



**HAL**  
open science

# Les Hydroxydes Doubles Lamellaires au coeur de la biotechnologie : évaluation des applications médicales et environnementales

Mohamed Amine Djebbi

## ► To cite this version:

Mohamed Amine Djebbi. Les Hydroxydes Doubles Lamellaires au coeur de la biotechnologie : évaluation des applications médicales et environnementales. Matériaux. Université de Lyon; Faculté des sciences de Bizerte (Tunisie), 2017. Français. NNT : 2017LYSE1049 . tel-01561581

**HAL Id: tel-01561581**

**<https://theses.hal.science/tel-01561581>**

Submitted on 13 Jul 2017

**HAL** is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.



Université Claude Bernard Lyon 1



N°d'ordre NNT : 2017LYSE1049

## THESE DE DOCTORAT DE L'UNIVERSITE DE LYON

opérée au sein de  
**Université Claude Bernard**  
en partenariat international avec  
**Université de Carthage, Faculté des Sciences de Bizerte**

**Ecole Doctorale 206**  
**Ecole Doctorale Chimie**

**Discipline de doctorat** : Physique  
**Spécialité** : Science des Matériaux

Soutenue publiquement le 27 mars 2017, par :  
**DJEBBI Mohamed Amine**

---

# Les Hydroxydes Doubles Lamellaires au cœur de la biotechnologie

*Evaluation des applications médicales et environnementales*

---

Devant le jury composé de :

<b>BEN RHAIEM</b> Hafsia	<b>Professeure</b>	Faculté des Sciences de Bizerte, Université de Carthage (Tunisie)	<b>Présidente</b>
<b>CHTOUROU</b> Radhouane	<b>Professeur</b>	Centre des Recherches et des Technologies de l'Energie (Tunisie)	<b>Rapporteur</b>
<b>BEHRA</b> Philippe	<b>Professeur des universités</b>	Institut National Polytechnique de Toulouse (France)	<b>Rapporteur</b>
<b>BEN HAJ AMARA</b> Abdesslem	<b>Professeur</b>	Faculté des Sciences de Bizerte, Université de Carthage (Tunisie)	<b>Directeur de thèse</b>
<b>NAMOUR</b> Philippe	<b>Ingénieur</b>	Irstea Lyon-Villeurbanne (France)	<b>Directeur de thèse</b>
<b>SAULNIER</b> Joëlle	<b>Maître de Conférences</b>	Institut des Sciences Analytiques de Lyon (France)	<b>Examinatrice</b>

## UNIVERSITE CLAUDE BERNARD - LYON 1

Président de l'Université	M. le Professeur Frédéric FLEURY
Président du Conseil Académique	M. le Professeur Hamda BEN HADID
Vice-président du Conseil d'Administration	M. le Professeur Didier REVEL
Vice-président du Conseil Formation et Vie Universitaire	M. le Professeur Philippe CHEVALIER
Vice-président de la Commission Recherche	M. Fabrice VALLÉE
Directrice Générale des Services	Mme Dominique MARCHAND

### COMPOSANTES SANTE

Faculté de Médecine Lyon Est – Claude Bernard	Directeur : M. le Professeur G.RODE
Faculté de Médecine et de Maïeutique Lyon Sud – Charles Mérieux	Directeur : Mme la Professeure C. BURILLON
Faculté d'Odontologie	Directeur : M. le Professeur D. BOURGEOIS
Institut des Sciences Pharmaceutiques et Biologiques	Directeur : Mme la Professeure C. VINCIGUERRA
Institut des Sciences et Techniques de la Réadaptation	Directeur : M. X. PERROT
Département de formation et Centre de Recherche en Biologie Humaine	Directeur : Mme la Professeure A-M. SCHOTT

### COMPOSANTES ET DEPARTEMENTS DE SCIENCES ET TECHNOLOGIE

Faculté des Sciences et Technologies	Directeur : M. F. DE MARCHI
Département Biologie	Directeur : M. le Professeur F. THEVENARD
Département Chimie Biochimie	Directeur : Mme C. FELIX
Département GEP	Directeur : M. Hassan HAMMOURI
Département Informatique	Directeur : M. le Professeur S. AKKOUCHE
Département Mathématiques	Directeur : M. le Professeur G. TOMANOV
Département Mécanique	Directeur : M. le Professeur H. BEN HADID
Département Physique	Directeur : M. le Professeur J-C PLENET
UFR Sciences et Techniques des Activités Physiques et Sportives	Directeur : M. Y.VANPOULLE
Observatoire des Sciences de l'Univers de Lyon	Directeur : M. B. GUIDERDONI
Polytech Lyon	Directeur : M. le Professeur E.PERRIN
Ecole Supérieure de Chimie Physique Electronique	Directeur : M. G. PIGNAULT
Institut Universitaire de Technologie de Lyon1	Directeur : M. le Professeur C. VITON
Ecole Supérieure du Professorat et de l'Education	Directeur : M. le Professeur A. MOUGNIOTTE
Institut de Science Financière et d'Assurances	Directeur : M. N. LEBOISNE

## *Remerciements*

Cette thèse est une collaboration entre l'Institut des Sciences Analytiques (ISA) de Lyon et le Laboratoire des Matériaux Lamellaires et Nano-Matériaux Hybrides (LMLNMH) de la Faculté des Sciences de Bizerte. Les résultats des recherches présentés dans ce mémoire sont les fruits obtenus durant ces années de thèse grâce à des contributions techniques et scientifiques précieuses de la part de plusieurs personnes et instituts. Je voudrais leur témoigner toute ma gratitude et ma reconnaissance.

Tout d'abord, je remercie Mme **Nicole JAFFREZIC-RENAULT**, directrice de recherche émérite auprès du CNRS et Mme **Hafsia BEN RHALEM**, directrice du laboratoire (LMLNMH) et professeure à la Faculté des Sciences de Bizerte, pour m'avoir accueilli au sein de leur équipe et permis de réaliser mes études.

Je remercie Mr **Philippe BEHRA**, professeur des universités à l'Institut National Polytechnique de Toulouse (INPT-ENSIACET-Laboratoire de chimie agro-industrielle, LCA) et Mr **Radhouane CHTOUROU**, directeur de recherche au Centre de Recherche et de Technologie de l'Energie de Borj Cedria (Laboratoire des Nanomatériaux et des Systèmes des Energies Renouvelables, LNSER), Tunisie, pour avoir tous deux accepté d'être rapporteurs de ce manuscrit ainsi que Mme **Hafsia BEN RHALEM** une fois encore pour avoir présidé mon jury de soutenance.

Je tiens à remercier également Mme **Joëlle SAULNIER**, maître de conférences auprès de l'Université Claude Bernard Lyon 1 pour avoir accepté d'examiner et de juger ce travail.

Mes remerciements chaleureux iront aussi à mes directeurs de thèse, Mr **Philippe NAMOUR**, ingénieur de recherche à l'ISA et Mr **Abdesslem BEN HAJ AMARA**, professeur à la Faculté des Sciences de Bizerte. Je tiens à leur transmettre toute ma gratitude pour leur disponibilité et leur aide précieuse tout au long de ce travail de thèse.

Je voudrais aussi remercier, Mme **Soumya ELABED** et Mr **Saad IBNSOUDA KORAICHI**, les directeurs du Laboratoire de Biotechnologie Microbienne (LBM), Faculté des Sciences et Techniques de Fès, Université Sidi Mohamed Ben Abdellah, Maroc, de m'avoir permis de réaliser les analyses microbiologiques au sein de leur laboratoire.

Je remercie vivement Mme **Martiane CABIE**, ingénieure de recherche du Centre Pluridisciplinaire de Microscopie Electronique et de Microanalyse (CP2M), Université d'Aix Marseille, pour m'avoir aidé avec les analyses microscopiques.

Un gros merci, tout spécial, s'adresse à Mlle **Aisha GHARSALLI** du LECOM School of Dental Medicine, Etats Unis, pour son implication dans mes recherches et pour m'avoir offert l'assistance linguistique nécessaire à publier ce travail.



*J*e n'oublierai pas de remercier aussi mes amis : **Mohamed BRAIEK, Zaineb BOUAZIZ, Mohamed Slim ELAYACHI, Alae ELABED et Moulay SADIKI** qui ont participé de manière constructive à la réalisation de ce travail.

*A* tous ceux qui font vivre le laboratoire et qui m'ont apporté un sourire, une aide, un regard, une attention.

*E*n dernier lieu, je tiens à exprimer toute ma gratitude à ma famille qui m'a toujours soutenu tout au long de cette période.

# Liste des abréviations

<b>A<sup>n-</sup></b> : Anion intercalé	<b>HPLC</b> : Chromatographie Liquide Haute Performance
<b>ABTS</b> : 3-éthylbenzothiazoline-6-sulphonique	<b>HRP</b> : Peroxydase de Raifort
<b>ADN</b> : Acide Désoxyribonucléique	<b>HT</b> : Hydrotalcite
<b>AIP</b> : Alcaline Phosphatase	<b>IR</b> : Spectroscopie Infrarouge
<b>AQS</b> : Anthraquinone Sulfonate	<b>L</b> : Type L d'isotherme
<b><i>B. subtilis</i></b> : <i>Bacillus subtilis</i>	<b>I</b> : Phase liquide
<b>BBR</b> : Chlorure de Berbérine	<b>LDH</b> : Lactate Déshydrogénase
<b>BET</b> : Modèle BET de Brunauer-Emmett-Teller	<b>M<sup>II</sup></b> : Cation métallique divalent
<b>BMAE</b> : BBR–MgAl–Echangée	<b>M<sup>III</sup></b> : Cation métallique trivalent
<b>BMAC</b> : BBR–MgAl–Co-précipitée	<b>MEB</b> : Microscope Electronique à Balayage
<b>BZAC</b> : BBR–ZnAl–Co-précipitée	<b>MET</b> : Microscopie Electronique à Transmission
<b>C</b> : Type C d'isotherme	<b>NAD<sup>+</sup></b> : Nicotinamide Adénine Dinucléotide en forme oxydée
<b>CA</b> : Chronoampérométrie	<b>NADH</b> : Nicotinamide Adénine Dinucléotide en forme réduite
<b>CholOx</b> : Cholestérol Oxydase	<b>NiR</b> : Nitrite Réductase
<b>CoOx</b> : Choline Oxydase	<b>OMS</b> : Organisation Mondiale de la Santé
<b>CPE</b> : Constante de Phase	<b>PBS</b> : Tampon Phosphate Saline
<b>CV</b> : Constante de Variation	<b>PCM</b> : Pile à Combustible Microbienne
<b>DM</b> : Diiodométhane	<b>PPO</b> : Polyphénol Oxydase
<b>DRX</b> : Diffraction des Rayons X	<b><i>P. aeruginosa</i></b> : <i>Pseudomonas aeruginosa</i>
<b>E</b> : Eau	<b>S</b> : Type S d'isotherme
<b>ECS</b> : Electrode au Calomel Saturé	<b>s</b> : Phase solide
<b>F</b> : Formamide	<b><i>S. aureus</i></b> : <i>Staphylococcus aureus</i>
<b>FcCO<sub>2</sub></b> : Ferrocénecarboxylate	<b>SDS</b> : Dodécylsulfate de Sodium
<b>FcPSO<sub>3</sub></b> : (3-sulfopropyl) ferrocénecarboxylate	<b>SIE</b> : Spectroscopie d'Impédance Electrochimique
<b>FcSO<sub>3</sub></b> : Ferrocènesulfonate	<b>UV-vis</b> : Spectrophotométrie UV-visible
<b>GOx</b> : Glucose Oxydase	<b>VC</b> : Voltammétrie Cyclique
<b>H</b> : Type H d'isotherme	
<b>Hb</b> : Hémoglobine	
<b>HDL</b> : Hydroxyde Double Lamellaire	

# *Liste des paramètres*

<b>A</b> : Absorbance	<b>L</b> : Constante d'affinité (Langmuir)
<b>a</b> : Paramètre de maille	<b>l</b> : Longueur du segment lumineux
<b>C</b> : Concentration	<b>m</b> : masse
<b>C<sub>e</sub></b> : Concentration à l'équilibre	<b>n</b> : Affinité adsorbat/adsorbant
<b>C<sub>i</sub></b> : Concentration initiale de solution	<b>P</b> : Puissance
<b>C<sub>m</sub></b> : Capacité d'adsorption maximale (Langmuir)	<b>[S]</b> : Concentration de Substrat
<b>C<sub>s</sub></b> : Quantité adsorbée	<b>Q</b> : Rapport massique
<b>C<sub>0</sub></b> : Quantité de BBR à $t = 0$	<b>Q<sub>th</sub></b> : Rapport massique théorique
<b>C<sub>t</sub></b> : Quantité de BBR libérée à $t$	<b>Q<sub>exp</sub></b> : Rapport massique expérimental
<b>c</b> : Paramètre de maille	<b>R</b> : Rapport molaire
<b>D</b> : Taille des cristallites	<b>R<sub>CT</sub></b> : Résistance de transfert de charge
<b>d</b> : Distance interlamellaire	<b>R<sub>s</sub></b> : Résistance ohmique
<b>E<sub>p,a</sub></b> : Potentiel anodique	<b>R<sup>2</sup></b> : Coefficient de détermination
<b>E<sub>p,c</sub></b> : Potentiel cathodique	<b>T</b> : Température
<b>ΔE<sub>p,a</sub></b> : Variation du potentiel anodique	<b>t</b> : Temps
<b>ΔE<sub>p,c</sub></b> : Variation du potentiel cathodique	<b>U</b> : Tension
<b>I</b> : intensité de la lumière transmise	<b>V</b> : Volume
<b>I<sub>0</sub></b> : Intensité de la lumière incidente	<b>V<sub>max</sub></b> : Vitesse maximale de réaction
<b>I<sub>p,a</sub></b> : Intensité du courant anodique	<b>W<sub>s</sub></b> : Energie de propagation d'eau
<b>I<sub>p,c</sub></b> : Intensité du courant cathodique	<b>W<sub>a</sub></b> : Energie d'adhésion
<b>i</b> : Courant	<b>x</b> : Taux de substitution ou densité de charge
<b>K<sub>f</sub></b> : Capacité d'adsorption maximale (Freundlich)	<b>Z<sub>im</sub></b> : Impédance imaginaire
<b>K<sub>M</sub></b> : Constante de Michaelis	<b>Z<sub>re</sub></b> : Impédance réelle
<b>k</b> : Constante de Scherrer	<b>Z<sub>w</sub></b> : Impédance de Warburg

# *Lettres grecques*

$\beta$  : Largeur à mi-hauteur de la ligne de diffraction

$\epsilon$  : Absorption molaire

$\theta$  : Angle de Bragg

$\theta'$  : Angle de contact du liquide avec le substrat

$\lambda$  : Longueur d'onde

$\delta$  : Bande de déformation

$\nu$  : Bande d'élongation

$\gamma^{\text{TOT}}$  : Energie de surface

$\gamma^{\text{LW}}$  : Composante apolaire de Lifshitz-Van Der Waals

$\gamma^{\text{AB}}$  : Composante polaire acide-base

$\gamma^-$  : Interaction donneur d'électron

$\gamma^+$  : Interaction accepteur d'électron

# *Sommaire Général*

<b>PREAMBULE .....</b>	<b>1</b>
<b>CHAPITRE 1 : HYDROXYDE DOUBLE LAMELLAIRE (HDL)... ETAT DE L'ART .....</b>	<b>4</b>
<b>CHAPITRE 2 : MATERIAUX ET METHODES D'ETUDES.....</b>	<b>24</b>
<b>CHAPITRE 3 : MATERIAUX BIOINORGANIQUE HYDROXYDE DOUBLE LAMELLAIRE – ENZYMES : SYNTHÈSE, CARACTERISATION ET ACTIVITÉ CATALYTIQUE.....</b>	<b>43</b>
<b>CHAPITRE 4 : PREPARATION ET OPTIMISATION D'UN NOUVEAU MATERIAU HYBRIDE BERBERINE – HYDROXYDE DOUBLE LAMELLAIRE EN TANT QUE SYSTÈME DE LIBERATION CONTROLÉÉ .....</b>	<b>63</b>
<b>CHAPITRE 5 : CONTRIBUTION DES HYDROXYDES DOUBLES LAMELLAIRES A L'ELABORATION DE MATERIAUX D'ELECTRODES : VERS UNE NOUVELLE GENERATION DE SOURCE D'ENERGIE ELECTROCHIMIQUE .....</b>	<b>95</b>
<b>CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES .....</b>	<b>117</b>
<b>REFERENCES .....</b>	<b>119</b>
<b>ANNEXE .....</b>	<b>131</b>

Une grande attention a été portée sur les minéraux argileux depuis les premiers jours de la civilisation en raison de leur abondance dans la nature et de leurs potentiels infinis (Theng, 1974 ; Reichle, 1986 ; Cavani et al., 1991 ; Ogawa et Kuroda, 1995 ; Kim et al., 1998 ; Vaccari, 1998). En particulier, l'utilisation de minéraux argileux à des fins protecteurs est aussi vieux que l'humanité elle-même (Robertson, 1996 ; Carretero, 2002 ; Veniale et al., 2004). En revanche, les recherches s'intéressant aux matériaux argileux et à leurs propriétés électrochimiques pour des applications dans le domaine de la production ou du stockage de l'énergie se sont développées ces dernières années.

Les HDL sont une classe d'argiles anioniques synthétiques (Duan et Evans, 2006), dont la structure est basée sur celle de la brucite  $Mg(OH)_2$ , dans lesquelles une partie des cations métalliques divalents ont été remplacés par des ions trivalents donnant ainsi des feuillets chargés positivement. Cette charge est équilibrée par l'intercalation d'anions dans la région interlamellaire hydratée. Les natures et les rapports des cations di- et trivalents et l'anion interlamellaire peuvent être variés sur une large gamme, donnant lieu à une large classe de matériaux isostructuraux. Le matériau d'origine de cette classe est l'hydrotalcite (HT) et les HDL sont par conséquent également connus comme des matériaux de type hydrotalcite. Bien que les caractéristiques de base de la structure soient bien comprises, des aspects structurels détaillés ont fait l'objet de certaine controverse dans la littérature afin de maîtriser leurs propriétés et leurs applications potentielles. Dans ce mémoire, divers aspects des applications de la chimie des hydroxydes doubles lamellaires (HDL) sont examinés, tels que la sorption des molécules d'intérêt biologique (enzyme et médicament) et l'élaboration d'électrodes.

**Le chapitre I** constitue un état de l'art des connaissances sur les HDL, avec en premier lieu, une introduction générale des phases HDL, définition et historique puis leur structure et variabilité chimique. Une description détaillée des différents procédés de synthèse couramment utilisés ainsi que les facteurs liés à la synthèse a également été présentée. Le large éventail de compositions possibles d'HDL implique que des matériaux doués d'une grande diversité de propriétés peuvent être produits. Une compréhension détaillée de la chimie structurale et morphologique des HDL ainsi de l'électrochimie devrait faciliter la conception des matériaux avec des propriétés spécifiquement adaptées à des applications spécifiques. Nous nous focaliserons sur les avancées récentes dans l'application des HDL, en particulier l'usage des HDL en tant que structure hôte pour des molécules d'origine biologique et comme matériaux d'électrodes.

