variées n'a pas facilité la mise en cohérence des tests réalisés. Le comportement du photosensibilisateur est-il finalement identique quelque soit sa forme ? Le fait de se trouver en milieu complexe, en accompagnement de nombreuses autres molécules qui pourraient éventuellement contrarier ou au contraire amplifier le phénomène de photosensibilisation, ne risque-t-il pas de perturber les performances en matière de désinfection ? Si les extraits ont fait l'objet d'une analyse grossière ne permettant pas l'identification précise du photosensibilisateur, le traitement de l'huile essentielle de *Citrus bergamia* en spectrométrie de masse a bien révélé toute la complexité chimique de ce produit (voir la figure 7.1.).

Dès l'instant où nous nous sommes intéressés à une seule molécule chimiquement pure, ce problème aurait pu être résolu mais nous avons testé celle-ci sous trois formes différentes, comme précisé ci-dessus. Rappelons que le passage d'une forme de photosensibilisateur à l'autre se justifiait en termes de performances désinfectantes et de facilité d'application concrète.

A cette réflexion d'ordre qualitatif, il convient de mettre en exergue l'aspect quantitatif étant confronté à des unités de mesure différentes: ml d'extrait, ml d'huile essentielle, mg de molécule libre, mg de molécule fixé sur un support solide. Et pour rendre les choses encore plus complexes, nous n'avons pas pu utiliser les mêmes concentrations d'un test à l'autre, étant donné que le photosensibilisateur était utilisé sous forme liquide, poudre ou film. Le choix de la diminution de concentration des extraits de plantes aux huiles essentielles était motivé par le souci d'opérer avec une faible concentration. En ce qui concerne le MOP-5 fixé sur le polystyrène, la difficulté provenait du fait que l'un se présente sous forme de film et l'autre de poudre.

Ces variations qualitatives et quantitatives des photosensibilisateurs testés ne permettent pas une étude comparative car finalement, il est difficile de préciser la forme la plus performante (voir tableau 10.1.). Mais avons-nous le choix ? Nous aurions pu limiter notre travail aux seuls extraits de plantes ou aux seules huiles essentielles mais le caractère pragmatique de notre recherche nous obligeait à essayer de produire une forme solide de photosensibilisateur. Et dans ce sens, il est sans doute plus réaliste de fixer sur un support une molécule chimiquement pure qu'un cocktail de diverses molécules.

Cette limite à notre recherche ouvre la voie vers de nouvelles perspectives de mise en cohérence des photosensibilisateurs utilisés.

Photosensibilisateur	Concentration	Type de lumière	Temps d'exposition	Eau utilisée	Indicateur de contamination fécale	Rendement désinfectant
Extraits de plantes						
Extrait aqueux	2 ml / litre	Soleil	60 minutes	Université de Kinshasa / Home XXX	Coliformes fécaux	Etude qualitative (test positif)
Extrait non alcaloïdiques	2 ml / litre	Soleil	60 minutes	Université de Kinshasa / Home XXX	Coliformes fécaux	Etude qualitative (test positif)
Huiles essentielles						
<i>Citrus limonum</i>	1ml / litre	Soleil	120 minutes	Rivière Mandebbras	Coliformes fécaux	4 log / 100ml
<i>Citrus reticulata</i>	1 ml / litre	Soleil	120 minutes	Rivière Mandebbras	Coliformes fécaux	4 log / 100 ml
<i>Citrus bergamia</i>	1 ml / litre	Soleil	60 minutes	Rivière Mandebbras	Coliformes fécaux	4 log / 100 ml
<i>Citrus bergamia</i>	1 ml / litre	UV	60 minutes	Rivière Semois	Coliformes fécaux	4 log / 100 ml
	1 ml / litre	UV	30 minutes	Rivière Semois	Entérocoques fécaux	3 log / 100ml
MOP-5 libre						
MOP-5	0,006 g / litre	UV	60 minutes	Rivière Semois	Coliformes fécaux	4 log / 100 ml
		UV	5 minutes	Rivière Semois	Entérocoques fécaux	3 log / 100ml
MOP-5	0,20 g / litre	UV	60 minutes	Rivière Semois	Coliformes fécaux	4 log / 100 ml
		UV	5 minutes	Rivière Semois	Entérocoques fécaux	3 log / 100ml
MOP-5	0,340 g / litre	UV	60 minutes	Rivière Semois	Coliformes fécaux	4 log / 100 ml
		UV	5 minutes	Rivière Semois	Entérocoques fécaux	3 log / 100ml
MOP-5 fixé						
MOP-5-P-A	0,9 mg / litre	UV	45 minutes	Rivière Semois	Coliformes fécaux	4 log / 100 ml
MOP-5-P-B	5,88 mg / litre	UV	6 minutes	Rivière Semois	Coliformes fécaux	4 log / 100 ml
			2 minutes	Rivière Semois	Entérocoques fécaux	3 log / 100 ml

Tableau 10.1.: Synthèse des résultats obtenus en fonction des différentes conditions d'expérimentation.

2.2. La lumière

Les deux premières études (désinfection de l'eau par photosensibilisation avec les extraits de plantes et les huiles essentielles) ont été réalisées en utilisant le soleil comme source d'énergie. Il sied de signaler que la première fut réalisée à Kinshasa et la seconde en Belgique. Ce changement de cadre étant dicté par l'endroit où devait s'effectuer les analyses, conformément à notre chronogramme de recherche. Mais nous nous sommes vite rendu compte qu'il était difficile d'évoluer dans ces conditions étant donné que l'intensité lumineuse du soleil est sujette à des variations climatiques et saisonnières. Ces fluctuations ne permettent pas de reproduire à chaque fois les mêmes conditions d'analyses. C'est dans ce cadre que nous avons utilisé par la suite une lampe ultraviolette, afin de standardiser les conditions d'analyses, principalement l'intensité lumineuse.

2.3. Analyses bactériologiques

2.3.1. Eau utilisée

Plutôt que de reconstituer une eau contaminée à partir d'une même suspension d'indicateur de contamination fécale, nous avons préféré nous rapprocher de conditions réelles en utilisant des eaux naturellement polluées: eau de Kinshasa et eau de la Semois à Arlon.

Le choix géographique (Kinshasa ou Arlon) était dicté par l'endroit où s'effectuaient les travaux de recherche, chaque année comprenant une période de travaux à Kinshasa, une autre période à Arlon.

2.3.2. Milieux de culture

A côté de cela, il faut signaler que les analyses bactériologiques ont été, dans un premier temps, réalisées dans un milieu liquide. Ceci pour raison de cohérence à la première étude qui fut réalisée sur les extraits de plantes par Taba K.M. et Luwenga (1999). Par la suite, le milieu solide a été utilisé. Le passage de l'un à l'autre était motivé par le souci de réaliser un comptage quantitatif, lequel n'était pas possible en milieu liquide. Ceci a finalement rendu difficile la comparaison des résultats entre les extraits de plantes et les autres produits mis au point dans la suite de la recherche (voir tableau 10.1.).

3. Le greffage de MOP-5 et la conservation de son pouvoir photosensibilisateur

Il s'agit assurément d'une des originalités de cette thèse. Selon une recherche bibliographique fouillée, nous n'avons pas identifié de communication portant sur ce processus. Il s'agirait donc d'une première. La technique d'acylation de Friedel-Craft a été employée pour le greffage du méthoxy-5 psoralène. Si l'acylation de Friedel-Craft est bien connue, le greffage du MOP-5 sur un support solide par cette réaction constituerait une contribution originale. La réaction se déroule avec conservation de l'activité de MOP-5. En plus, ce système peut être enlevé après la désinfection et être utilisé par la suite.

4. Application concrète des résultats obtenus

Nous rappellerons ici que l'accès à l'eau constitue un problème aigu dans la plupart des pays en voie de développement. Dans les milieux urbains, les systèmes de production d'eau ne sont généralement pas en mesure d'approvisionner régulièrement la population en eau potable. Quand celle-ci est desservie, sa qualité dans bien des cas laisse à désirer. Dans les milieux ruraux, le manque de systèmes de production d'eau pousse la population à s'approvisionner à partir de puits et de sources non protégées. Malheureusement, ceci peut conduire à des graves problèmes de santé publique. Il est signalé chaque année 2,2 millions de morts suite à des maladies d'origine hydrique (Meierhofer R. et Wegelin M., 2002). Dans ce contexte, des initiatives tendant à encourager des techniques de la désinfection de l'eau au niveau domestique devraient être encouragées. Rappelons que les méthodes de désinfection utilisées couramment au niveau domestique sont les suivantes: la chloration, l'ozonation, les lampes germicides et la désinfection solaire. La désinfection solaire est préférée à toutes ces méthodes. Or, celle-ci est tributaire des conditions climatiques. Mais elle peut être améliorée par la photosensibilisation. C'est dans ce cadre que la présente étude a été réalisée.