**Le chapitre II** décrit les méthodes et les techniques utilisées pour la caractérisation de ces matériaux.

**Le chapitre III** décrit l'élaboration des biohybrides HDL–enzymes, réalisés dans des conditions de chimie douce afin de préserver la structure tertiaire des protéines et leur activité. La maîtrise des conditions d'obtention des phases minérales nous a permis de réaliser des matériaux hybrides reposant sur diverses associations HDL–lactate déshydrogénase.

Bien qu'un grand nombre de biomolécules d'intercalation d'HDL ait été préparé et caractérisé, il y a eu peu d'études de la cinétique et du mécanisme du processus d'intercalation. **Le chapitre III** s'intéresse aux procédés d'intercalation : adsorption ou échange anionique de l'enzyme lactate déshydrogénase dans le précurseur HDL, confinement par précipitation de la phase HDL en présence de la lactate déshydrogénase. Ces deux méthodes privilégient des confinements différents des protéines soit aux joints de grains ou en surface de cristallites soit entre les feuillettes avec un désordre structural plus ou moins développé. Une étude approfondie et comparative de ces procédés a été réalisée en vue de comprendre et de maîtriser la formation du matériau HDL/lactate déshydrogénase, de contrôler la quantité et l'activité de la lactate déshydrogénase immobilisée et de définir une matrice HDL–lactate déshydrogénase modèle.

**Le chapitre IV** présente les travaux de mise au point d'un premier type de matériau hybride : hydroxyde double lamellaire/berbérine. Ces études ont tout d'abord porté sur la formulation et la caractérisation de ces matériaux. Les matériaux biohybrides HDL–BBR sont obtenus soit par échange direct, adsorption ou par co-précipitation. La caractérisation de ces matériaux est réalisée principalement par : la diffraction de rayons X, la spectroscopie dans l'ultraviolet et l'infrarouge et la microscopie électronique, afin de contrôler la structure du matériau HDL modifié. Ces formulations biohybrides sont ensuite étudiées avec analyse en temps réel des courbes cinétiques de libération. La variation des conditions cinétiques a permis de comparer le comportement des matériaux selon la nature du mécanisme d'intercalation. Enfin, des études d'activité anti-bactérienne ont été effectuées afin d'évaluer la sensibilité des matériaux biohybrides HDL–BBR synthétisés sur trois souches bactériennes pathogènes.

**Le chapitre V** a été dédié à l'examen des propriétés électrochimiques des HDL en vue d'applications en tant que matériaux d'électrode dans les biopiles.

Ces dernières années, les publications concernant les matériaux HDL ont connu une croissance à la fois dans les revues académiques et dans la littérature portant sur les brevets. Ce travail de thèse prétend montrer les principales applications des HDL, afin d'être en

mesure de développer des solutions alternatives innovantes dans le secteur médical ainsi qu'environnemental.



# Hydroxyde Double Lamellaire (HDL)...Etat de l'art

1.1	<u>CONTEXTE</u> .....	5
1.2	<u>HYDROXYDE DOUBLE LAMELLAIRE (HDL)... DEFINITION ET HYSTORIQUE</u> .....	5
1.3	<u>STRUCTURE MODÉLE ET VARIABILITÉ CHIMIQUE</u> .....	6
1.3.1	<u>Composition chimique du feuillet</u> .....	9
1.3.1.1	<u>Nature des cations métalliques</u> .....	9
1.3.1.2	<u>Répartition des cations les feuillets HDL</u> .....	10
1.3.2	<u>Nature des anions interfoliaires</u> .....	11
1.4	<u>MODES DE PREPARATION DES HDL... PROPRIETES</u> .....	11
1.5	<u>ASPECTS IMPORTANT POUR LA SYNTHESE</u> .....	14
1.5.1	<u>Facteurs liées aux cations</u> .....	14
1.5.2	<u>Rôle de l'anion pour la stabilisation de la structure lamellaire</u> .....	14
1.5.3	<u>Vitesse d'addition</u> .....	15
1.5.4	<u>Aspects liés à la cristallisation</u> .....	15
1.6	<u>APPLICATIONS DES HDL</u> .....	15
1.6.1	<u>Les HDL: struture hôte pour les biomolécules</u> .....	16
1.6.1.1	<u>Immobilisation des enzymes</u> .....	16
1.6.1.2	<u>Administration des médicaments</u> .....	19
1.6.2	<u>Matériaux d'électrodes</u> .....	20
1.7	<u>CONCLUSION</u> .....	23

# Hydroxyde Double Lamellaire (HDL)...Etat de l'art

## 1.1. Contexte

Depuis quelques années, nous assistons à l'émergence de nouveaux matériaux dits « intelligents » synthétisés pour répondre à une demande de matériaux de plus en plus petits, possédant des propriétés multifonctionnelles, et très souvent orientés vers les biomatériaux mimant certains assemblages rencontrés dans le monde du vivant (Leroux et Besse, 2004). A titre d'exemple, nous pouvons citer les aérosols, les revêtements polymériques, les matériaux pour implant... Les deux aspects de cette recherche, tant en nanotechnologie qu'en biocompatibilité, s'appuient sur l'exaltation des propriétés de chacun des constituants par un effet de taille et/ou de confinement et sur les propriétés aux interfaces de ces matériaux. Dans ce thème de recherche, l'utilisation d'hydroxydes doubles lamellaires (HDL) comme matrice d'immobilisation ou catalyseur sur les électrodes de dispositifs électrochimiques inspirés d'une biopile (pile à combustible microbienne PCM) pourrait jouer un rôle de tout premier plan ; or, peu de travaux sont décrits jusqu'à présent dans ce domaine.

## 1.2. Hydroxyde double lamellaire (HDL)...définition et historique

Le vocable « hydroxyde double lamellaire » noté HDL a été largement utilisé depuis un certain nombre d'années et se réfère aux caractéristiques structurales. Il met en évidence la présence d'empilements alternés de feuillets plans d'octaèdre  $M(OH)_6$  incluant deux types de cations métalliques et d'espaces interfoliaires occupés par des anions hydratés. Ils sont aussi dénommés hydrotalcites ou argiles anioniques par analogie, dans le premier cas, avec le minéral naturel le plus connu de cette famille de composés et, dans le deuxième cas, avec les argiles naturelles contenant des cations dans l'espace interfoliaire.

Le premier solide de la famille des HDL, une poudre semblable au talc, a été décrite pour la première fois en 1842 par des scientifiques suédois (Cavani et al., 1991). Il a été identifié comme étant un hydroxycarbonate de magnésium et d'aluminium. La première formule exacte de l'hydrotalcite,  $[Mg_6Al_2(OH)_{16}]CO_3 \cdot 4H_2O$ , fut présentée en 1915 par E. Manasse, professeur de minéralogie à l'Université de Florence (Italie) (Manasse, 1915). En revanche, ce n'est qu'à partir des années 1960 que la structure des HDL a été décrite (Allmann, 1968 ; Taylor, 1969 et 1973).

### 1.3. Structure modèle et variabilité chimique

Les hydroxydes doubles lamellaires (HDL) constituent une famille de composés formés par un empilement de feuillets de type brucitique  $Mg(OH)_2$ . La structure de la brucite correspond à une superposition de feuillets plans d'octaèdres  $Mg(OH)_6$  dont le centre est occupé par les cations divalents  $Mg^{2+}$  et les sommets par les ions  $OH^-$ . Les octaèdres sont liés entre eux par leurs arêtes selon le type structural  $CdI_2$  et chaque ion hydroxyde est partagé entre trois octaèdres (Wang et al., 2004), formant ainsi un feuillet infini. Dans chaque feuillet, une fraction de l'élément métallique divalent est substituée par un métal trivalent, cela induit un excédent de charges positives (Allmann et al., 1966). Pour compenser cet excédent de charges, des anions hydratés s'insèrent dans les espaces interfoliaires et permettent l'électroneutralité de l'édifice minéral. Une telle représentation structurale de la phase HDL est donnée sur la Figure 1.1.

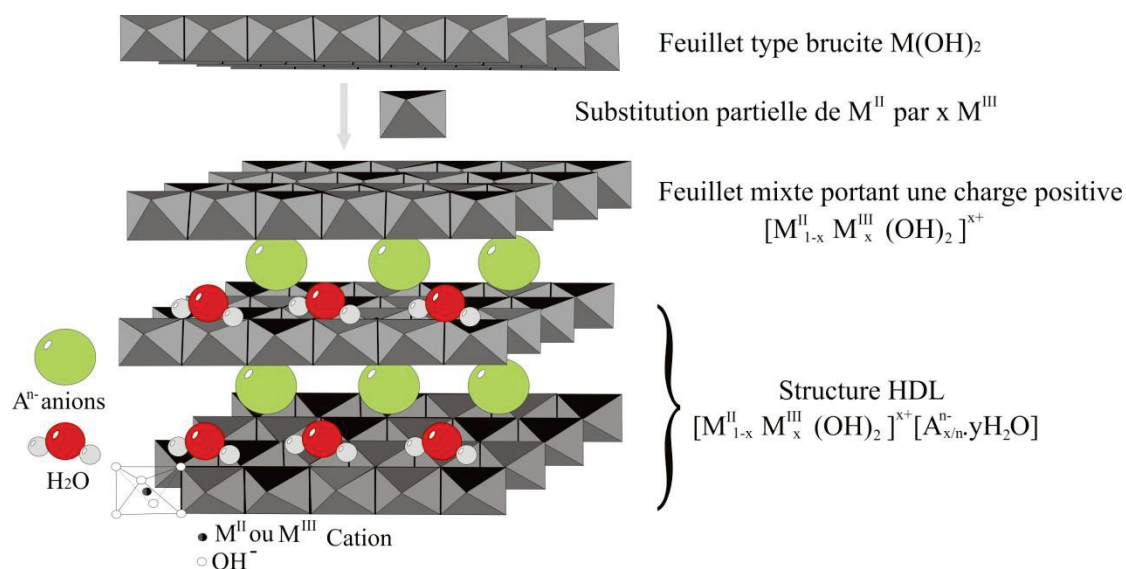


Figure 1.1. Représentation schématique d'une phase de type HDL.

La formule générale des HDL est donc :  $[M^{II}_{1-x}M^{III}_x(OH)_2]^{x+}[A^{n-}_{x/n}.yH_2O]$  où  $M^{II}$  et  $M^{III}$  désignent respectivement les cations métalliques divalents et trivalents,  $A^{n-}$  l'anion intercalé assurant la neutralité de l'édifice, et  $x$  la densité de charge (comprise entre 0,2 et 0,33) proportionnelle au rapport molaire  $M^{II}/(M^{II} + M^{III})$ . Pour des raisons de commodité, nous adapterons dans la suite l'abréviation:  $[M^R_M-A]$  où  $R$  représente le rapport molaire  $M^{II}/M^{III}$ . Cette formulation fait apparaître clairement la structure des phases HDL, constituée de deux parties bien distinctes dans laquelle  $[M^{II}_{1-x}M^{III}_x(OH)_2]^{x+}$  représente la composition du feuillet et  $[A^{n-}_{x/n}.yH_2O]$  celle de l'interfeuillet. La cohésion de la structure résulte, d'une

combinaison complexe d'effets électrostatiques entre les feuillets métalliques oxygénés et les anions d'une part, et d'autre part d'un réseau de liaisons hydrogène s'établissant entre les molécules d'eau, les anions interfoliaires et les groupements hydroxyles des feuillets.

Il existe plusieurs formes naturelles de phases HDL mais celles-ci sont minoritaires par rapport au système des argiles cationiques. Par contre, la famille des phases HDL est sans cesse enrichie par de nouvelles variétés synthétiques, soit par modification de la composition du feuillet, ou bien de la nature des espèces interfoliaires. D'après la littérature, les hydroxydes doubles lamellaires cristallisent en deux types de système cristallin qui diffèrent par la séquence d'empilement des feuillets: symétrie rhomboédrique R ou hexagonale H, décrits dans une maille hexagonale de paramètres  $c$  et  $a$  (Crepaldi et Valim, 1998). Ces paramètres correspondent respectivement à la périodicité dans le plan des feuillets et la périodicité de l'empilement de ces mêmes feuillets. Ils dépendent de la nature des cations divalents, trivalents et de l'anion interfoliaire. Le paramètre de maille  $a$  va être ainsi directement lié à la distance intermétallique et le paramètre de maille  $c$  va être lié à l'empilement des feuillets et donc à la nature de l'anion intercalé. Dans le [Tableau I-1](#) se trouve la liste de certaines argiles anioniques naturelles avec leur composition et le nom de minéral avec le type de symétrie trouvé.

**Tableau I-1.** Certaines argiles anioniques naturelles avec le système cristallin et le groupe d'espace à laquelle appartiennent ces espèces (Crepaldi et Valim, 1998).

Composition			Nom de minéral	
M <sup>II</sup>	M <sup>III</sup>	A <sup>n-</sup>	Rhomboédrique (3R), R $\bar{3}m$	Hexagonale (2H), P6 <sub>3</sub> mmc
Mg	Al	CO <sub>3</sub> <sup>2-</sup>	Hydrotalcite	Manasseite
Mg	Cr	CO <sub>3</sub> <sup>2-</sup>	Estictite	Barbetonite
Mg	Fe	CO <sub>3</sub> <sup>2-</sup>	Pyroaurite	Sjogrenite
Ca	Al	OH <sup>-</sup>	-	Hydrocalumite
Ni	Al	CO <sub>3</sub> <sup>2-</sup>	-	Tacovite
Ni	Fe	CO <sub>3</sub> <sup>2-</sup>	Reevesite	-
Ni	Fe	SO <sub>4</sub> <sup>2-</sup>	Honessite	-

De façon générale, les phases HDL synthétiques sont des polytypes de trois couches de symétrie rhomboédrique notés 3R appartenant au groupe d'espace R $\bar{3}m$  (Allmann, 1968 ; El Malki et al., 1993 ; Depège et al., 1994 ; Crepaldi et Valim, 1998) avec un empilement de type BC-CA-AB-BC; la maille élémentaire est alors constituée de trois feuillets et le paramètre de maille  $c$  est égal trois fois l'espacement basale du feuillet (à titre d'exemple le minéral pyroaurite de composition chimique [Mg<sub>6</sub>Fe<sub>2</sub>(OH)<sub>16</sub>] CO<sub>3</sub>.4H<sub>2</sub>O est un polytype 3R, caractérisé par les paramètres de maille  $a = 3,109 \text{ \AA}$  et  $c = 23,410 \text{ \AA}$ ). Le polytype deux couches de symétrie hexagonale noté 2H appartenant au groupe d'espace P6<sub>3</sub>mmc (Allmann, 1968 ; El Malki et al., 1993 ; Crepaldi et Valim, 1998) avec un empilement de type

BC–CB–BC, dont le paramètre de maille  $c$  est égal deux fois l'espace basal (à titre d'exemple le minéral sjogrenite de composition chimique  $[\text{Mg}_6\text{Fe}_2(\text{OH})_{14}]\text{CO}_3 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$  cristallise dans la symétrie hexagonale avec les paramètres de maille  $a = 3,1 \text{ \AA}$  et  $c = 15,5 \text{ \AA}$ ). Une troisième séquence d'empilement décrite dans la littérature (El Malki et al., 1993 ; Crepaldi et Valim, 1998), appartient au système hexagonal noté 1H liée essentiellement à une variété d'hydroxyde double lamellaire hautement hydraté. Sur la Figure 1.2 nous présentons les différents polytypes possibles d'une phase HDL, 3R, 2H et 1H.

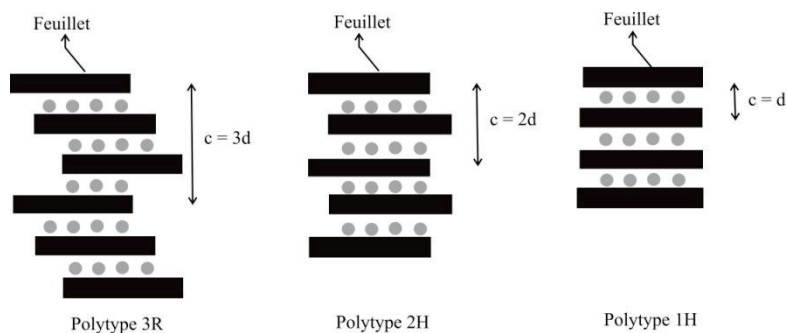


Figure 1.2. Schéma représentatif des polytypes possibles pour les HDL.

La technique de caractérisation propre à la détermination de cette structure est la diffraction des rayons X sur poudre. Les diffractogrammes X des HDL comportent ainsi trois régions distinctes:

- i. La région des bas angles ( $2\theta < 30^\circ$ ) qui contient les raies de diffraction des plans  $(00l)$  dont la position dépend de la taille de l'anion intercalé et qui permet d'accéder au paramètre de maille  $c$  et à la distance interfoliaire;
- ii. Le domaine des angles intermédiaires ( $30^\circ < 2\theta < 50^\circ$ ) qui contient les réflexions des plans  $(0kl)$  dont les positions dépendent du polytype (3R ou 2H) et sont fortement affectées par les défauts d'empilement;
- iii. La région des grands angles ( $2\theta > 60^\circ$ ) qui contient les réflexions des plans  $(hk0)$  et  $(hkl)$  caractéristique du feuillet métallique  $\text{M}(\text{OH})_2$  et qui permet d'accéder au paramètre de maille  $a$  et à la distance intermétallique cation–cation.

Une grande diversité de composés HDL peut être synthétisée en faisant varier :

- la composition chimique du feuillet,
- l'anion intercalé.

### 1.3.1. Composition chimique du feuillet

La composition chimique du feuillet est représentée par rapport à la formule abrégée par  $[M^{\text{II}}_R M^{\text{III}}]$ . Il est donc possible de jouer sur la nature des cations métalliques, ainsi que sur le taux de substitution en fixant le rapport molaire  $R = M^{\text{II}}/M^{\text{III}}$ .

#### 1.3.1.1. Nature des cations métalliques

Dans la littérature, un grand nombre d'HDL, contenant une grande diversité de cations métalliques, ont été synthétisés et étudiés. Les principaux cations métalliques divalents et trivalents utilisés sont :  $M^{\text{II}}$ :  $Mg^{2+}$ ,  $Ni^{2+}$ ,  $Fe^{2+}$ ,  $Co^{2+}$ ,  $Cu^{2+}$ ,  $Zn^{2+}$ ,  $Ca^{2+}$  et  $M^{\text{III}}$ :  $Al^{3+}$ ,  $Cr^{3+}$ ,  $Fe^{3+}$ ,  $Mn^{3+}$ ,  $Ni^{3+}$ ,  $Co^{3+}$ ,  $Sc^{3+}$ ,  $Ga^{3+}$ .

Miyata et Kumura, (1973), Taylor, (1984), Reichle, (1986), Carrado et Kostapapas, (1988), et Kuma et al., (1989) ont utilisé diverses combinaisons de ces cations divalents et trivalents dans la synthèse des HDL. Le [Tableau 1.2](#) résume les différentes combinaisons que l'on peut rencontrer.

Il est à noter aussi que la synthèse des HDL peut être obtenue avec un mélange de plusieurs cations divalents ou trivalents. A titre d'exemple, [Kooli et al. \(1995\)](#) ont synthétisé un HDL contenant comme cations divalents un mélange de magnésium et zinc et comme cation trivalent l'aluminium ; [Morpurgo et al. \(1994\)](#) ont synthétisé divers HDL formés par des cations divalents (cuivre, zinc et cobalt) et de l'aluminium trivalent; [Aguilar-Vargas et al. \(2013\)](#) ont synthétisé deux types d'HDL: MgZnGa et ZnGaAl.

**Tableau 1.2.** Combinaisons cationiques possibles au sein des feuillets HDL.

Cations Divalents	Trivalents								
	Al	Fe	Cr	Co	Mn	Ni	Sc	Ga	Ti*
Mg	Hydrotalcite	Pyroaurite	Woodallite		Desautelsite				
Ni	Takovite	Reevesite		Comblainite		Jamborite			
Zn	Zinccagnait								
Cu	Woodwardite								
Co									
Mn	Charmarite								
Fe	Caresite	Fougerite							
Ca	Hydrocalumite								
Li**									

■ Phase présente à l'état naturel

■ Phase synthétique obtenue par co-précipitation

■ Phase synthétique obtenue par d'autres voies de synthèse

\* Tétravalent

\*\* Monovalent

### 1.3.1.2. Répartition des cations dans les feuillets HDL

La répartition des cations divalents et trivalents dans les feuillets brucitiques des HDL est généralement désordonnée. Cela n'empêche pas un certain ordre local prévu par la règle d'exclusion cationique (Radoslovich, 1963) qui interdit le contact  $M^{III}-M^{III}$  et chaque cation  $M^{III}$  est entouré par six cations  $M^{II}$ . Cette répartition conduit à un ordre à longue distance pour un rapport  $M^{II}/M^{III} = 2$  et à un ordre local pour les autres rapports. La Figure 1.3 représente l'environnement local des cations pour un rapport  $M^{II}/M^{III} = 2$  et 3; des plans idéalement ordonnés.

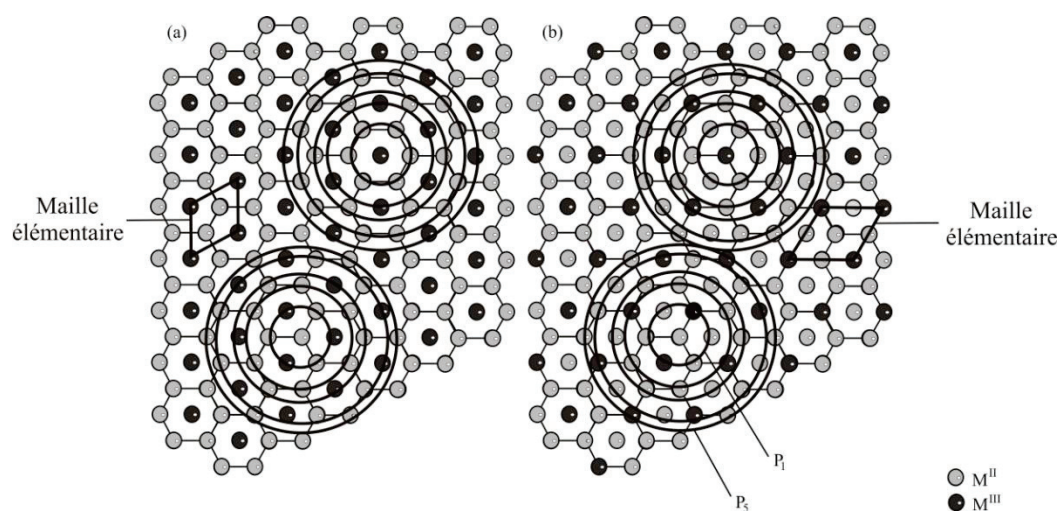


Fig. 1.3. Ordre local idéal pour les rapports  $M^{II}/M^{III} = 2$  (a) et  $M^{II}/M^{III} = 3$  (b), les cercles représentent les sphères de coordination autour de chaque cation  $M^{II}$  et  $M^{III}$  de  $P_1$  à  $P_5$ .

Les proportions relatives des cations divalents et trivalents dans les feuillets, sont à l'origine de l'apparition de la superstructure résultant de la distribution bien ordonnée des cations (Brindley et Kikawa, 1979 ; De Roy et al., 1992 ; Crepaldi et Valim, 1998). Le Tableau 1.3 montre des valeurs particulières de  $x$  (valeur qui est directement liée au rapport des cations et leur relation avec la symétrie de la cellule unitaire).

Tableau 1.3. Quelques superstructures liées aux rapports des cations dans les argiles anioniques.

$M^{II}/M^{III}$	$x$	Symétrie de la cellule unitaire	Superstructure
1/1	1/2	Orthorhombique	$a = a_0$ $b = a_0\sqrt{3}$
2/1	1/3	Hexagonale	$a = a_0\sqrt{3}$
3/1	1/4	Hexagonale	$a = 2a_0$
6/1	1/7	Hexagonale	$a = a_0\sqrt{7}$
8/1	1/9	Hexagonale	$a = 3a_0$

\*  $a_0$  est la distance entre deux atomes adjacents.



### 1.3.2. Nature des anions interfoliaires

Diverses espèces anioniques peuvent s'intercaler dans les phases hydroxydes doubles lamellaires synthétiques (Rives et al., 1999 ; Leroux et Taviot-Gueho, 2005). Il peut s'agir d'anions monovalents ou divalents, d'espèces organiques ( $-\text{C}_6\text{H}_5\text{SO}_3^-$ ,  $-\text{CH}_3\text{COO}^-$ ), minérales ( $\text{NO}_3^-$ ,  $\text{CO}_3^{2-}$ ,  $\text{SO}_4^{2-}$ ,  $\text{Cl}^-$ ), de polymères chargés ramifiés ou non (polyacrylate  $[-\text{CH}_2-\text{CH}(\text{COONa})-]_n$ , polystyrène sulfonate  $[\text{R}-\text{SO}_2\text{O}-]_n$ ), de molécules photo-actives (colorants), molécules électro-actives (médiauteurs redox), de polyoxométalates ( $\text{Cr}_2\text{O}_7^{2-}$ ,  $\text{Mo}_7\text{O}_{27}^{6-}$ ,  $\text{W}_{12}\text{O}_{40}^{3-}$ ,  $\text{V}_{10}\text{O}_{28}^{6-}$ ), de biomolécules naturelles (ADN, protéines)... Dans le cas d'espèces organiques ou biomolécules, les matériaux obtenus sont alors des matériaux hybrides organiques/minéraux ou biominéraux dans lesquels les liaisons de l'espèce intercalée avec les feuillettes peuvent être plus ou moins fortes, ioniques, physiques ou même covalentes (greffage). Grâce à cette maniabilité de composition chimique, les HDL s'émergent comme des matériaux « intelligents » c'est-à-dire qu'il est possible de modifier leurs propriétés physico-chimiques en fonction de l'application visée.

### 1.4. Modes de préparation des HDL...propriétés

Les matériaux HDL sont relativement faciles à synthétiser, ils sont principalement préparés par les réactions de chimie douce. Différentes voies de synthèse ont été employées que ce soit par précipitation directe, ce qui est le cas de la co-précipitation à pH constant ou de la méthode urée, ou indirectement ce qui est le cas lors de l'échange anionique, et la calcination-reconstruction. Ces modes de préparation permettent de moduler à souhait la composition et la morphologie des HDL.

#### *La co-précipitation à pH constant*

C'est la méthode la plus utilisée pour la synthèse des HDL avec une grande variété de cations et d'anions dans les feuillettes et les espaces interfoliaires. Cette méthode est développée pour la première fois en 1975 par S. Miyata (Miyata, 1975). Elle consiste à provoquer la précipitation simultanée des cations métalliques par ajout d'une espèce basique à une solution de sels correspondants pris en proportions adéquates. Les meilleurs résultats s'obtiennent en ajoutant simultanément dans un réacteur la solution acide de sels métalliques divalents et trivalents et la solution basique (NaOH ou KOH) de façon à maintenir le pH à une valeur constante. Le [Tableau 1.4](#) ci-dessous récapitule le pH de synthèse de certains HDL. La préparation se fait sous atmosphère d'azote pour éviter la contamination par les ions carbonates issus du  $\text{CO}_2$  de l'air.



Des phases pures de bonne cristallinité, sont obtenues, elles présentent souvent une morphologie dite en “rose de sable” ou “château de carte” (Fig. 1.4), la taille des particules varie entre 250 et 800 nm.

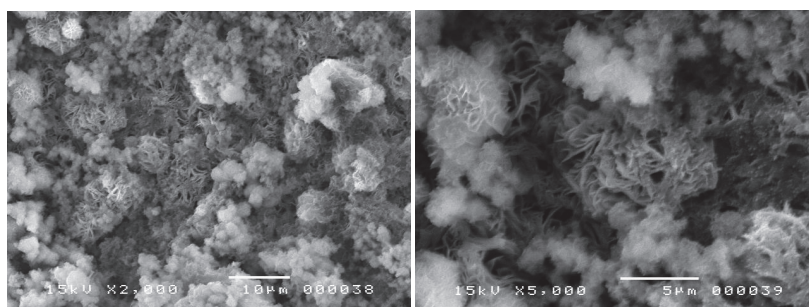
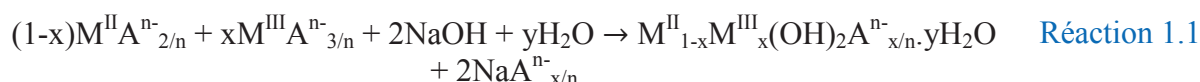


Fig. 1.4. Clichés MEB de la phase Mg<sub>2</sub>Al–Cl co-précipitée classiquement.

La réaction chimique qui se produit est la suivante:



L'utilisation de cette méthode est limitée et certains HDL ne peuvent pas être obtenus par co-précipitation; cela est dû notamment à la complexation des métaux présents dans la solution.

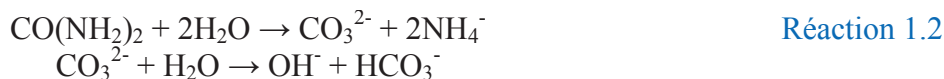
Tableau 1.4. pH de formation de certaines phases HDL.

HDL	pH
Zn <sub>2</sub> Cr–Cl	6,5
CuCr–Cl	5,5
Zn <sub>R</sub> Al–Cl	7,0–9,0
Mg <sub>R</sub> Al–Cl	8,0–10
Ni <sub>R</sub> Cr–Cl	10,0–13,0
Ca <sub>R</sub> Al–Cl	11,0

#### La méthode urée

La méthode urée a été développée par Costantino (1998) pour obtenir une taille de particules monodisperses. Le protocole consiste à utiliser une base retard comme l'urée, de façon à contrôler son hydrolyse. A des températures supérieures à 70° C, l'urée se décompose et libère des ions OH<sup>-</sup> (Réaction 1.2) qui vont réagir avec les sels métalliques et conférer un pH basique au milieu réactionnel ce qui provoque la précipitation de l'HDL. Plus la température est élevée, et plus la précipitation de la phase HDL sera rapide. Cette méthode permet un contrôle cinétique de la co-précipitation. Les phases préparées présentent ainsi des particules de forme hexagonale avec des tailles variant entre 1-5 µm.

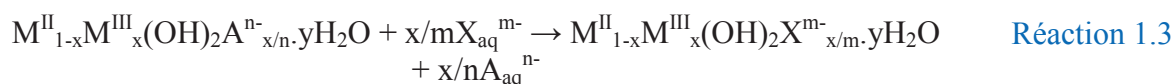
L'inconvénient majeur de cette méthode provient de la génération in situ d'anions carbonates très favorable à l'intercalation dans les HDL.



### *L'échange anionique*

Les HDL ont des propriétés d'échange d'anions particulièrement intéressantes. La méthode d'échange anionique est donc la seule voie de synthèse possible lorsque l'HDL ne peut pas être formé directement. Elle a été proposée pour la première fois par [Bish, \(1980\)](#). C'est une réaction topotactique qui permet de conserver la structure des feuillettes en substituant simplement l'espèce anionique intercalée par une autre. Typiquement, la phase HDL de départ contenant généralement des ions carbonate, chlorure ou nitrate est dispersée dans une solution aqueuse contenant l'anion à échanger en excès. Le pH est ensuite ajusté, tout en maintenant l'ensemble sous agitation. L'échange est généralement complet après quelques heures mais très souvent un temps d'échange de 24 h est utilisé à température ambiante ou en chauffant modérément.

Il faut noter que les échanges s'effectuent plus facilement à partir de phases contenant des anions nitrate intercalés qu'à partir des phases contenant des anions carbonate ou chlorure, car l'affinité des ions  $\text{NO}_3^-$  pour la matrice est moindre que celle des ions  $\text{Cl}^-$  ou  $\text{CO}_3^{2-}$  ([Miyata, 1983](#)). Cette affinité diminue dans l'ordre suivant vis-à-vis de la matrice HDL:  $\text{CO}_3^{2-} \gg \text{Cl}^- \gg \text{NO}_3^-$ .



### *La calcination-reconstruction*

Une des propriétés des HDL est de pouvoir se cristalliser et reprendre leur structure après calcination. Certains ont parlé d'« effet mémoire » de la structure HDL. Cette méthode dite reconstruction après calcination, consiste à faire subir au matériau HDL un traitement thermique à une température suffisante de l'ordre de 450° C. Cette étape conduit à la formation d'une phase pré-spinelle amorphe. Cette phase pré-spinelle peut cristalliser en une solution au contact d'espèces anioniques à intercaler dans l'espace interfoliaire. Cette méthode est utilisée quand l'anion est difficile à intercaler par échange anionique.

[Boehn et al. \(1977\)](#) ont été les premiers à proposer cette méthode en partant d'une phase ZnCr–Co pour préparer les composés ZnCr–Cl. La formation d'autres HDL a été ensuite reportée dans la littérature : CdCr–Cl à partir de CdO et  $\text{CrCl}_3$  ([Zhouri et El Hajbi, 1999](#)), MgAl– $\text{CO}_3$  à partir du mélange MgO et  $\text{Al}_2\text{O}_3$  ([Stanimirova et Kirov, 2003](#)). L'inconvénient de cette méthode réside dans la difficulté à obtenir un réarrangement complet des oxydes mixtes intermédiaires en HDL.

## 1.5. Aspects importants pour la synthèse

Nous présentons dans cette section les aspects qui influent sur la formation d'une phase HDL homogène et ayant une bonne cristallinité.

### 1.5.1. Facteurs liés aux cations

Certains aspects sont importants pour prédire si une paire donnée de cations peut former un HDL (Crepaldi et Valim, 1998). Parmi ces aspects on peut noter :

- La différence entre les rayons ioniques des cations.
- Le nombre de coordination.
- La taille de la sphère de coordination.
- L'énergie de réticulation.

Les cations ayant des rayons ioniques très différents ne peuvent pas former un hydroxyde double, mais des hydroxydes simples. Pour former un hydroxyde double, le nombre de coordination des cations doit être le même. Parfois, il ne suffit pas que les cations aient le même nombre de coordination, il est également important que la taille des cations dans les ligands (hydroxy) soit proche. Cette taille est influencé par le rayon ionique, la charge et les orbitales disponibles du cation. En outre les énergies réticulaires pour les hydroxydes des deux cations devraient être proches.

La plupart des HDL connues, possèdent des cations ayant des rayons ioniques comprises entre 0,5–0,74 Å (De Roy et al., 1992). Pour les cations de grande taille ( $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Pb}^{2+}$ ,  $\text{La}^{3+}$ ) l'arrangement octaédrique devient instable en provoquant une distorsion des feuillets.

Il faut tenir compte des réactions d'oxydoréduction à la fois en milieu acide et en milieu basique.

### 1.5.2. Rôle de l'anion pour la stabilisation de la structure lamellaire

Chaque anion a eu une performance de stabilisation de la structure lamellaire, cette capacité de stabilisation est d'une grande importance, principalement dans les synthèses par co-précipitation. Miyata et al. (1983) ont établi une série des capacités de stabilisation décroissantes des anions vis-à-vis de la matrice HDL:  $\text{CO}_3^{2-} > \text{OH}^- > \text{F}^- > \text{Cl}^- > \text{SO}_4^{2-} > \text{Br}^- > \text{NO}_3^- > \text{I}^-$ .

On peut noter que la préparation d'une phase HDL avec un anion de faible capacité de stabilisation que l'hydroxyde, à valeurs élevés de pH produit des composés qui contiennent également des hydroxydes comme anion interfoliaire. A titre d'exemple, pour la phase  $[Zn_RAl-Cl]$ , un pH inférieur à 7,0 conduit à une précipitation incomplète des ions  $Zn^{2+}$  et favorise en parallèle la précipitation d'hydroxyde d'aluminium alors qu'un pH supérieur à 9,0 il se forme un hydroxyde voire de l'oxyde de zinc.

### 1.5.3. Vitesse d'addition

Pour le procédé de synthèse par co-précipitation, la vitesse d'addition est un facteur qui doit être contrôlé pour obtenir des phases HDL avec une bonne cristallinité. Bien qu'aucune études spécifique concernant ce facteur, on constate que les meilleurs résultats sont obtenus lorsque on effectue l'addition lentement et sous agitation vigoureuse.

A titre d'exemple, [De Roy et al., \(1992\)](#) ont préparé un HDL par co-précipitation où l'addition est effectuée à une vitesse de 1 mL/h (temps total de 48 h), ce qui donne un HDL de cristallinité raisonnable, sans qu'il soit nécessaire de faire un traitement ultérieur. Généralement, on utilise des vitesses d'addition d'environ 1 mL/min ([Reichle, 1986](#)).

### 1.5.4. Aspects liés à la cristallisation

Dans la plupart des cas, l'optimisation du pH et de vitesse d'addition ne sont pas suffisantes pour obtenir des phases HDL avec une bonne cristallinité. Dans ce cas, un traitement hydrothermal, après l'addition, souvent accompagnée par une augmentation de pression, produit des matériaux plus cristallins. Le traitement hydrothermique est également utilisé pour obtenir une plus grande efficacité dans la substitution de l'anion interstitiel par régénération d'un précurseur calciné.