En guise de rappel, la désinfection de l'eau par le solaire est basée sur l'action combinée de l'UVA et de l'Infra-rouge. Celle-ci consiste à exposer l'eau à traiter au soleil pendant six heures si le ciel est complètement dégagé. La durée d'exposition passe de six heures à 48 heures si le ciel est nuageux. Il est signalé des abattements de l'ordre de 4 à 5 unités logarithmiques / 100 ml (voir figure 10.1.). En outre, il est noté de temps en temps la réactivation des microorganismes (Amin M. et Han M., 2009).

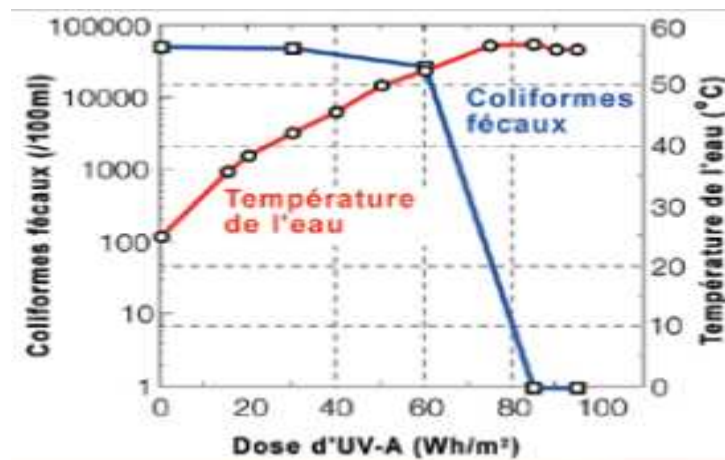


Figure 10.1.: Inhibition des coliformes fécaux en fonction de la dose utilisée (Meierhofer R. et Wegelin M., 2002).

Comparativement à notre travail, nous avons remarqué ce qui suit:

Les extraits aqueux et alcaloïdiques de plantes permettent de réduire ce temps de six heures à une heure d'ensoleillement. Quant aux huiles essentielles, celles-ci permettent de réduire ce temps à une heure pour l'huile de *Citrus bergamia* et deux heures pour celles de *Citrus limonum* et *Citrus reticulata*. En plus, la réactivation des microorganismes, remarquée de temps en temps après la désinfection solaire de l'eau, n'est pas observée lorsque l'huile essentielle de *Citrus bergamia* est utilisée. Avec le MOP-5 libre (en solution), l'inhibition complète est notée après 60 minutes. Ce temps passe à 45 minutes avec le MOP-5 fixé sur le polystyrène A et à 6 minutes pour le MOP-5 fixé sur le polystyrène B.

Bien que ces différents produits améliorent Sodis, il y a lieu de se poser quelques questions, notamment en ce qui concerne:

- La disponibilité de ces produits dans les pays en voie de développement (PED) ;
- Le coût de production ;
- Les contraintes techniques ;
- La stabilité.

Les plantes qui ont servi à la préparation des extraits et à l'extraction des huiles essentielles sont disponibles dans la plupart des pays en voie de développement (PED), en République Démocratique du Congo en particulier. Les extraits de plantes et les huiles essentielles peuvent donc être produits sur place. En ce qui concerne le MOP-5, sa disponibilité est limitée et son coût assez élevé pour le PED.

A la lumière de ce qui vient d'être évoqué précédemment, certains produits mis au point dans ce travail, notamment les huiles essentielles et les extraits de plantes, peuvent déjà être utilisés en remplacement aux méthodes de désinfection existantes, notamment l'ozonation et les lampes germicides dont les prix sont élevés pour les populations des pays en développement. Ceux-ci, étant disponibles sur place, peuvent aussi être utilisés en lieu et place du chlore dont l'accès n'est toujours pas facile. En ce qui concerne le MOP-5 immobilisé sur le polystyrène, malgré les bons résultats trouvés, celui-ci se trouve confronter principalement au problème de coût de production. En effet, 1 mg de MOP-5 coûte 0,399 Euros. Pour le système MOP-5-P-A, nous avons utilisé 0,9 mg de MOP-5 / litre, soit 0,36 Euros. Par contre, pour le système MOP-5-P-B, nous avons utilisé 5,88 mg de MOP-5 / litre (2,34 Euros). Mais ces prix peuvent sensiblement baisser en jouant sur la concentration des réactifs.

Notre recherche doit être considérée comme un travail exploratoire qui a bien mis en évidence la possibilité d'utiliser les extraits de plantes comme agents désinfectants. Mais les modalités pratiques d'application devraient être précisées par des travaux complémentaires.