## 1.6. Applications des HDL

La structure, la morphologie, la variabilité chimique, et l'ensemble des propriétés précédemment évoquées explique l'intérêt porté aux HDL dans des applications très diverses. Les premières utilisations de HDL furent dans l'industrie chimique ([Cavani et al., 1991](#)) comme catalyseurs basiques, catalyseurs redox, support de catalyseur ([Xu et al., 2011](#)) et comme échangeurs d'anions dans les applications pharmaceutiques en tant qu'agents anti-acides ou anti-pepsiniques ([Playle et al., 1974](#) ; [Miyata, 1977](#) ; [Choy et al., 2007](#)). Les HDL sont aussi utilisés dans des procédés industriels en tant que stabilisateurs de PVC, retardateurs de flammes ([Lin et al., 2006](#) ; [Xu et al., 2006](#) ; [Tronto et al., 2013](#)), ainsi que dans des

procédés de remédiation environnementale en tant que piège des polluants tels que nitrate, phosphate, chromate (Parker et al., 1995 ; Houry et al., 1998 ; Del Arco et al., 2006) ou d'autres polluants organiques comme les pesticides et les herbicides (Inacio et al., 2001).

A noter que ce paragraphe ne prétend pas donner une liste exhaustive des possibles applications des HDL mais plutôt présenter deux axes majeurs concernant les applications des matériaux HDL: structure hôte pour les biomolécules et matériaux d'électrodes.

### 1.6.1. Les HDL: structure hôte pour les biomolécules

La structuration des matériaux hybrides biominéraux doivent répondre à un cahier des charges sévère imposant en particulier la biocompatibilité et une densité élevée de molécules actives immobilisées dans la matrice minérale, une bonne accessibilité du substrat, la conservation de l'activité biologique, une stabilité opérationnelle et une stabilité au stockage. Leur élaboration doit faire appel à des procédés de chimie douce afin d'éviter la dénaturation de la biomolécule.

Les HDL ont suscité une attention croissante ces dernières années due aux propriétés flexibles de l'interfoliaire conférant au matériau une grande capacité d'échange anionique (Bish, 1980 ; Clearfield et al., 1991) et l'immobilisation de diverses molécules biologiques ou d'intérêt biologique telles que les médicaments (Khan et O'Hare, 2002 ; Bi et al., 2014 ; Rives et al., 2013 et 2014) ou les enzymes (Darder et al., 2007 ; Li et Duan, 2006 ; Mousty et Prévot, 2013). D'un point de vue structurel, l'avantage de l'utilisation de ces matériaux est la structure ouverte qui la présentent due à leur caractère bidimensionnel, favorable à l'intercalation d'une grande variété de molécules organiques ou biologiques. Les molécules hébergées sont alors confinées entre les feuillets minéraux présentant une expansion modulable en fonction de la taille de la molécule à intercaler. Leur charge positive permet aussi l'immobilisation de molécules fonctionnelles dont les propriétés électriques sont compatibles avec les feuillets. De plus, les méthodes de préparation de ces matériaux inspirés des réactions de la chimie douce sont extrêmement favorables au maintien de l'intégrité chimique et biologique de la biomolécule hébergée.

#### 1.6.1.1. Immobilisation d'enzymes

Les enzymes sont des catalyseurs biologiques constituées d'une ou plusieurs chaînes d'acides aminés, capables de réaliser la plupart des réactions biochimiques avec une haute efficacité. Ce sont des agents qui changent la vitesse d'une réaction mais qui ne modifient pas la réaction et empêchent les réactions secondaires gênantes. Au cours de ces dernières années,

le nombre d'enzymes connues a considérablement augmenté et les applications sont multiples en chimie analytique, en pharmacologie, en toxicologie, dans l'industrie agro-alimentaire et dans le secteur biomédical.

L'immobilisation d'enzymes dans un matrice HDL crée une nouvelle génération de matériaux hybrides catalytiquement actifs vis-à-vis d'une large palette de réactions chimiques (hydrolyse, polymérisation, isomérisation, réaction redox) et peut être d'intérêt notable en fonction des applications visées. Même si l'immobilisation permet de protéger l'enzyme et d'éviter sa dénaturation rapide, leur fonctionnement en continu sur plusieurs jours reste encore très problématique. Les interactions HDL-enzymes se développant au niveau des briques moléculaires des enzymes, c'est-à-dire les résidus d'acides aminés, il nous a semblé vraiment incontournable de rapporter.

La première étude sur l'immobilisation des acides aminés par une phase HDL date de 1997. En effet, [Whilton et al. \(1997\)](#) ont réalisé l'intercalation de l'acide glutamique, l'acide aspartique et l'acide polyaspartique dans des phases MgAl par co-précipitation à pH élevés, pH auxquels les acides aminés présentent une charge globalement négative. D'autres acides aminés également intercalés dans des phases HDL sont rapportées dans la littérature. [Fudala et al. \(1999\)](#) ont rapporté l'intercalation de la tyrosine dans une phase ZnAl par la réaction d'échange anionique. [Aisawa et al. \(2001\)](#) ont décrit l'intercalation de la phénylalanine dans une phase MgAl par co-précipitation. Ces matériaux multifonctionnels sont habituellement préparés par les réactions de la chimie douce (co-précipitation) ou par une réaction topotactique (adsorption simple ou échange anionique) et la stabilisation de la molécule hébergée est assurée par des liaisons hydrogènes.

Cependant l'immobilisation d'enzymes dans des phases HDL n'est publiée qu'à partir des années 2000. Le [Tableau 1.5](#) présente des exemples d'assemblages HDL-enzymes. Lorsque les matériaux HDL sont considérés comme un support d'immobilisation d'enzymes, deux stratégies principales peuvent être distinguées comme décrit précédemment:

#### *Immobilisation utilisant des précurseurs HDL*

Cette méthode est basée sur la capacité du précurseur HDL à interagir avec les enzymes grâce à des forces électrostatiques et des liaisons de Van der Waals conduisant à des assemblages HDL-enzymes. Cette approche peut être considérée comme un processus d'adsorption et/ou d'échange anionique. C'est probablement le processus le plus étudié ([Tableau 1.5](#)).

Tenant compte de la grande taille des enzymes et aux mauvaises propriétés de gonflement des HDL dans l'eau, les enzymes ne diffusent pas entre les feuillettes, mais sont principalement situées à la surface des cristallites. Généralement, des capacités d'adsorption élevées sont obtenues lorsque l'adsorption est effectuée à des valeurs de pH au-dessus du point isoélectrique de la protéine en raison d'interactions électrostatiques favorables entre la protéine et les feuillettes HDL chargée positivement (Ralla et al., 2011 ; Bellezza et al., 2012 ; Mousty et Prévot, 2013). Les propriétés d'adsorption de HDL vis-à-vis des biomolécules dépendent fortement de la composition chimique des feuillettes HDL, le rapport  $M^{II}/M^{III}$  et la nature des anions interfoliaires. Les propriétés texturales de l'HDL peuvent jouer également un rôle important dans ce processus puisque les capacités d'adsorption sont liées à la taille des particules et l'état d'agrégation.

#### *Immobilisation par co-précipitation directe*

Dans cette approche, la formation du support inorganique HDL est effectuée directement en présence de l'enzyme (Tableau 1.5). Généralement, Les HDL peuvent être précipités sur une large gamme de pH, permettant l'immobilisation de nombreuses enzymes tout en maintenant leur activité.

Tableau. 1.5. Liste d'assemblage HDL–enzymes.

Enzyme	HDL	Méthode	Référence
PPO	ZnAl–Cl	adsorption	Shan et al., (2003a)
GOx	MgAl–Cl	adsorption	Sanchez et al., (2010)
	ZnCr–Cl		Shan et al., (2003a)
	ZnCr–FcPSO <sub>3</sub>		Mousty et al., (2009)
	ZnAl–Cl		Cosnier et al., (2006)
	MgAl–FcSO <sub>3</sub>		Colombari et al., (2007)
	MgAl–FcCO <sub>2</sub>		
CoOx	ZnAl–Cl	adsorption	Ding et al., (2009)
CholOx	ZnAl–Cl	adsorption	Ding et al., (2011)
Laccase	ZnCr–ABTS	adsorption	Mousty et al., (2007)
AIP	ZnAl–Cl	adsorption	Mousty et al., (2008)
	MgAl–CO <sub>3</sub>		
HRP	MgAl–Cl	co-précipitation	Geraud et al., (2008)
	ZnCr–ABTS		
NiR	ZnCr–AQS	adsorption	Chen et al., (2007)
Urease	ZnAl–Cl	co-précipitation	Vial et al., (2006)
Trypsine	ZnAl–Cl	co-précipitation	Mansouri et al., (2009)
	MgAl–Cl		

*PPO* polyphénol oxydase, *GOx* glucose oxydase, *CoOx* choline oxydase, *CholOx* cholestérol oxydase, *AIP* alcaline phosphatase, *HRP* peroxydase de raifort, *Hb* hémoglobine, *NiR* nitrite réductase, *FcPSO<sub>3</sub>* (3-sulfopropyl)ferrocènesulfonylate, *FcSO<sub>3</sub>* ferrocènesulfonylate, *FcCO<sub>2</sub>* ferrocènesulfonylate, *ABTS* 3-éthylbenzothiazoline-6-sulphonique, *SDS* dodécylsulfate de sodium, *AQS* anthraquinone sulfonylate.



### 1.6.1.2. Administration des médicaments

Les systèmes d'administration de médicaments « en anglais Drug Delivery system DDS » sont conçus pour modifier la pharmacocinétique et la biodistribution de médicaments associés ou pour fonctionner comme des réservoirs de médicament (c'est-à-dire comme des systèmes à libération prolongée) ou les deux à la fois (Allen et Cullis, 2004) et devraient avoir la capacité d'améliorer plusieurs propriétés cruciales des médicaments "libres" telles que leur solubilité, leur stabilité in vivo et leur spécificité, réduire ou éliminer les lésions tissulaires, la protection du médicament, ou d'améliorer leur efficacité (De et al., 2008). Les structures hybrides obtenues à partir de HDL montrent de meilleures propriétés, y compris la facilité de synthèse contrôlée et la protection de l'environnement (Alexis et al., 2010), capacité d'échange anionique élevée, surface spécifique élevée, et la stabilité en milieu acide (pour les HDL ZnAl) ou en milieu physiologique (pour les HDL MgAl). Cela permet d'envisager une utilisation des HDL afin de surveiller, diagnostiquer et traiter de manière peu invasive de nombreuses maladies et est innovant dans le domaine médical.

Divers médicaments d'intérêt thérapeutique ont pu être encapsulés dans les HDL :

Selon l'OMS « Organisation Mondiale de la Santé », les maladies cardiovasculaires sont les premières causes de décès à l'échelle mondiale entraînant une forte demande de médicaments cardiovasculaires avec une efficacité durable. À ce jour, plusieurs médicaments cardiovasculaires ont été intégrés avec succès dans des vecteurs HDL de médicaments à libération contrôlée, désignant les HDL comme des « nanovecteurs » potentiels pour le traitement des maladies cardiovasculaires. Dès 2001, Khan et al. (2001) ont rapporté l'intercalation réversible d'un certain nombre de substances actives cardiovasculaire et anti-inflammatoire dans les HDL.

Comme maladie à forte mortalité et ayant peu de thérapies totalement efficaces, le cancer est aussi un problème international au sein de la profession médicale. Riaz et Ashraf (2013) ont donné un bref aperçu des recherches récentes sur l'encapsulation et l'administration de médicaments anticancéreux à l'aide de HDL.

En outre, Trikeriotis et Ghanotakis (2007) ont montré que ces matériaux hybrides peuvent également servir de vecteurs pour plusieurs antibiotiques. De plus, outre que le confinement de médicaments dans les matériaux stratifiés ne provoque aucune dénaturation significative des molécules et permet leur administration contrôlée sans perdre leurs propriétés chimiques ni leurs activités biologiques, il a été montré la possibilité d'améliorer



l'internalisation du médicament dans une cellule cible sans effets secondaires perceptibles (Oh et al., 2009).

Parmi les nombreuses méthodes conçues pour préparer ces matériaux biohybrides, les principales voies suivies sont (De Roy et al., 2001 ; Kanezaki, 2004 ; He et al., 2006 ; Forano et al., 2013) : la co-précipitation directe, l'échange anionique et/ou l'adsorption et la reconstruction après calcination. Le Tableau 1.6 présente un résumé des médicaments d'intérêt thérapeutiques immobilisés dans des matrices HDL en regard de la composition chimique du feuillet, le procédé de préparation ainsi qu'une brève description des conditions de libération du médicament.

### 1.6.2. Matériaux d'électrodes

Les HDL ont été également utilisés comme matériaux d'électrodes. L'électroactivité des HDL peut être reliée d'une part à la présence des cations métalliques électroactifs dans le feuillet (Vialat et al., 2015) mais aussi à l'intercalation dans l'espace interfoliaire, d'anions organiques électroactifs portant par exemple des groupements sulfonate (Mousty et al., 1994 ; Therias et al., 1996 ; Mousty, 2004) tel que l'antraquinone sulfonate (AQS, AQDS), le 2,2'-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulphonique (ABTS), l'indigocarmin ou des complexes de métaux comme les ferri/ferrocyanures (Labuda et Hudakova, 1997 ; Wang et al., 2009), les dérivés du ferrocène (Colombari et al., 2007), les porphyrines (Ballarin et al., 2002 ; Shao et al., 2010 ; Shao et al., 2011) ou les phtalocyanines (Han et al., 2011).

En associant ces deux approches mentionnées ci-dessus, il est donc possible de moduler la composition chimique des HDL. En effet, les HDL présentent des propriétés électrochimiques intéressantes permettant de les envisager en tant que matériaux ou précurseurs de matériaux d'électrodes. Leur pertinence en tant que matériau d'électrode pour la détection électrochimique de molécules organiques ayant un impact environnemental ou sur la santé, ou encore pour le stockage de l'énergie a récemment été soulignée dans un article de synthèse (Mousty et Leroux, 2012). En effet le développement des électrodes modifiées par des films HDL constitue un matériau spécialement alternatif dans la fabrication des capteurs et biocapteurs (Mousty, 2010 ; Yin et al., 2011) ainsi que dans les dispositifs de stockage de l'énergie comme les supercondensateurs (Malak-Polaczyk et al., 2010 ; Stimpfling et Leroux, 2010) et pour la préparation de batteries alcalines (Kamath et al., 1994), Li ou Li-ion (Liu et al., 2008 ; Jiang et al., 2011).

Nous viserons particulièrement dans ce travail d'appliquer les HDL en tant que matériau d'anode pour une biopile.

Tableau 1.6. Résumé des études sur le contrôle de libération des médicaments par HDL.

Genre	Médicament	HDL	Préparation	Libération	Référence	
CARDIOVASCULAIRE	Gemfibrozil	Li, Al	échange anionique	PBS (pH 4,0, 7,0)	Khan et al., (2001)	
	Captopril	Mg, Al	co-précipitation	PBS (pH 4,6, 7,4)	Zhang et al., (2006)	
	Héparine	Mg, Al	co-précipitation	PBS (pH 7,4)	Gu et al., (2008)	
	Pravastatine	Mg, Al	co-précipitation	PBS (pH 7,5); HCl (pH 4,5); liquides intestinaux simulés (pH 7,0)	Panda et al., (2009)	
	Fluvastatine	Mg, Al	co-précipitation	PBS (pH 7,5); HCl (pH 4,5); liquides intestinaux simulés (pH 7,0)		
ANTIBIOTIQUE	Bezafibrate	Mg, Al	co-précipitation	solution intestinale simulé (pH 8,0)	Berber et al., (2010)	
	Acide clofibrrique	Mg, Al	co-précipitation	solution intestinale simulé (pH 8,0)		
	Ibuprofène	Mg, Al	échange anionique co-précipitation reconstruction	PBS (pH 7,5) solution aqueux de HCl solution aqueux de HCl	Ambrogi et al., (2001) Gordijo et al., (2005)	
	Naproxène	Zn, Al	échange anionique co-précipitation reconstruction	PBS (pH 6,86) PBS (pH 7,4)	Wei et al., (2004) Berber et al., (2008)	
	Diclofénac	Zn, Al Mg, Al	co-précipitation échange anionique	- sérum physiologique (pH 5,5)	San Roman et al., (2012) San Roman et al., (2013)	
	Kétoprofène	Mg, Al	échange anionique	-	San Roman et al., (2012)	
	Fenbufène	Zn, Al Mg, Al	co-précipitation échange anionique	sérum physiologique (pH 5,5) PBS (pH 7,8)	San Roman et al., (2013) Li et al., (2004a)	
	Flurbiprofène	Mg, Al Mg, Al	co-précipitation reconstruction	PBS (pH 6,8, 7,4, 7,8) -	Li et al., (2004b) Berber et al., (2008)	
	Indometacine	Mg, Al Zn, Al	co-précipitation échange anionique	PBS (pH 7,4) PBS (pH 7,4)	Perioli et al., (2011)	
	Acide méfénamic	Mg, Al	co-précipitation reconstruction échange anionique	souris suisses in vivo souris suisses in vivo -	Del Arco et al., (2004)	
	Acide méclofénamic	Mg, Al	échange anionique co-précipitation reconstruction	- - -	Mohanambe et al., (2005) Del Arco et al., (2007)	
	Acide 5-aminosalicylique	Mg, Al	échange anionique co-précipitation reconstruction	- - -	Zou et al., (2007)	
	Dexaméthasone	Zn, Al Mg, Al	échange anionique co-précipitation	- PBS (pH 7,4)	Sahoo et al., (2013)	
	ANTICANCÉREUX	Acide folinique	Mg, Al	échange anionique	cellules de fibroblastes humains	Choy et al., (2004)
		Méthotrexate	Mg, Al Mg, Al	échange anionique co-précipitation	cellules de fibroblastes humains cancer du poumon humain;	Choi et al., (2008)
5-Fluorouracile		Zn, Al Mg, Al	échange anionique reconstruction co-précipitation	l'ostéosarcome; cellules d'hépatome PBS (pH 7,4) PBS (pH 7,4) cancer du poumon humain;	Chakraborty et al., (2011) Wang et al., (2005a)	
Doxifluridine		Zn, Al	échange anionique	l'ostéosarcome; cellules d'hépatome	Choi et al., (2008)	
Camptothécine		Mg, Al Mg, Al	reconstruction échange anionique reconstruction	PBS (pH 4,8, 7,2) PBS (pH 7,45) cellules de gliome in vitro	Jin et al., (2010) Pan et al., (2010) Tyner et al., (2004)	
Podophylotoxine		Mg, Al	échange anionique	PBS (pH 4,8, 7,2) souris saine	Dong et al., (2010) Wang et al., (2005b)	
ANTIBIOTIQUE	Chloramphenicol	Zn, Al	échange anionique co-précipitation	- sérum physiologique (pH 5,5)	San Roman et al., (2012) San Roman et al., (2013)	
	Gramicidine	Mg, Al	échange anionique	-	San Roman et al., (2012)	
	Amphotericine B	Mg, Al	échange anionique	cholate de sodium + tampon Tris (pH 9,0)	Trikeriotis et al., (2007)	
	Ampicilline	Mg, Al	échange anionique	cholate de sodium + tampon Tris (pH 9,0)		
	Acide nalidixique	Mg, Al	échange anionique	imidazole (pH 9,0) tampon Tris + NaOH (pH 10,0)		

### Application dans une biopile

Les piles à combustibles permettent d'obtenir de l'électricité à partir de carburant comme l'hydrogène ou le méthanol, d'autres dispositifs alternatifs s'inspirent des mécanismes développés dans le monde biologique comme les bactéries (Tingry et al., 2013). Ces piles à combustible microbiennes sont alors nommées "biopiles" en raison de la nature biologique de leurs catalyseurs, qui impliquent des micro-organismes connectés aux électrodes.

Le principe de la biopile est directement issu du fonctionnement des piles à combustible; deux électrodes assurent le fonctionnement du générateur : une anode, lieu de l'oxydation d'un carburant (par exemple l'acétate), et une cathode, lieu de la réduction du comburant (généralement l'oxygène). Les électrodes assurent la collecte des électrons entre les électrodes et permettent ainsi la génération d'un courant électrique. Ces réactions d'électrodes nécessitent des catalyseurs. Dans le cas des piles à combustible « classique », la catalyse est assurée par des métaux nobles (platine notamment) qui permettent d'améliorer l'efficacité des réactions électrochimiques. Dans le cas des biopiles, la catalyse est assurée par des bioéléments tels que les micro-organismes (bactéries, algues, levures...). La Figure 1.5 présente le schéma de fonctionnement d'une biopile.

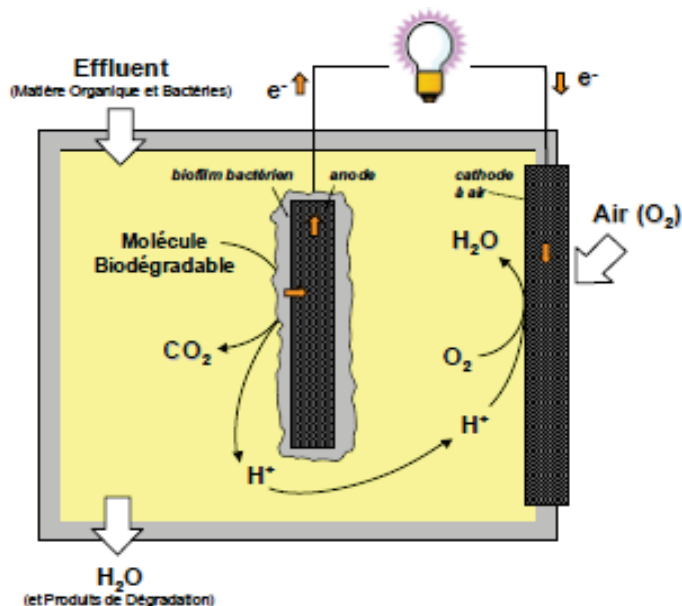
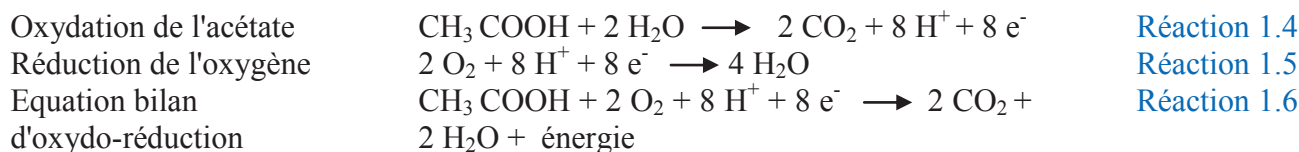


Figure 1.5. Représentation schématique d'une biopile (pile à combustible microbienne) mettant en jeu des bactéries capables de transférer directement leurs électrons à une électrode : Les bactéries électroactives se développant à la surface de l'anode via différents mécanismes jouent le rôle de biocatalyseur pour les réactions d'oxydo-réduction en oxydant les molécules organiques (acétate) et transférant les électrons libérés à l'anode.

Voici alors le bilan de la transformation du glucose moléculaire en énergie électrique :



Les HDL vont pouvoir dans ce cas-là être de bons candidats pour permettre le confinement des bactéries par adsorption de celles-ci sur sa surface chargée et donc faciliter le transfert des électrons produits ou consommés par la réaction redox produite à l'électrode.

## 1.7. Conclusion

Les hydroxydes doubles lamellaires (HDL) sont des composés très attrayants du fait de leur faible coût, leur biocompatibilité et non-toxicité, leur préparation facile, leur large gamme de composition et leurs propriétés d'adsorption, de piégeage ou d'échange anionique. Grâce à ces propriétés les HDL suscitent beaucoup d'intérêt par le monde scientifique et sont cependant introduits dans ce travail tant que structure hôte pour les biomolécules et comme matériaux d'électrodes.

### *Objectifs*

Dans ce travail de thèse nous retiendrons deux types de HDL MgAl et ZnAl qui ont été largement introduits dans diverses applications comme montré dans l'analyse bibliographique. La spécificité de ce travail repose sur l'immobilisation d'une enzyme modèle, la lactate déshydrogénase dans ces deux matrices ainsi qu'un médicament anti-bactérien, la berbérine, afin d'étudier les interactions entre ces deux biomolécules et la phase HDL introduite et de répondre à leurs exigences d'applications dans le domaine médical. Dans un second temps nous tenterons d'étudier les deux phases mentionnées de plus en plus fine en terme de structure, morphologie et profil électrochimique en vue de les employer en tant que matériaux d'électrode pour le développement de biopile.

## Matériaux et méthodes d'études

2.1	<u>REACTIFS</u> .....	25
2.2	<u>PREPARATION DES HDL DE REFERENCE</u> .....	25
	2.2.1 <u>Synthèse par co-précipitation</u> .....	25
	2.2.2 <u>Synthèse par décomposition thermique de l'urée</u> .....	26
2.3	<u>TECHNIQUE EXPERIMENTALES</u> .....	27
	2.3.1 <u>Isotherme d'adsorption</u> .....	27
	2.3.2 <u>Mesure de l'activité de la lactate déshydrogénase</u> .....	30
	2.3.2.1 <u>Dosage de la lactate deshydrogénase</u> .....	30
	2.3.2.2 <u>Détermination graphique de la constante de Michaelis <math>K_m</math> et de la <math>V_{max}</math></u> .....	30
	2.3.3 <u>Libération de la berbérine</u> .....	31
	2.3.4 <u>Etude de l'activité anti-bactérienne</u> .....	32
	2.3.4.1 <u>Germes testés</u> .....	32
	2.3.4.2 <u>Confrontation bactérie-échantillon</u> .....	32
	2.3.5 <u>Configuration du prototype de PCM</u> .....	32
2.4	<u>TECHNIQUES DE CARACTÉRISATIONS</u> .....	33
	2.4.1 <u>Caractérisations physico-chimiques</u> .....	33
	2.4.1.1 <u>Diffraction par rayon X (DRX)</u> .....	33
	2.4.1.2 <u>Spectroscopie infrarouge (IR)</u> .....	34
	2.4.1.3 <u>Spectrophotométrie UV-vis</u> .....	35
	2.4.1.4 <u>Microscopie électronique à transmission (MET)</u> .....	36
	2.4.1.5 <u>Microscopie électronique à balayage (MEB)</u> .....	37
	2.4.1.6 <u>Adsorption-Désorption: modèle BET</u> .....	38
	2.4.1.7 <u>Mesure de l'angle de contact</u> .....	39
	2.4.2 <u>Caractérisations électrochimiques</u> .....	39
	2.4.2.1 <u>Dépôts films mince HDL</u> .....	39
	2.4.2.2 <u>Analyses électrochimiques (VC, SIE et CA)</u> .....	40

## Matériaux et méthodes d'études

### 2.1. Réactifs

Acétate de sodium, Anhydre, pour la biologie moléculaire,  $\geq 99\%$  (PubChem CID: 517045); Acide Nitrique, 70%, purifié par redistillation,  $\geq 99,999\%$  en métaux traces (PubChem CID: 944); Carbonate de sodium, Anhydre, en poudre, 99,999% en métaux traces (PubChem CID: 10340); Chlorure d'aluminium hexahydraté,  $\geq 98\%$  (PubChem CID: 24564); Chlorure de berberine,  $\geq 98\%$  (PubChem CID: 12456); Chlorure de magnésium hexahydraté,  $\geq 99\%$  (PubChem CID: 24644); Chlorure de zinc,  $\geq 98\%$  (PubChem CID: 5727); Ferrocyanure de potassium trihydraté,  $\geq 99,95\%$  en métaux traces (PubChem CID: 161067); Hydroxyde de sodium, réactif ACS,  $\geq 97,0\%$ , granulés (PubChem CID: 14798); Lactate, 85%, FCC (PubChem CID: 91435); Lactate déshydrogénase (à partir de muscle de lapin),  $\sim 95\%$  (PubChem CID: 9001609); Nicotinamide Adenine Dinucléotide,  $\geq 95\%$  (PubChem CID: 5893); Tampon phosphate salin, pH 7,20 - 7,60 (comprimé) (PubChem CID: 24978514); Urée, grade réactif, 98% (PubChem CID: 1176).

Tous ces réactifs chimiques sont de qualité analytique et sont utilisés sans autre purification. L'eau déionisée a été utilisée pour toutes les expériences.

### 2.2. Préparation des HDL de référence

#### 2.2.1. Synthèse par co-précipitation

Les phases HDL appelées aussi argiles anioniques sont facilement synthétisées au laboratoire, le plus souvent par des réactions de co-précipitation à pH constant. Cette méthode permet l'élaboration de phases caractérisées des degrés de cristallinité relativement élevées. Les particules formées sont de tailles variables entre 200 et 500 nm.

*Mode opératoire* : 50 mL d'une solution de sels métalliques divalents et trivalents ( $M^{II} + M^{III}$ ) de concentration totale 1 M avec un rapport molaire  $M^{II}/M^{III} = 2$  ou 3 ou 4 est ajoutée à débit constant (0.12 mL/min) dans un réacteur contenant au préalable 50 ml d'eau déionisée mise sous agitation magnétique et contenant éventuellement les anions à intercaler. Le pH de la solution est maintenu constant par ajout simultané d'une solution de soude de concentration 2 M. A fin d'éviter la contamination des phases par des anions carbonates issue du  $CO_2$  de l'air, les synthèses sont réalisées sous flux d'azote à 25° C à l'aide d'un dispositif entièrement automatisé équipé d'une pompe seringue et d'un pH-mètre ( $\alpha$ lpha-pH1000 EUTECH

instrument) permet de régler les débits des solutions de sels et de soude (Figure 2.1). Le produit final est récupéré après plusieurs cycles de lavage/centrifugation avec de l'eau déionisée puis laissé sécher à l'air, à température ambiante. La quantité de sels permet d'avoir un rendement massique théorique de 5 g de produit final HDL.

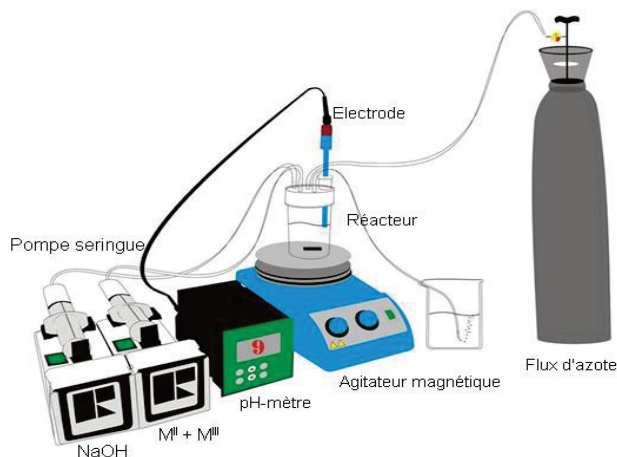


Figure 2.1. Dispositif expérimental utilisé pour la synthèse des composés HDL.

Pour synthétiser les phases HDL (MgAl-Cl, MgAl-CO<sub>3</sub> et ZnAl-Cl), nous avons utilisé respectivement les sels MgCl<sub>2</sub> et ZnCl<sub>2</sub> avec AlCl<sub>3</sub>. Les paramètres conditionnant la synthèse de chaque phase élaborée sont groupés dans le Tableau 2.1.

Tableau 2.1. Paramètres de co-précipitation des HDL de référence.

Composés	M <sup>II</sup> /M <sup>III</sup>	Sel (M)		NaOH (M)	Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> (M)	pH	M <sub>HDL</sub>
		M <sup>II</sup> Cl <sub>2</sub>	AlCl <sub>3</sub>				
MgAl-Cl	2	0,66	0,33	2	-	9	249,04
	3	0,75	0,25	2	-	9	307,35
	4	0,80	0,20	2	-	9	365,65
MgAl-CO <sub>3</sub>	2	0,66	0,33	2	0,5	9	273,59
ZnAl-Cl	2	0,66	0,33	2	-	7,5	331,19

### 2.2.2. Synthèse par décomposition thermique de l'urée

La décomposition thermique de l'urée a été utilisée pour préparer la phase MgAl-Cl. Cette méthode peut influencer fortement soit la composition chimique soit les propriétés structurales et texturales des phases HDL.

*Mode opératoire* : 12 g d'urée est ajoutée dans 50 ml d'une solution aqueuse de chlorures de magnésium et d'aluminium avec un rapport  $Zn^{2+}/Al^{3+} = 2$  et de concentration 1 M. Le mélange réactionnel est alors placé à reflux à 90° C sous atmosphère d'azote. La réaction est agitée en continu pour 4 jours, puis refroidie sous courant d'eau froide. Le produit obtenu est



alors centrifugé et lavé plusieurs fois avec de l'eau déionisée, puis séché à température ambiante.

## 2.3. Techniques expérimentales

### 2.3.1. Isotherme d'adsorption

*Mode opératoire* : La méthode d'adsorption consiste à additionner une masse  $m$  d'HDL à un volume  $V$  de solution de substance de concentration connue  $C_i$ , dans un récipient fermé, sous agitation, à température ambiante. Après un certain temps d'équilibre préalablement déterminé par une étude cinétique d'adsorption, la solution est séparée du solide par plusieurs cycles lavage/centrifugation et la concentration de surnageant  $C_e$  (concentration à l'équilibre dans la solution) est déterminée par spectrophotométrie UV-vis. La différence entre la concentration initiale  $C_i$  et la concentration à l'équilibre, nous permet de déterminer la concentration de substance adsorbée par masse d'HDL  $C_s$  donnée par la relation:

$$C_s = (C_i - C_e) \frac{V}{m} \quad \text{Equation 2.1}$$

Les isothermes d'adsorption sont obtenues en traçant la quantité de produit adsorbé  $C_s$  en fonction de la concentration d'adsorbat à l'équilibre  $C_e$ .

Tous les systèmes adsorbant-adsorbat ne se comportent pas de la même manière. Expérimentalement, on distingue quatre classes principales d'isothermes d'adsorption (Giles et al., 1960) nommées : C (partition Constante), L (Langmuir), H (Haute affinité), et S (Sigmoïde) (Tableau 2.2). La Figure 2.2 présente cette classification.

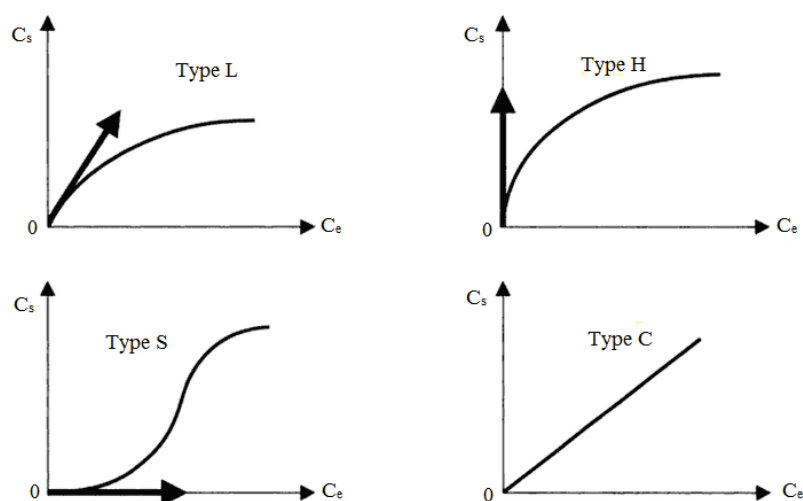


Fig. 2.2. Les quatre classes d'isothermes d'adsorption proposées par Giles et al. 1960.



Tableau II-2. Description du mécanisme d'adsorption selon la classification de Giles (Giles et al., 1960).

Courbe C :	Elle est caractérisée par une partition constante du soluté entre la solution et le substrat jusqu'à l'adsorption maximale "palier". Fondamentalement, la linéarité montre que le nombre de sites libres reste constant au cours de l'adsorption, bien plus que nouveaux sites doivent être créés. Le soluté pourrait alors modifier la texture du substrat en ouvrant des pores qui n'avaient pas été ouverts préalablement par le solvant.
Courbe L :	Les isothermes de classe L présentent, aux faibles concentrations de la solution, une courbure se traduit par la diminution des sites vacants dans le substrat au fur et à mesure de la progression de l'adsorption. Cela implique soit que la molécule de soluté est adsorbée verticalement ou qu'il n'y a pas de forte compétition d'adsorption entre le solvant et le soluté. Dans ce cas les molécules adsorbées sont plus susceptibles d'être adsorbées à plat.
Courbe H :	Ceci est un cas particulier de la courbe L, dans laquelle le soluté a une telle affinité que dans solution diluée, il est complètement adsorbé, ou du moins pas de quantité restante mesurable en solution. La partie initiale de l'isotherme est donc verticale. Ce phénomène se produit lorsque les interactions entre les molécules adsorbées de soluté et la surface du solide de substrat sont très fortes. L'isotherme de classe H est aussi observée lors de l'adsorption de micelles ou de polymères formées à partir des molécules de soluté.
Classe S :	L'allure initiale de la courbe montre, comme vient de l'expliquer, que l'adsorption devient plus facile que la concentration augmente. Expérimentalement, la courbe S apparaît quand trois conditions sont remplies : la molécule de soluté est (i) monofonctionnel (ii) présente une attraction intermoléculaire modérée rendre leur adsorption verticale et (iii) répond à une forte compétition, pour les sites de substrat, à partir de molécules du solvant ou d'autres espèces adsorbées.