5. Références bibliographiques

Amin M. et Han M. (2009) Roof-harvested rainwater for potable purpose: application of solar collector disinfection (Soco-dis), *Water research*, 43(20), p.5225-5235.

Meierhofer R. et Wegelin M. (2002). *Solar Water Disinfection: A guide for the application of Sodis* (cited 2007 June 18).

Taba K.M. et Luwenga E. (1999). L'effet de la photosensibilisation des extraits de plantes dans la désinfection de l'eau, *Med.Fac.Landbouww, Univ.Gent*, p.177-181.

CHAPITRE XI

CHAPITRE XI: CONCLUSION GENERALE ET PERSPECTIVES

La présente étude consacrée à la désinfection de l'eau par photosensibilisation avec les extraits de plantes avait pour objectif la recherche des plantes à activité photosensibilisatrice. A partir de ces plantes, il s'agissait d'identifier les composés et de préciser la structure de la (des) molécule(s) concernée(s). Pour des modalités pratiques d'application, il était aussi opportun de pouvoir fixer cette molécule sur un support solide.

Nous avons bien démontré l'efficacité des extraits de plantes en désinfection de l'eau, ces extraits pouvant être utilisés sous diverses formes : extraits aqueux, alcaloïdiques, non alcaloïdiques, huiles essentielles, molécule pure en solution dans l'eau et fixée. Nous avons en outre produit un photosensibilisateur greffé sur un support solide, tout en conservant son efficacité, la méthode de greffage ouvrant la voie à de nombreuses applications.

En effet, si l'utilisation des extraits de plantes est largement répandue dans la pharmacopée traditionnelle, il existe à ce jour peu d'études réalisées dans le cadre de la désinfection de l'eau par photosensibilisation. Nous avons pu démontrer à partir de ce travail que des plantes utilisées pour soigner certaines maladies de la peau peuvent aussi être utilisées comme agent photosensibilisant.

Dans un premier temps, l'étude de la désinfection de l'eau par photosensibilisation avec les extraits de feuilles *Cassia alata*, *Cassia occidentalis*, *Carica papaya*, *Coleus kilimanschari* et *phyllanthus niruri* a montré une inhibition complète des coliformes fécaux présents dans l'eau après une heure d'ensoleillement avec saturation du milieu en oxygène. Par contre les huiles essentielles extraites de plantes de la famille de Rutacées (*Citrus reticulata*, *Citrus limonum* et *Citrus bergamia*) ont montré une activité photosensibilisante intéressante sans saturation du milieu en oxygène : inhibition complète des coliformes fécaux après deux d'ensoleillement pour les huiles essentielles de *Citrus reticulata* et *Citrus limonum* et une heure pour celle de *Citrus bergamia*.

L'huile essentielle de *Citrus bergamia* analysée en spectrométrie de masse a révélé la présence de méthoxy-5 psoralène, principale molécule responsable de l'activité photosensibilisante. La suite du travail s'est focalisée sur cette molécule. Utilisée en solution dans l'eau à désinfecter, elle permettait une inhibition des coliformes fécaux après 60 minutes d'irradiation, les entérocoques fécaux étant complètement inhibés après 5 minutes d'irradiation. Ces huiles essentielles, étant disponibles dans la plupart des pays en développement, peuvent être utilisées dans la désinfection de l'eau pour l'amélioration de la désinfection solaire avec pour avantage la réduction du temps d'ensoleillement.

La fixation du MOP-5 sur support solide (polystyrène) a été réalisée par la réaction d'acylation de Friedel Craft et a conduit à un produit facilement récupérable après la désinfection. De plus le produit une fois régénéré conserve ses propriétés photosensibilisantes après fixation. La fixation offre aussi l'avantage de pouvoir récupérer le MOP-5 fixé sur le polystyrène après la désinfection de l'eau et être utilisé par la suite. L'inhibition des coliformes fécaux et entérocoques fécaux a été notée respectivement après 6 et 2 minutes d'irradiation avec des abattements de 4 unités logarithmiques.

Notre recherche doit être considérée comme un premier travail exploratoire qui ouvre la voie vers un nouveau processus de désinfection de l'eau par photosensibilisation à partir d'extraits de plantes mais l'application concrète de ce procédé se trouve à ce jour confrontée à de nombreuses difficultés, notamment la quantité des composés à utiliser, le coût de production et de désinfection, et la stabilité du système à long terme. Dans ce sens, il conviendra de préciser les modalités pratiques d'application après avoir confirmé les potentialités offertes par les divers composés testés.