Plusieurs modèles ont été proposés pour l'étude d'adsorption, ils expriment la relation entre la quantité adsorbée et la concentration en soluté dans un solvant à une température donnée, nous citons ci-dessous les deux principaux types :

### *Modèle de Langmuir*

C'est le modèle le plus utilisé pour commenter les résultats trouvés au cours de l'adsorption de molécules ou macromolécules organique en solution aqueuse. Il suppose que l'adsorption a lieu sur des sites bien défini et chaque site n'est susceptible de fixer qu'une seule espèce adsorbée de l'adsorbant (adsorption localisée).

L'énergie d'adsorption de tous les sites est identique et indépendante de la présence des espèces adsorbées sur les sites voisins (surface homogène et pas d'interaction entre les espèces adsorbées). Il est applicable à une adsorption monomoléculaire à la surface de l'adsorbant à l'équilibre.

A une température constante, la quantité adsorbée  $C_s$  (g/g) est liée à la capacité maximale d'adsorption  $C_m$  (g/g), à la concentration à l'équilibre  $C_e$  (g/L) du soluté et à la constante d'affinité  $L$  (L/g) par l'équation :

$$\frac{C_e}{C_s} = \frac{C_e}{C_m} + \frac{1}{L \cdot C_m} \quad \text{Equation 2.2}$$

### Modèle de Freundlich

La théorie de Freundlich tient compte d'un certain degré de compétition entre les interactions adsorbat/adsorbant et adsorbat/adsorbat. Elle considère que les sites d'adsorption sont dépendants et l'énergie d'adsorption est décroissante au cours de l'adsorption. Elle se présente sous la forme :

$$C_s = K_f \cdot C_e^{1/n} \quad \text{Equation 2.3}$$

La transformée linéaire de ce modèle a pour équation :

$$\ln C_s = \log K_f + \frac{1}{n} \ln C_e \quad \text{Equation 2.4}$$

où  $K_f$  (g/g) représente la capacité d'adsorption de l'HDL, et  $n$  c'est l'affinité adsorbat/adsorbant.

Afin d'établir les isothermes d'adsorption de la lactate déshydrogénase et de la berbérine, nous avons étudié la variation de l'absorbance en fonction de la concentration en solution (Fig. 2.4). Le spectre d'absorption UV-vis (Fig. 2.3) de la lactate déshydrogénase (LDH) et de la berbérine (BBR) montre respectivement une bande d'absorption à 340 nm et à 420 nm (bande d'absorption maximale).

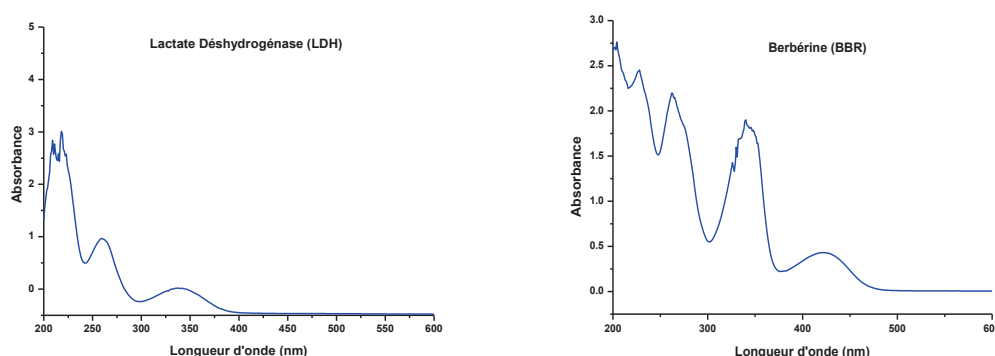


Fig. 2.3. Spectres d'absorption UV-vis de LDH et de BBR en solution.

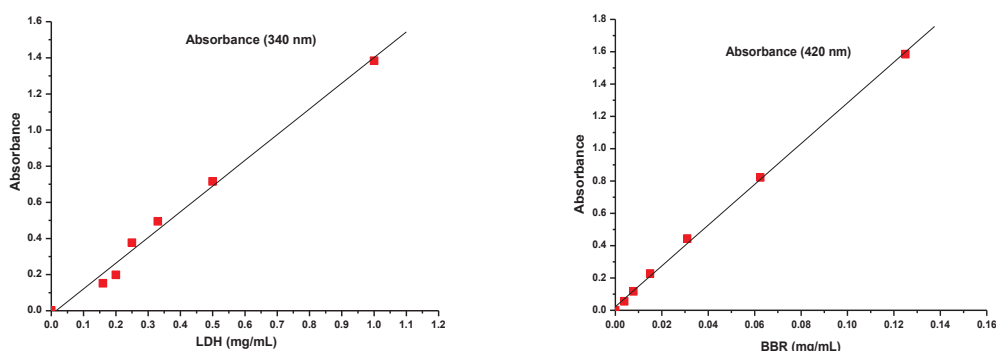
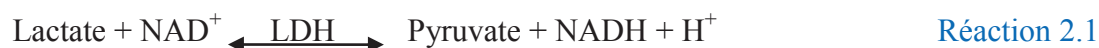


Fig. 2.4. La variation de l'absorbance en fonction de la concentration en solution de LDH et de BBR, respectivement à 340 et 420 nm.

### 2.3.2. Mesure de l'activité de la lactate déshydrogénase

#### 2.3.2.1. Dosage de la lactate déshydrogénase

La lactate déshydrogénase est l'enzyme qui catalyse l'interconversion du lactate et du pyruvate :



*Mode opératoire :* La lactate déshydrogénase est généralement dosée par méthode spectrophotométrique de type cinétique. On tire profit du fait que, la forme réduite NADH, absorbe fortement autour de 340 nm alors que sa forme oxydée, le  $\text{NAD}^+$ , n'absorbe pratiquement pas. Le principe est donc de suivre la diminution de l'absorbance à 340 nm, si on incube du NADH et du pyruvate, ou son augmentation, si on incube du  $\text{NAD}^+$  et du lactate. On peut facilement faire une mesure en termes de concentration absolue car les proportions de chaque produits ou substrats sont parfaitement stœchiométriques et que les coefficients d'absorption molaire du  $\text{NAD}^+$  et du NADH sont connus. On applique simplement la loi de Beer-Lambert :

$$A = C \cdot l \cdot \varepsilon \text{ ou } \Delta A = \Delta C \cdot l \cdot \varepsilon \quad \text{Equation 2.5}$$

avec :

C (ou  $\Delta C$ ) : Concentration (ou la variation de la concentration),

A (ou  $\Delta A$ ) : Absorption (ou la variation de l'absorption),

l : longueur du segment lumineux (dans la plupart des cuvettes de spectrophotomètre c'est 1 cm) et

$\varepsilon$  : Absorption molaire (donnée sous forme molaire ou autre, celle du NADH à 340 nm est de  $6,22 \text{ cm}^2/\text{mmol}$ ).

En réarrangeant cette équation on peut facilement trouver quelle est la quantité de NADH apparue (ou disparue) en fonction de la variation de l'absorbance.

#### 2.3.2.2. Détermination graphique de la constante de Michaelis $K_M$ et de la $V_{max}$

Pour déterminer les constantes  $K_M$  et  $V_{max}$ , il faut faire une étude cinétique.

Une première méthode consiste à tracer le graphique représentant les vitesses  $V$  en fonction de la concentration en substrat  $[S]$  utilisée, modélisé par l'équation de Michaelis-Menten :

$$V = \frac{V_{max} \cdot [S]}{[S] + K_M} \quad \text{Equation 2.6}$$

D'après l'équation de Michaelis-Menten, on peut en effet déduire que  $V$  se rapproche asymptotiquement de  $V_{max}$  lorsque  $[S]$  augmente ( $[S]/([S]+K_m)$  est une fonction hyperbolique), et  $V = \frac{1}{2}V_{max}$  lorsque  $[S] = K_M$ . On détermine donc graphiquement  $V_{max}$ , et connaissant  $V_{max}$  on détermine graphiquement  $K_M$  comme étant égal à la valeur de  $[S]$  pour laquelle  $V = \frac{1}{2}V_{max}$ . La difficulté vient du fait que la détermination graphique d'une asymptote est une chose imprécise, entachant d'erreur la détermination de la  $V_{max}$  et du  $K_M$ .

De nos jours, cependant, on peut facilement trouver des ordinateurs personnels et des logiciels capables de déterminer précisément l'équation d'une courbe par régression non linéaire et de résoudre cette difficulté.

D'autres procédures graphiques sont également utilisées pour la détermination graphique de ces deux constantes. La procédure graphique la plus connue, et la plus ancienne, 1935, est certainement celle de Lineweaver-Burk (méthode de linéarisation ou méthode des doubles réciproques) dans laquelle on représente  $1/V$  en fonction de  $1/[S]$  par l'équation :

$$\frac{1}{V} = \frac{K_M}{V_{max} \cdot [S]} + \frac{1}{V_{max}} \quad \text{Equation 2.7}$$

Cette méthode permet donc à partir des mêmes données que précédemment de déterminer graphiquement les valeurs de  $V_{max}$  et de  $K_M$ .

### 2.3.3. Libération de la berbérine

*Mode opératoire* : La cinétique de libération de la berbérine à partir des phases biohybrides BBR–HDL, a été suivie par spectrophotométrie UV-vis dans un tampon phosphate saline (0,1 M, pH 7,4) à 37° C. Le dosage du principe actif libéré (BBR) s'effectue au cours du temps à partir de solutions diluées obtenues avec les prises du milieu tamponné étudié afin de pouvoir évaluer le taux libéré en fonction du temps. Ce dernier est calculé par rapport à la concentration initiale du principe actif confiné dans les différentes formulations biohybrides et est exprimée en pourcentage de molécules de BBR libéré en fonction du temps selon la formule :

$$\text{BBR}_{\text{libéré}} (\%) = \frac{100 C_t}{C_0} \quad \text{Equation 2.8}$$

avec :

$C_0$  : Quantité de BBR à  $t = 0$  et

$C_t$  : Quantité de BBR libérée à un temps  $t$ .

La compréhension des mécanismes de libération des principes actifs est importante pour permettre de concevoir le système particulier de libération contrôlée et d'expliquer les comportements cinétiques de libération. Des modèles sont appliqués afin d'identifier le mécanisme de libération à partir de la forme pharmaceutique. Les trois modèles appliqués dans notre étude ainsi que leurs expressions mathématiques et la nature du mécanisme correspondant sont répertoriés dans le [Tableau 2.3](#).

**Tableau 2.3.** Exemples de modèles appliqués pour décrire les mécanismes de cinétique de libération.

Modèle	Relation	Nature du mécanisme
Ordre 0 ( <a href="#">Dash et al., 2010</a> )	$C_t/C_0 = k_0 t$	Libération indépendante de la concentration de substance dissoute
Ordre 1 ( <a href="#">Gao et al., 2014</a> )	$\ln(C_t/C_0) = -k_1 t$	Libération dépendante de la concentration de substance dissoute
Freundlich ( <a href="#">Gao et al., 2014</a> )	$\ln(1 - C_t/C_0) = \ln k_F + a \ln t$	Libération par diffusion et échange de surface

où  $k_0$ ,  $k_1$  et  $k_F$  sont des constantes de vitesse.

### 2.3.4. Etude de l'activité anti-bactérienne

#### 2.3.4.1. Germes testés

Le support microbien utilisé est composé de trois souches rencontrées en pathologie humaine, fournies par le service de microbiologie du Laboratoire de Biotechnologie Microbienne de la Faculté des Sciences et Techniques de Fès, Université Sidi Mohamed Ben Abdellah, Maroc. Il est composé de: *S. aureus* CIP 543154, *P. aeruginosa* A22 et *B. subtilis* ILP 1428B.

#### 2.3.4.2. Confrontation bactérie – échantillon

*Mode opératoire* : Pour chaque essai, on utilise trois boîtes de Pétri de 85 mm de diamètre préalablement stérilisées dans un autoclave à 120° C pendant 20 min. Chaque boîte est remplie de 20 mL du milieu gélosé (Luria-Bertani). 0,1 mL d'une suspension bactérienne pathogène, d'une unité d'absorbance, est étalé à la surface du milieu de culture pour obtenir une nappe bactérienne. Parallèlement, trois disques de 0,5 mm de diamètre imbibés de l'échantillon préalablement cité. L'incubation est réalisée pendant 24 h à 37° C. Les auréoles d'inhibitions autour des disques sont mesurées à l'aide d'une règle transparente au mm près et chaque essai est répété trois fois.

#### 2.3.5. Configuration du prototype de PCM

Notre concept de PCM ou biopile ([Fig. 2.5](#)) est matérialisé par un flacon de type « Wheaton cell » de 200 mL qui constitue le comportement anodique. La cathode est pressée

horizontalement sur la partie supérieure du goulot de flacon à un bouchon hermétique et un collecteur de courant (grille d'acier inoxydable). La cathode est une cathode à air amovible, conçue de feutre de carbone de diamètre 2,5 cm.

Les anodes sont constituées de feutre de carbone de surface géométrique (2,5 cm × 2,5 cm), contenant des dépôts des HDL. Une tige de titane de 2 mm de diamètre insérée dans le feutre sert de collecteur de courant à l'anode.

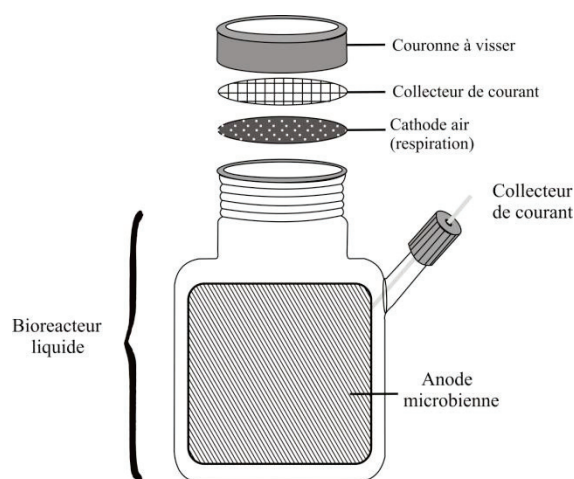


Fig. 2.5. Schéma de la PCM.

La station de traitement des eaux résiduaires de Bizerte a fourni l'effluent primaire. Cet effluent a été nourri avec 1 g/L d'acétate de sodium dans 50 mmol/L de tampon phosphate (Shi et al., 2012).

## 2.4. Techniques de caractérisation

### 2.4.1. Caractérisations physico-chimiques

#### 2.4.1.1. Diffraction par rayon X (DRX)

La diffraction des rayons X sur poudre (DRX) constitue un outil de base pour identifier la nature des composés synthétisés et déterminer leurs caractéristiques structurales.

La méthode d'analyse consiste à bombarder l'échantillon avec un faisceau de rayons X et mesurer l'intensité de rayons X qui est diffusée selon l'orientation dans l'espace. Les rayons X diffusés interfèrent entre eux, l'intensité présente donc des maxima dans certaines directions; on parle de phénomène de « diffraction ». Les données collectées forment le diagramme de diffraction ou « diffractogramme » (enregistrement de l'intensité diffractée en fonction de l'angle  $2\theta$  formé avec le faisceau directe). L'échantillon à l'état de poudre est préparé sous forme de plaque ou dans une coupelle remplie de poudre avec un niveau bien plan. Dans la configuration dite «  $\theta-\theta$  », l'échantillon est horizontal et immobile, le tube et le détecteur de rayons X se déplacent symétriquement. Si  $2\theta$  est la déviation du faisceau, l'angle entre l'horizontal et le tube vaut donc  $\theta$  de même que l'angle entre l'horizontale et le détecteur, d'où le nom du montage Bragg-Brentano. Il présente l'avantage de récolter le plus d'intensité, le faisceau sort divergent du tube, et du fait de la géométrie, il converge sur le détecteur (Fig. 2.6).

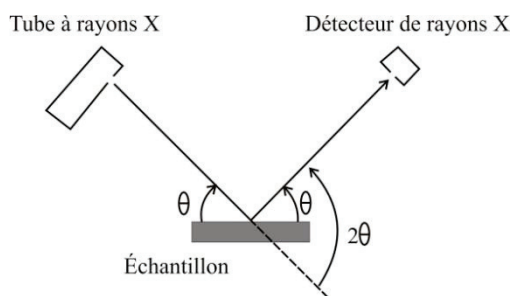


Fig. 2.6. Représentation des angles  $\theta$ – $\theta$ .

Les diagrammes de diffraction X ont été obtenus à l'aide d'un diffractomètre à poudre Bruker D8 Advance en géométrie Bragg-Brentano, piloté par le logiciel EVA. Cet appareil se compose d'un goniomètre monté verticalement sur un générateur de rayons X et équipé d'un tube anticathode de cuivre (porté à une tension et une intensité de 40 kV et 40 mA respectivement) en utilisant le rayonnement  $\text{CuK}\alpha_{1,2}$ ,  $\lambda = 1,5406 \text{ \AA}$ . Le rayonnement X issu de ce tube est diffracté par un monochromateur en germanium, puis transité à travers l'échantillon. Ce même monochromateur permet d'isoler la raie  $\text{K}\alpha_2$  du cuivre : par conséquent, le détecteur ne reçoit des photons issus de ces transitions que s'ils résultent d'une interaction élastique.

La qualité du diagramme de diffraction dépend fortement de la qualité de cristallisation de l'échantillon, mais aussi de celle de l'enregistrement. Il est donc nécessaire de connaître au préalable le domaine angulaire en  $2\theta$  dans lequel le composé donnera des pics de diffraction. Par ailleurs, la résolution dépend du pas de mesure utilisé ; expérimentalement nous avons utilisé un pas de  $0.02^\circ$  en  $2\theta$ .

#### 2.4.1.2. Spectroscopie infrarouge (IR)

La spectroscopie infrarouge (IR) (Rouessac, 1998) est une classe de spectroscopie qui se concentre sur la région infrarouge du spectre électromagnétique. Le domaine infrarouge s'étend de  $0,8 \mu\text{m}$  à  $1000 \mu\text{m}$ . Il est arbitrairement divisé en 3 catégories, le proche infrarouge ( $0,8$  à  $2,5 \mu\text{m}$  soit  $12500$ – $4000 \text{ cm}^{-1}$ ), le moyen infrarouge ( $2,5$  à  $25 \mu\text{m}$  soit  $4000$ – $400 \text{ cm}^{-1}$ ) et le lointain infrarouge ( $25$  à  $1000 \mu\text{m}$  soit  $400$ – $10 \text{ cm}^{-1}$ ). Comme toutes les techniques de spectroscopie, elle peut être employée pour identifier les composés ou pour déterminer la composition d'un échantillon.

Cette technique s'intéresse aux vibrations des liaisons entre atomes au sein d'une molécule. Chaque mode de vibration d'une liaison est excité pour une fréquence donnée. Ces vibrations impliquent une variation du moment dipolaire de la molécule et créent un champ électromagnétique périodique qui absorbe la radiation électromagnétique de même fréquence.