A partir des apports de ce travail, il conviendrait donc d'étudier la faisabilité opérationnelle pour rendre le système à la fois performant et acceptable d'un point de vue économique notamment à l'intention des populations des pays en développement. Mais auparavant, des études complémentaires seront nécessaires :

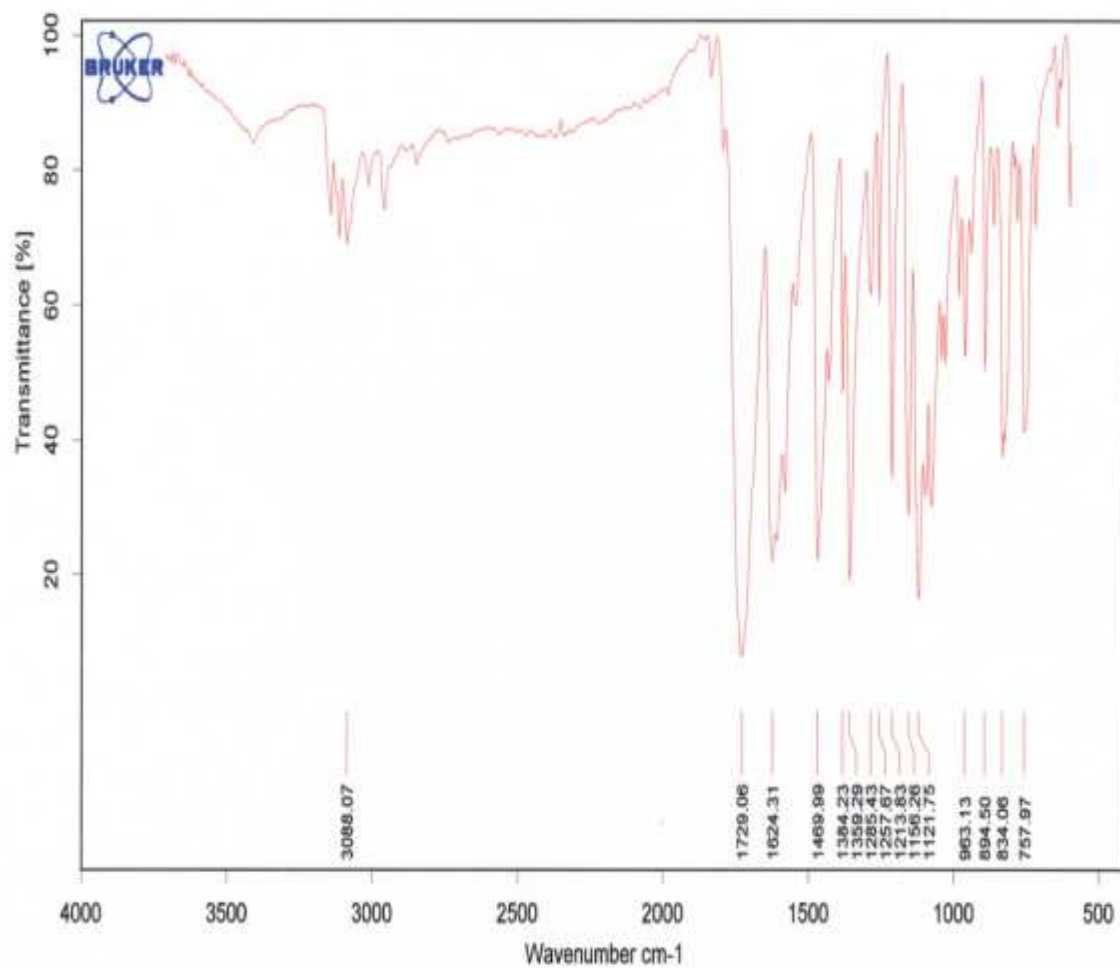
- Les premiers résultats obtenus dans notre travail devront être complétés par de nombreux tests de reproductibilité. La stabilité du système MOP-5 / Polystyrène devra être confirmée par des répétitions d'opérations de désinfection de l'eau avec le même produit, celui-ci étant récupéré et régénéré entre chaque utilisation ;
- Le processus de régénération appliqué dans notre travail devra être mieux compris et l'utilisation d'autres supports que le polystyrène, notamment des matériaux inorganiques ou naturels, mérite d'être explorée ;
- Seuls deux indicateurs de contamination fécale, les coliformes fécaux et les enterocoques fécaux, ont été retenus dans notre étude. Ne serait-il pas opportun de tester l'efficacité du dispositif vis-à-vis d'autres indicateurs bactériens tels les *Clostridium perfringens* ? Et vis-à-vis des virus ou des kystes de protozoaires, on peut aussi se demander si l'effet photosensibilisateur de notre dispositif se manifeste toujours efficacement ?
- D'autres familles de plantes utilisées dans la pharmacopée traditionnelle pour soigner les infections microbiennes et parasitaires auraient pu être utilisées dans ce travail. La recherche s'orientera vers celles dont l'activité photosensibilisatrice n'exige pas la saturation du milieu en oxygène ;
- Au sein de la famille des Rutacées, d'autres espèces de *Citrus*, notamment *Citrus aurantifolia*, *Citrus grandis*, *Citrus aurantium*, *Citrus sinensis*, *Citrus paradisi*,...méritent aussi d'être étudiées pas seulement en utilisant des zestes de fruits mais également les feuilles et les racines. Les autres méthodes d'extraction qui se prêtent bien à l'extraction des huiles essentielles au niveau domestique, notamment l'expression à froid, peuvent aussi être exploitées pour faciliter l'utilisation de ces dernières, surtout dans les milieux ruraux

Enfin, les premiers résultats obtenus avec le MOP-5 fixé sur un support solide devraient permettre d'explorer la piste conduisant à offrir sur le marché un nouveau procédé de désinfection de l'eau par photosensibilisation. On peut imaginer le photosensibilisateur pouvant être greffé sur un filtre ou inclus dans une colonne de traitement traversé par l'eau à désinfecter. Pourquoi ne pas envisager de greffer le photosensibilisateur à la surface d'un récipient où l'eau serait exposée à la lumière pendant un certain temps avant consommation ?

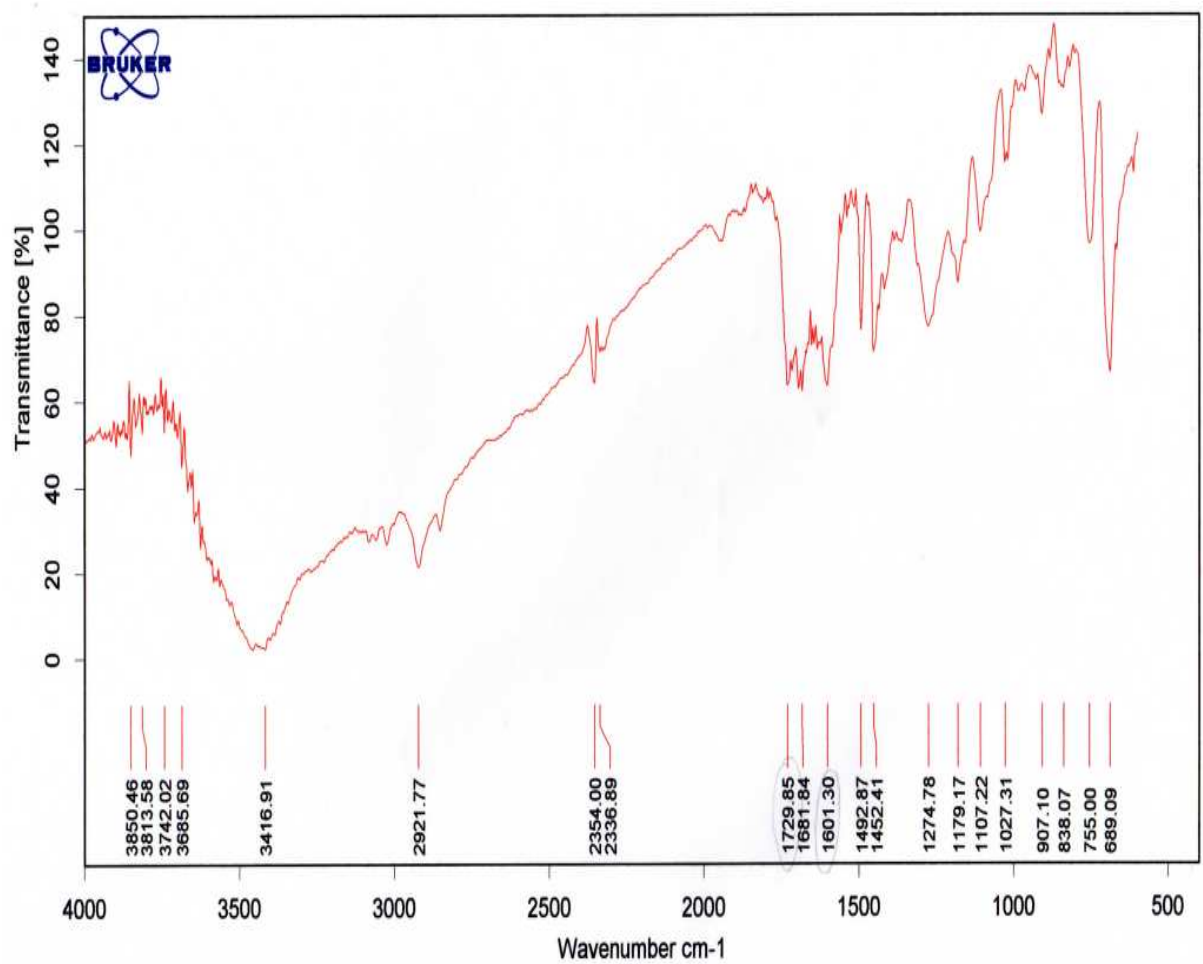
Le domaine de la photosensibilisation en application à la désinfection de l'eau offre de nombreuses perspectives de recherche pour de nombreuses années, tant dans l'amélioration de la compréhension des phénomènes observés que dans des mises au point opérationnelles. Ce champ d'investigation est d'autant plus pertinent dans un monde où l'accès à l'eau potable