L'intensité d'absorption est proportionnelle au carré de la vitesse de variation du moment dipolaire. Les fréquences d'absorption correspondent aux fréquences des vibrations moléculaires. Pour un groupement chimique donné, les vibrations sont classées en vibrations d'élongation, notées "ν" et de déformation notées "δ". Le spectre de vibration dépend des forces interatomiques et la spectroscopie infrarouge peut être considérée comme une méthode d'analyse sensible aux environnements locaux.

L'appareil utilisé est un spectromètre à transformée de Fourier de type Nicolet 200 FTIR (Thermo Scientific) muni d'un détecteur de type DTGS et d'une source de type MICE. Le signal est enregistré à l'aide d'un interféromètre de Michelson. Un traitement par transformée de Fourier permet de mesurer les longueurs d'onde absorbées et les intensités de l'absorption. Le spectre infrarouge ou "spectrogramme" obtenu est une courbe d'absorbance de rayonnement en fonction de la fréquence allant de 400 à 4000 cm<sup>-1</sup>.

### 2.4.1.3. Spectrophotométrie UV-visible

La spectrophotométrie UV-visible (Skoog et al., 2007) est une méthode d'analyse qui utilise un rayonnement dans la gamme de l'ultraviolet (100 – 400 nm), du visible (400 – 750 nm) ou du proche infrarouge (750 – 1400 nm) de spectre électromagnétique. Cette méthode permet une détermination quantitative de la concentration d'un composé en solution.

Le principe de la spectroscopie UV-visible repose sur la transition d'un électron d'une molécule d'un état fondamental vers un état excité sous l'effet d'une onde électromagnétique. Le passage d'un état électronique à un autre d'énergie plus élevée nécessite l'absorption d'énergie sous forme de photons. Dans l'état fondamental, un atome ou une molécule se trouve dans son état de plus basse énergie, c'est-à-dire que tous les électrons sont répartis sur des orbitales atomiques de plus basse énergies. Lorsque l'échantillon est en phase liquide, cette transition s'illustre généralement par de larges bandes d'absorption peu nombreuses. Ainsi, un spectre d'absorption correspond au tracé de l'absorbance A en fonction de la longueur d'onde λ, qui s'exprime de la manière suivante:

$$A = \log \frac{I_0}{I} \quad \text{Equation 2.9}$$

où  $I_0$  l'intensité de la lumière incidente et  $I$  l'intensité de la lumière transmise.

Pour certaines conditions expérimentales (solution diluée, homogène, non fluorescente), l'absorbance est proportionnelle à la concentration selon la relation de Beer-Lambert (Eq. 2.5) mentionnée ci-dessus.



Un spectrophotomètre mesure l'absorbance d'une solution à une longueur d'onde donnée. Un dispositif monochromateur permet de générer, à partir d'une source de lumière visible ou ultraviolette dont la longueur d'onde est choisie par l'utilisateur. La lumière monochromatique incidente d'intensité  $I_0$  traverse alors une cuve ( $l = 1$  cm) contenant la solution étudiée, et l'appareil mesure l'intensité  $I$  de la lumière transmise. La valeur affichée par le spectrophotomètre est l'absorbance à la longueur d'onde étudiée.

Les spectres d'absorption UV-visible des composés bio-synthétisés sont enregistrés à l'aide d'un spectrophotomètre UV Shimadzu UV mini-1240 sur la gamme de longueur d'onde allant de 200 jusqu'à 600 nm avec une résolution de 5 nm. Le spectrophotomètre est piloté par un micro-ordinateur doté d'un logiciel New UV Data Manager. Les mesures sont faites contre un blanc (tampon phosphate ou l'eau).

#### 2.4.1.4. Microscopie électronique à transmission (MET)

La microscopie électronique en transmission (MET) permet une analyse morphologique, structurale et chimique d'échantillons solides à l'échelle atomique. Cette technique repose sur l'interaction des électrons avec la matière et la détection des électrons ayant traversé l'échantillon. Les échantillons étudiés doivent donc être préalablement amincis afin d'être transparents aux électrons.

Dans le microscope, les électrons accélérés sont générés par un canon à électrons (Fig. 2.7) comprenant une source et un champ électrique produit par une différence de potentiel entre la source et une anode, puis focalisés sur l'échantillon par des lentilles magnétiques ou électrostatiques. Le faisceau d'électrons interagit avec l'échantillon avec un contraste spatial résultant de différences de densité ou de composition chimique, et mesuré par un détecteur permettant ainsi de former une image de l'échantillon.

Les analyses par microscopie électronique à transmission ont été effectuées au Centre Pluridisciplinaire de Microscopie Electronique et de Microanalyse (CP2M) de l'université d'Aix Marseille. Un microscope électronique à transmission Tecnaï G2 (200 kV) équipé d'un filament LaB6, fonctionnant sous un vide de  $10^{-6}$  mbar a été utilisé. Cet appareil est également équipé d'un détecteur de rayon X. Ainsi, le bombardement électronique couplé à une analyse dispersive en énergie des rayons X (EDX) permet de recueillir à la fois des informations texturales et morphologiques mais également une analyse élémentaire de surface. Les images ont été acquises sur une caméra CCD 1024 x 1024 pixels. Une goutte du matériau en suspension (HDL) est déposée sur une grille en cuivre, puis introduit dans le microscope.

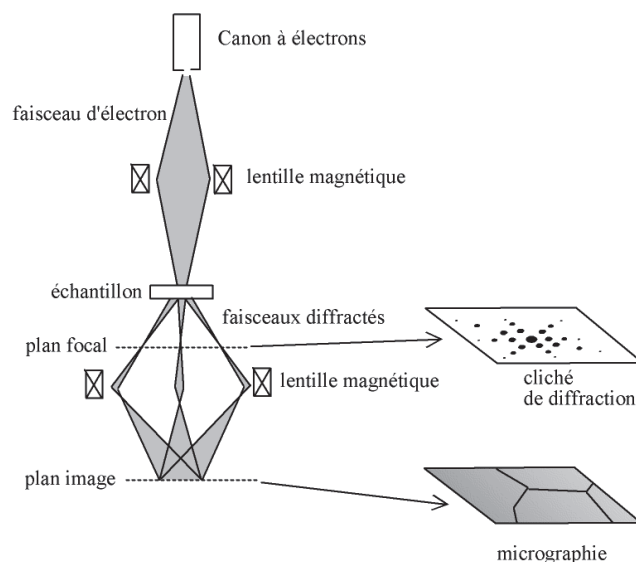


Fig. 2.7. Schéma de fonctionnement de microscope électronique à transmission (MET).

#### 2.4.1.5. Microscopie électronique à balayage (MEB)

La microscopie électronique à balayage est une technique de microscopie électronique capable de produire des images en haute résolution de la surface d'un échantillon en utilisant le principe des interactions électrons-matière.

Le microscope électronique à balayage (MEB) utilise un fin faisceau d'électrons, émis par un canon à électrons (Fig. 2.8). Des lentilles électromagnétiques permettent de focaliser le faisceau d'électrons sur l'échantillon. L'interaction entre les électrons et l'échantillon provoque la formation d'électrons secondaires de plus faible énergie. Ils sont amplifiés puis détectés et convertis en un signal électrique. Ce processus est réalisé en chaque point de l'échantillon par un balayage du microscope. L'ensemble des signaux permet de reconstruire la typographie de l'échantillon et de fournir une image en relief dont la résolution peut aller jusqu'à 1 nm.

Les analyses micrographiques ont été réalisées à l'aide de deux microscopes de type; Quanta 200 FEI (FEI Corp., USA) et Jeol JSM-5400 dont leur accélération allant jusqu'à 10 kV et 15 kV, respectivement.

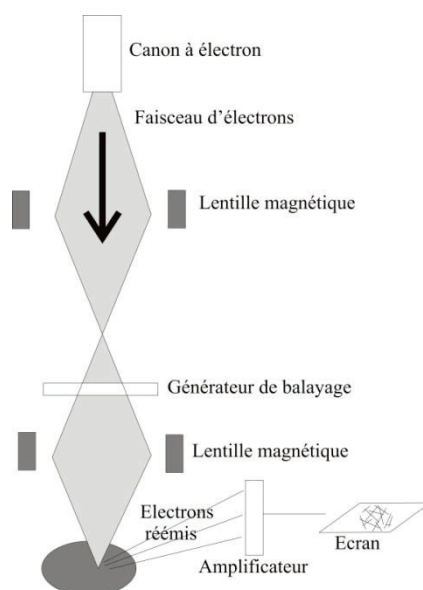


Fig. 2.8. Schéma de fonctionnement de microscope électronique à transmission (MET).

#### 2.4.1.6. Adsorption - Désorption de gaz : modèle BET

La surface spécifique est la superficie réelle de la surface d'un objet par opposition à sa surface apparente. Cela a une grande importance pour les phénomènes faisant intervenir les surfaces, comme l'adsorption, l'absorption ou les échanges de chaleur. Cette méthode permet la mesure de la surface spécifique d'un solide, résultant des interactions de ce solide avec un gaz de pression connue, à volume constant. Grâce à la méthode BET de Brunauer-Emmett-Teller (Brunauer et al., 1938), il est possible de remonter à une quantité de matière adsorbée sur une surface dans le volume de la monocouche.

La théorie de Brunauer, Emmett et Teller (BET) constitue un modèle de représentation de l'adsorption d'un gaz à la surface d'un solide. Cette adsorption physique d'un gaz sur toute la surface exposée d'une matière, avec le remplissage de ses pores, est appelée physisorption. Ce phénomène permet de mesurer la surface totale et de déterminer la taille des pores dans les matières nanoporeuses, microporeuses et mésoporeuses.

La surface spécifique de nos échantillons a été estimée à partir de la quantité d'azote adsorbée en fonction de la pression, à la température d'ébullition de l'azote liquide et à pression atmosphérique normale. Le procédé de mesure par physisorption implique le refroidissement de la surface de la poudre mesurée, en utilisant de l'azote pour adhérer à la surface (adsorption), puis le réchauffement de la surface (désorption)

Les mesures d'adsorption/désorption d'azote ont été obtenues avec un appareil ASAP 2020 Gas Adsorption Instruments. Avant chaque analyse, les échantillons sont préalablement dégazés sous un vide de  $10^{-2}$  torr à  $200^{\circ}$  C pendant 2 h. La masse de l'échantillon après le

prétraitement est considérée comme la masse de référence pour les calculs de la quantité d'azote adsorbée par gramme d'échantillon. Les isothermes sont enregistrées à 200° C, dans la gamme  $0,25 \leq P/P_0 \leq 0,5$ .

#### 2.4.1.7. Mesure de l'angle de contact

La mesure de l'angle de contact d'une goutte (Fig. II-9) permet de connaître précisément la mouillabilité d'une surface solide. De plus, la tension de surface d'un solide ou d'un liquide peut être calculée en prenant en compte une composante polaire ou non polaire et en utilisant l'angle de contact mesuré. La mesure de l'angle de contact permet d'accéder à l'énergie libre d'une surface. Elle permet aussi la discrimination de la nature polaire ou apolaire des interactions à l'interface liquide-solide. On peut ainsi déduire le caractère hydrophile ou hydrophobe d'une surface.

Le principe de fonctionnement est assez simple, avec une caméra qui permet de relever le profil de la goutte posée sur le substrat au moyen d'une seringue et d'une plateforme mobile. Le logiciel d'exploitation sur l'ordinateur permet l'extraction automatique de l'angle de contact, en utilisant différents algorithmes.

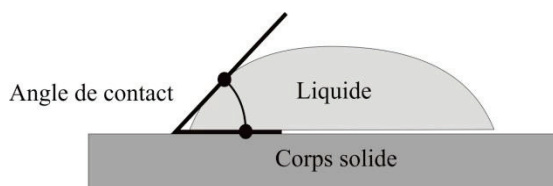


Fig. 2.9. Mesure de l'angle de contact.

Les mesures de mouillabilités et de tensions des surfaces ont été effectuées à l'aide de DIGIDROP Contact Angle Meter de GBX Scientific Instruments permettant de mesurer l'angle de contact d'une goutte d'eau avec une surface. L'image de l'évolution de 2  $\mu\text{L}$  d'une goutte déposée à l'aide d'une micro-seringue est enregistrée par une caméra. Le traitement des images est réalisé à l'aide du logiciel Windrop qui permet de numériser le contour de la goutte.

### 2.4.2. Caractérisations électrochimiques

#### 2.4.2.1. Dépôt films mince HDL

Des films minces de composés HDL ont été utilisés pour l'analyse électrochimique. Typiquement, un volume de 10  $\mu\text{L}$  et 100  $\mu\text{L}$  d'une suspension d'HDL 2 mg/mL dans de l'eau déionisée, agitée toute une nuit, a été déposé sur des électrodes de carbone ; carbone

vitreux et feutre de carbone, respectivement, puis laissé sécher à température ambiante. La surface de ces électrodes est de  $0,07 \text{ cm}^2$  pour le carbone vitreux et de  $1,13 \text{ cm}^2$  pour le feutre de carbone. Avant leur utilisation, les électrodes de carbone vitreux ont été polies avec un papier de verre et lavées à l'acétone puis polies ensuite avec une pâte d'alumine  $\text{Al}_2\text{O}_3$  avant d'être finalement rincée à l'eau Milli Q (Millipore) et à l'éthanol. Les électrodes de feutre de carbone ont été incubées avec une solution d'acide nitrique (0,1 M) pour la fonctionnalisation, ensuite rincées dans de l'eau Milli Q (Millipore), puis séchées sous un flux d'azote afin d'être insérées dans un porte-échantillon 092-C 013 ( $1 \text{ cm}^2$ ).

#### 2.4.2.2. Analyses électrochimiques (VC, SIE et CA)

La détermination des mécanismes des réactions d'électrodes sous-jacentes aux réactions d'oxydation ou de réduction peut être obtenue en utilisant une variété de techniques électrochimiques : voltammétrie cyclique (VC), spectroscopie d'impédance électrique (SIE) et chronoampérométrie (CA). Ces techniques ont été réalisées à l'aide d'un potentiostat VoltaLab 80 PGZ 402 commandé par le logiciel VoltaMaster 4.

Ces mesures électrochimiques nécessitent une cellule à trois électrodes:

- ❖ une électrode de référence: électrode au calomel saturé (ECS).
- ❖ une électrode auxiliaire constituée d'un fil de platine de 8 mm de long et 1 mm de diamètre.
- ❖ une électrode de travail en carbone: carbone vitreux ( $\text{Ø}$  3 mm) et feutre de carbone ( $\text{Ø}$  1,2 mm).

#### *Voltammétrie cyclique (VC)*

La voltammétrie est une technique électrochimique stationnaire couramment employée pour le contrôle des processus qui se produisent sur une surface utilisée en tant qu'électrode de travail. Cette technique est souvent utilisée en électrochimie car elle possède la particularité de pouvoir à la fois élaborer un matériau et par la suite de le caractériser (Le Floch et al., 2009). Elle consiste à mesurer le flux de courant d'oxydation ou de la réduction des composés présents en solution sous l'effet d'une variation de potentiel entre deux électrodes. La Figure 2.10 ci-dessous illustre l'évolution temporelle du courant qui traverse le système électrochimique au cours de la voltammétrie cyclique.

L'ensemble des manipulations de VC a été enregistré sur des fenêtres de potentiels fixés entre -0,6 et 0,6 V/ECS et avec des vitesses de balayage de 0,01 à  $0,3 \text{ V s}^{-1}$ .

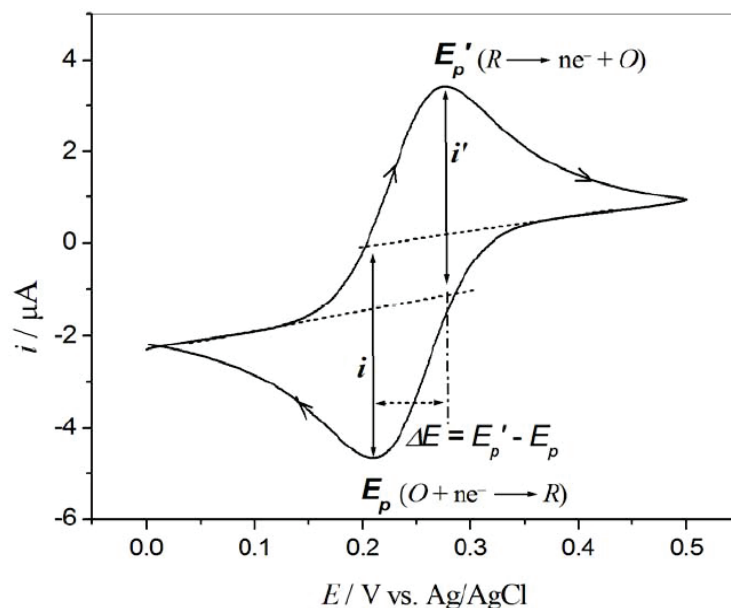


Fig. 2.10. Allure d'un voltamogramme obtenue par une cellule électrochimique.

#### *Spectroscopie d'impédance électrochimique (SIE)*

La spectroscopie d'impédance électrochimique (SIE) est une méthode non stationnaire et puissante, permet d'étudier les processus chimiques et physiques dans les solutions, aux interfaces solide-liquide et aux interfaces solide-solide, car il permet la séparation des différents phénomènes de perte de tension (Bard et Faulkner, 2000 ; Zhao et al., 2004 ; Barsoukov et Macdonald, 2005 ; Varcoe et al., 2006). Son principe consiste à appliquer au système une contrainte sous forme d'une variation de différence de potentiel, les mesures de l'impédance fournissent de l'information détaillée sur les changements résistance/capacitance à l'interface d'une surface conductrice ou semi conductrice. Ainsi, il existe deux représentations graphiques courantes utilisées dans SIE : les diagrammes de Nyquist et les diagrammes de Bode (Fig. 2.11). Notre travail se limite sur le diagramme de Nyquist qui fournit une représentation graphique dans un plan complexe dont l'axe des abscisses correspond à la partie réelle de l'impédance  $Z_{re}$ , alors que l'axe des ordonnées correspondent à sa partie imaginaire  $-Z_{im}$ .