restera une priorité pour un meilleur développement des populations, particulièrement, les habitants des pays en développement toujours confrontés à ces difficultés de disposer d'une eau de bonne qualité. C'est dans ce contexte que se situe la présente contribution.

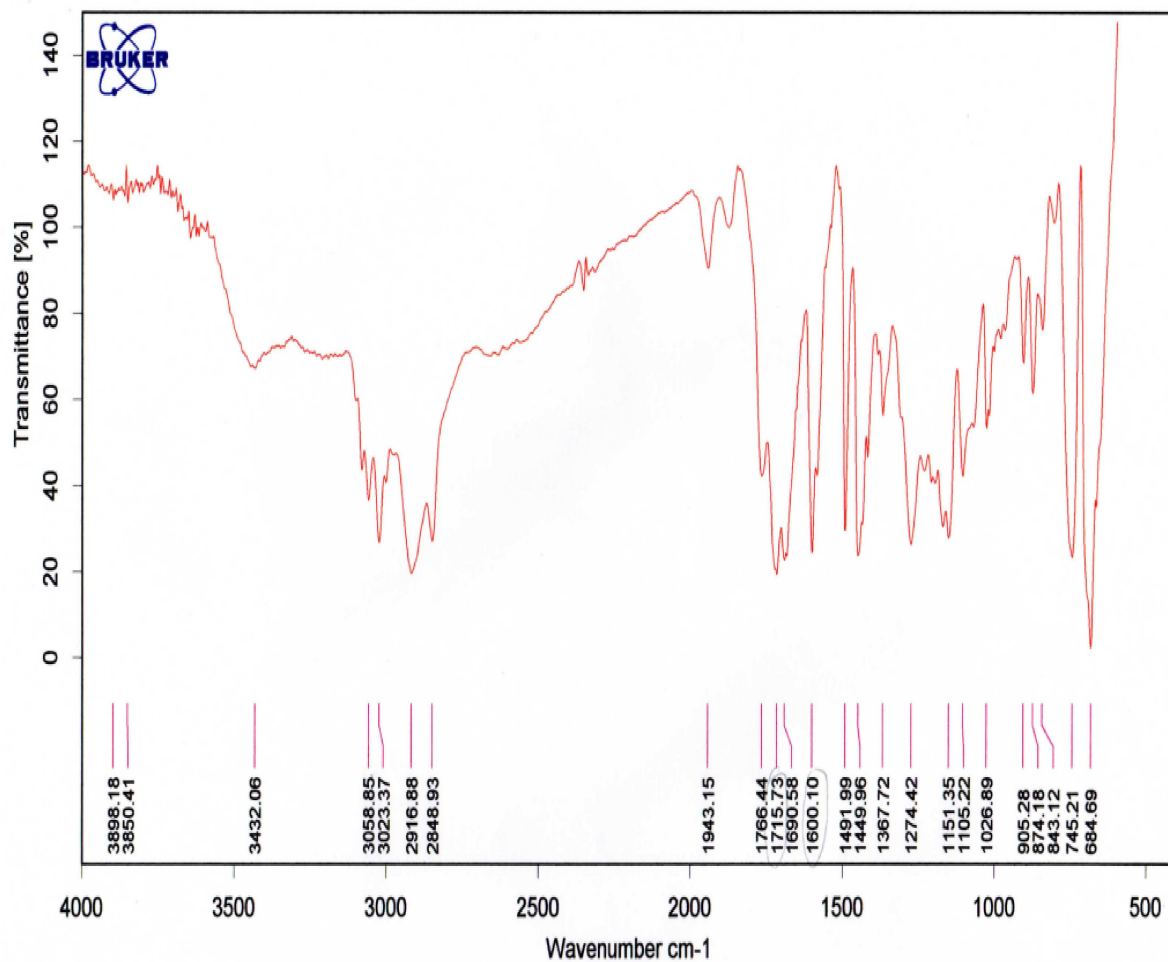
ANNEXE: SPECTRES INFRA ROUGE



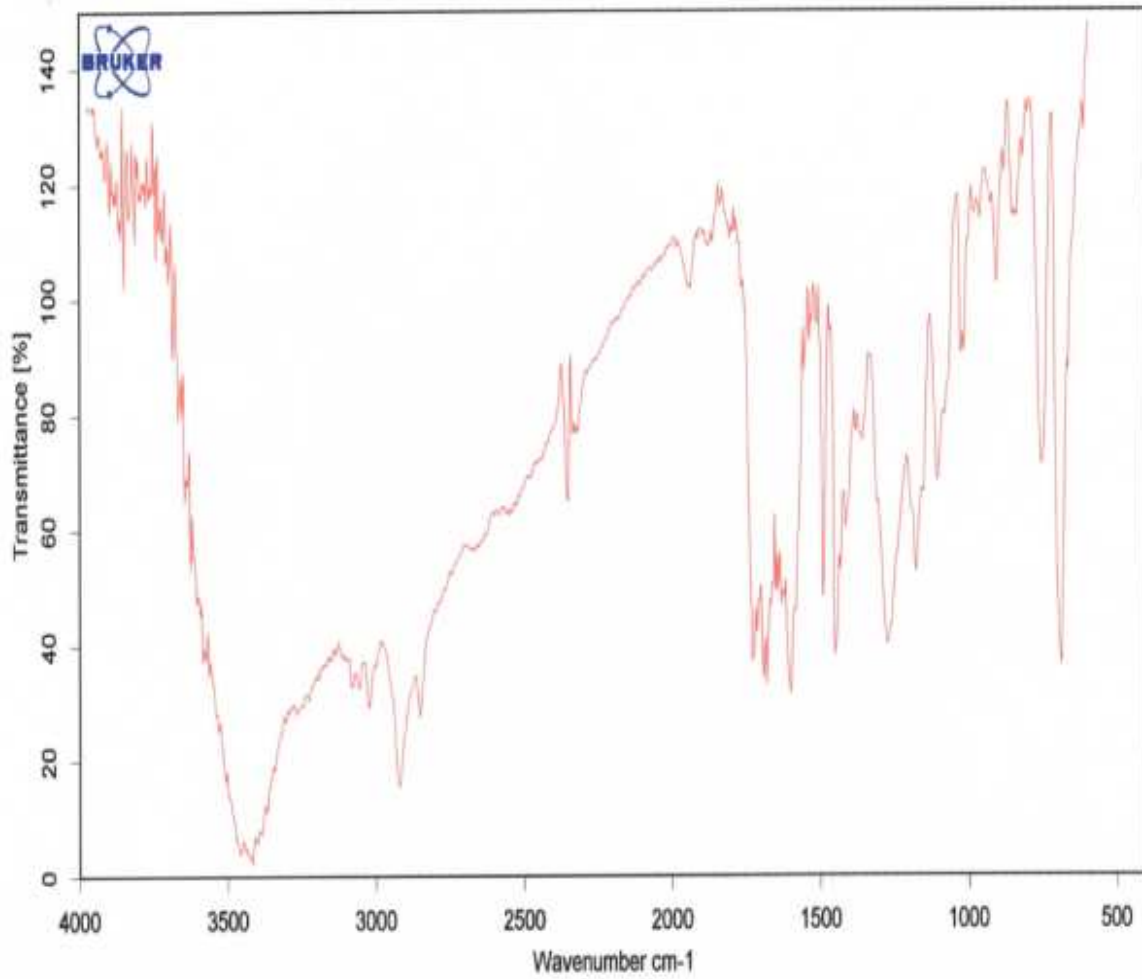
Spectre Infra rouge de Méthoxy-5 psoralène.



Spectre infra rouge de Méthoxy-5 psoralène fixé sur le polystyrène A.



Spectre infra rouge du polystyrène A.



Spectre Infra rouge de Méthoxy-5 psoralène fixé sur polystyrène A.