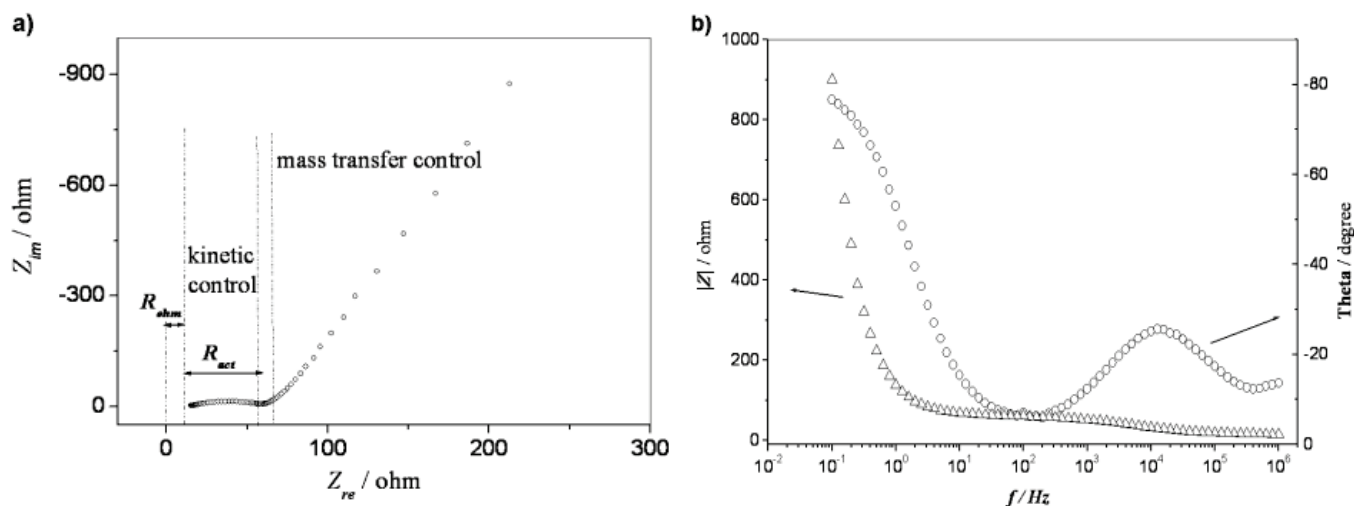


Fig. 2.11. Représentations graphiques utilisées dans SIE: (a) diagramme de Nyquist et (b) diagramme de Bode.

Les spectres d'impédance obtenus pour n'importe quelle interface, peuvent être modélisés par un circuit électrique équivalent. Le plus courant est le circuit de Randles (Randles, 1947): il se compose généralement de quatre éléments : une résistance représentant la résistance due à la chute ohmique  $R_s$ , un condensateur représentant la capacité de la double couche CPE, une résistance de transfert de charge  $R_{TC}$ , et l'impédance de Warburg,  $Z_W$ , représentant le phénomène de diffusion des espèces redox. La forme générale du circuit équivalent est présentée sur la Figure 2.12.

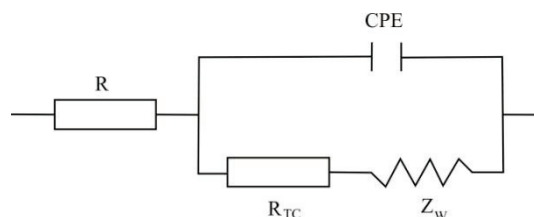


Fig. 2.12. Circuit équivalent de Randles.

Les mesures de spectroscopie impédance SIE sont réalisées dans la gamme de fréquence 100 mHz – 100 kHz et avec une amplitude de signal de -0,4 V.

### Chronoampérométrie (CA)

La chronoampérométrie est une autre technique électrochimique qui se répand efficacement dans le cas des dépôts métalliques ou polymériques. Elle consiste à porter brusquement le potentiel de l'électrode de travail à une valeur élevée dans une plage où l'analyte est électroactif et à mesurer l'intensité en fonction du temps pendant que le système revient à l'équilibre, le seul phénomène de transport étant la diffusion. Les résultats sont présentés en termes d'évolution du courant  $i$  en fonction du temps, les potentiels étant imposés à 0,2 V.

# Matériaux bioinorganiques Hydroxydes Doubles Lamellaires – Enzymes: Synthèse, caractérisation et activité catalytique

3.1	<u>INTRODUCTION</u>	45
3.2	<u>SYNTHESE ET TECHNIQUES EXPERIMENTALES</u>	47
3.2.1	<u>Immobilisation de la lactate déshydrogénase par échange anionique et adsorption sur MgAl–Cl et ZnAl–Cl HDL</u>	47
3.2.2	<u>Co-précipitation des phases MgAl–Cl/LDH</u>	47
3.2.3	<u>Techniques de caractérisations</u>	47
3.2.4	<u>Mesure de l'activité enzymatique de la lactate déshydrogénase</u>	48
3.3	<u>RESULTATS ET INTERPRETATIONS</u>	48
3.3.1	<u>Isotherme d'adsorption</u>	48
3.3.2	<u>Caractérisations des biohybrides</u>	51
3.3.2.1	<u>Diffraction des rayons X</u>	51
3.3.2.2	<u>Spectroscopie infrarouge</u>	53
3.3.2.3	<u>Microscopie électronique à transmission</u>	55
3.3.3	<u>Activité enzymatique</u>	56
3.3.3.1	<u>Activité des lactates déshydrogénases libres et immobilisés</u>	56
3.3.3.2	<u>Réponse cinétique</u>	57
3.3.4	<u>Corrélation entre structure/microstructure et activité enzymatique</u>	61
3.4	<u>CONCLUSION</u>	62



# Matériaux bioinorganiques Hydroxydes Doubles Lamellaires – Enzymes: Synthèse, caractérisation et activité catalytique

*Mohamed Amine Djebbi, Mohamed Braiek, Slah Hidouri, Philippe Namour, Nicole Jaffrezic-Renault, et Abdesslem Ben Haj Amara*

**Résumé** Ce chapitre présente une étude sur l'élaboration, la caractérisation et l'évaluation de matériaux biohybrides hydroxyde double lamellaire (HDL) – lactate déshydrogénase (Lac Deh) afin de produire un système bioinorganique. L'immobilisation de la Lac Deh dans des matrices HDL de type MgAl et ZnAl a été obtenue par réaction d'échange et co-précipitation. L'efficacité de l'immobilisation dépend largement de la méthode d'immobilisation. Une étude comparative montre que la co-précipitation permet d'immobiliser un taux d'enzyme plus important. Les modifications structurales et morphologiques des phases biohybrids résultantes ont été déterminées par diffraction des rayons X (DRX), spectroscopie infrarouge (IR) et microscopie électronique à transmission (MET). Les activités des lactates libres et immobilisées ainsi que les paramètres cinétiques ont été également réalisées à l'aide de la spectrophotométrie UV-visible. Par conséquent, une diminution de cristallinité a été signalé et une évolution d'activité due à la réduction de l'accessibilité des molécules de substrat aux sites actifs de l'enzyme dépendamment des méthodes de préparation. Toutefois, ces résultats ont permis fortement d'établir une corrélation entre structure/microstructure et activité enzymatique.

**Mots-clés** **Système bioinorganique, Hydroxyde Double Lamellaire (HDL), Lactate Déshydrogénase (Lac Deh), immobilisation d'enzyme, activité catalytique.**

**Abstract** The present chapter introduces new biohybrid materials involving layered double hydroxides (LDH) and biomolecule such as enzyme to produce bioinorganic system. Lactate dehydrogenase (Lac Deh) has been chosen as a model enzyme, being immobilized onto MgAl and ZnAl LDH materials via direct ion-exchange (adsorption) and co-precipitation methods. The immobilization efficiency was largely dependent upon the immobilization methods. A comparative study shows that the co-precipitation method favors the immobilization of great and tunable amount of enzyme. The structural behavior, chemical bonding composition and morphology of the resulting biohybrids were determined by X-ray diffraction (XRD) study, Fourier transform infrared (FTIR) spectroscopy and transmission electron microscopy (TEM), respectively. The free and immobilized enzyme activity and kinetic parameters were also reported using UV-Visible spectroscopy. However, the modified LDH materials showed a decrease in crystallinity as compared to the unmodified LDH. The change in activity of the immobilized lactate dehydrogenase was considered to be due, to the reduced accessibility of substrate molecules to the active sites of the enzyme and the partial conformational change of the Lac Deh molecules as a result of the immobilization way. Finally, it was proven that there is a correlation between structure/microstructure and enzyme activity dependent on the immobilization process.

**Keywords** **Bioinorganic system, Layered Double Hydroxide (LDH), Lactate Dehydrogenase (Lac Deh), Enzyme immobilization, Catalytic activity.**

### 3.1. Introduction

Les systèmes bioinorganiques sont des matériaux biohybrides nanostructurés dans lequel des biomolécules sont assemblées à des particules inorganiques de tailles nanométriques (He et al., 2006). Ils constituent une nouvelle génération de matériaux à l'interface entre la biologie et la science des matériaux (Jin et Brennan, 2002). Ces matériaux ont fait l'objet de nombreuses recherches non seulement comme matériaux écologiques, mais également pour d'autres applications y compris la biotechnologie tels que les biocapteurs (Choy et al. 1999 ; Choy et al., 2001). En conséquence, l'immobilisation de biomolécules, comme l'ADN, l'ATP, les nucléosides et les enzymes avec des points isoélectriques variant dans un grand domaine de pH a été abondamment étudiée (De Melo et al., 2002 ; Choy et al., 2004). La conception de matériaux bioinorganiques à fonctionnalités élargi permettant la protection des biomolécules de la décomposition ou de la dénaturation ce qui la rend utile dans un environnement ciblé.

Les réseaux inorganiques bidimensionnel (ou 2-D), tels que les hydroxydes doubles lamellaires (HDL) ainsi appelé argiles anioniques ou hydrotalcites (HT) ont suscité un intérêt considérable tant que « structure d'accueil » en raison de leur importance dans la promotion du développement technologique dans des domaines variés: la catalyse, la technologie de la séparation, l'optique, les nanocomposites et la science médicale (Shan et al., 2004b). Plus récemment, ces matériaux ont aussi servi à l'immobilisation des enzymes pour le développement des biocapteurs (Mousty et al., 2007 ; Shan et al., 2003b). Les HDL sont des hydroxydes lamellaires mixtes de métaux di et trivalents. La structure peut être décrite par l'empilement de feuillets de type brucitique  $M(OH)_2$ , formés par la mise en commun d'arêtes d'octaèdres où une partie des octaèdres  $M^{II}(OH)_6$  est substitué par  $M^{III}(OH)_6$ . L'excès de charge introduit par les cations  $M^{III}$  dans les plans est compensé par la présence d'anions contenus dans l'espace interfeuillets; cette teneur en trivalent est souvent ajustable, laissant la capacité d'échange ionique variable. Ces paramètres, liés à la très grande diversité des éléments métalliques constitutifs du feuillet, donnent lieu à une très vaste gamme de matériaux adaptables selon la compatibilité du réseau hôte organique et les propriétés recherchées.

L'assemblage d'hydroxydes doubles lamellaires avec une enzyme peut se réaliser par différentes modes de préparation (Braterman et al., 2004 ; Forano et al., 2006) comme le montre le Chapitre 1: la méthode de co-précipitation, les réactions d'échange ou bien encore par la reconstruction de la matrice d'accueil par « effet mémoire » (Olfs et al., 2009).

En effet de cette malléabilité chimique et structurale ainsi que les nombreuses voies de synthèse et possibilités de mise en forme de ces matériaux. Plusieurs études ont montré les HDLs comme excellentes matrices d'accueil pour l'immobilisation des biomolécules et en particulier d'enzyme aux p.i.e (point isoélectrique) inférieurs à 7 (Forano et Prévot., 2008). En outre, ils peuvent jouer un rôle clé non seulement en tant que matrices, mais aussi tout en permettant une bonne accessibilité du substrat, la conservation de l'activité biologique, une stabilité opérationnelle et au stockage.

Cependant, la lactate déshydrogénase (LDH, EC 1.1.1.27, 140 kD) est choisie comme enzyme modèle étant immobilisée au sein des feuillettes HDL. La lactate déshydrogénase est une enzyme d'origine naturelle que l'on trouve largement dans une grande diversité d'organismes, aussi bien végétaux qu'animaux (rein, cœur, muscles, pancréas, peau...) (Sass et al., 1989). Elle catalyse la conversion du lactate en pyruvate, l'enzyme catalyse l'oxydation du lactate en pyruvate en présence d'un coenzyme le Nicotinamide Adénine Dinucléotide (NAD) qui passe de sa forme oxydée  $\text{NAD}^+$  à sa forme réduite NADH. Le dosage du lactate dans le sang est nécessaire pour la prévention et le diagnostic de troubles tels que l'hypoxie ou certaines maladies cardiaques aiguës et pour certains tests de toxicité (Artiss et al., 2000). Ce dosage est également important dans tous les processus de fermentation ou dans les industries alimentaires (Patel et al., 2000). La méthode d'analyse couramment utilisée est la chromatographie liquide haute performance (HPLC), couplée à une détection par spectrophotométrie UV ou par indice de réfraction permettant de doser le NADH (absorption forte à 340 nm). Cette méthode est par contre peu aisée à mettre en œuvre car elle nécessite une étape de prétraitement et un matériel « lourd ». Cependant, la mesure du lactate en utilisant des biocapteurs électrochimiques revêt une grande importance pour l'analyse clinique ainsi que pour l'analyse des aliments (Patel et al., 2000). C'est pourquoi plusieurs matrices d'immobilisation ont été rapportées dans la littérature basées sur des polymères (Chaubey et al., 2001 ; Halliwell et al., 2002), des sol-gels (Li et al., 2002 ; Saengdee et al., 2015) ou des nanoparticules magnétiques (Sohn et al., 2008) afin de répondre aux besoins d'élaboration de techniques de suivi en continue. Malgré le grand nombre de matrices utilisées comme supports, aucune étude n'a été signalée à ce jour sur l'immobilisation de cette enzyme dans les HDL.

Dans la présente étude, nous avons entrepris d'immobiliser la lactate déshydrogénase dans deux différents types d'HDL (MgAl et ZnAl HDL) par le procédé d'échange anionique et la méthode de co-précipitation afin d'aborder les modifications structurales et

morphologiques ainsi que les avantages et les inconvénients dépendant du processus d'immobilisation.

### 3.2. Synthèse et techniques expérimentales

#### 3.2.1. Immobilisation de la lactate déshydrogénase (LDH) par échange anionique et adsorption sur MgAl–Cl et ZnAl–Cl HDL

Les échanges ioniques et l'adsorption ont été réalisés par mise en contact d'une quantité déterminée de phase HDL MgAl–Cl et ZnAl–Cl (5 mg) avec des concentrations massiques variables de l'LDH (0 – 5 mg/mL) dans un milieu aqueux tamponné (0,1 M, pH 7,4) sous agitation pendant un temps d'équilibre de 2 h à 25° C. Les valeurs de pH final obtenues après adsorption étaient comprises entre 8,5 et 9,2. Les essais sont répétés trois fois à chaque phase et la moyenne des résultats est calculée afin d'obtenir des résultats statistiquement valides. Les produits sont récupérés par des cycles lavages/centrifugations (3500 rpm) et notés MgAl–Cl/LDH<sub>ads</sub> et ZnAl–Cl/LDH<sub>ads</sub>, respectivement. La lactate déshydrogénase a été dosée par spectrophotométrie UV-vis à la longueur d'onde  $\lambda = 340$  nm.

#### 3.2.2. Co-précipitation des phases MgAl–Cl/LDH

Similairement au protocole utilisé pour la préparation des HDL de références (chapitre matériels et méthodes), le matériau bioinorganique MgAl–Cl/LDH a été co-précipité à un pH constant fixé à une valeur de 9 par addition simultanée d'une solution 0,1 M des sels métalliques avec un rapport molaire  $Mg^{2+}:Al^{3+} = 2$  et d'une solution 0,2 M de NaOH dans une solution aqueuse contenant le lactate pour un valeur de  $Q =$  rapport massique LDH/HDL égale à 1. La vitesse d'addition des sels étant de 0,12 mL/min. La co-précipitation est réalisée sous azote, la précipitation murie pendant 2 h et le solide est récupéré par des cycles lavages/centrifugations et séché à l'air ambiant. 98% de l'enzyme a été immobilisé et le matériau résultant a été noté MgAl–Cl/LDH<sub>cop</sub>.

#### 3.2.3. Techniques de caractérisations

Les diffractogrammes de rayons X des phases préparées ont été obtenus à l'aide d'un diffractomètre à poudre D8 Advance équipé d'une anticathode en cuivre (raie  $CuK\alpha$   $\lambda = 1,5406$  Å, 40 kV et 30 mA). Les diffractogrammes de diffraction ont été enregistrés avec une durée d'acquisition de 86,79 secondes par pas de  $0,02^\circ$  ( $2\theta$ ). Le domaine observé de l'angle ( $2\theta$ ) est compris entre  $2$  et  $70^\circ$ . Les spectres d'absorption IRTF ont été réalisés à l'aide d'un spectrophotomètre à transformée de Fourier Nicolet 200 FTIR (Thermo Scientific), dans un domaine allant de  $400$  à  $4000$   $cm^{-1}$ . La taille et la morphologie des particules des échantillons

biohybrides ont été examinées par MET en utilisant un microscope Tecnai G2 à 200 kV. Les analyses d'absorption UV-visible ont été effectuées sur un spectrophotomètre UV Shimadzu UV mini-1240 piloté par ordinateur, afin de déterminer les isothermes d'adsorption du lactate sur les phases HDL ainsi que l'évolution de l'activité de l'enzyme. Les longueurs d'ondes maximales sont obtenues directement par balayage automatique entre 200 et 600 nm.

### 3.2.4. Mesure de l'activité enzymatique de la lactate déshydrogénase

Les activités des lactates déshydrogénases libres et immobilisées ont été mesurées dans le sens de l'oxydation du lactate en pyruvate (Réaction 2.1) en suivant les changements qui surviennent dans la bande d'absorption du NADH à 340 nm (Sohn et al., 2008).



Typiquement, un volume de 2 mL de NAD (0,1 mM) et un volume de 3 mL de lactate (1,0 mM) sont ajoutés dans un tube à essai contenant l'enzyme libre ou l'enzyme immobilisée (MgAl–Cl/Lac Deh et ZnAl–Cl/Lac Deh). Tous les essais ont été effectués à 25° C dans un milieu aqueux tamponné salin (0,1 M, pH = 7,4). Après avoir mélangé le mélange réactionnel, l'oxydation du NADH est mesurée par l'augmentation de son absorbance à la longueur d'onde 340 nm. Les rendements des activités d'enzymes immobilisées ont été calculés en termes relatifs d'activité d'enzymes immobilisés sur l'HDL, en pourcentage, la différence d'activité entre les formes libres et immobilisées.

Les valeurs des constantes cinétiques ( $K_M$  et  $V_{max}$ ) ont également déterminées. En fait, la réaction du lactate et NAD catalysée par la lactate déshydrogénase a été effectuée dans une cuvette contenant 1 mg d'enzyme libre ou d'enzyme immobilisée. La solution d'essai requise l'addition de 70  $\mu\text{L}$  de lactate et 200  $\mu\text{L}$  de NAD à 730  $\mu\text{L}$  d'une solution tampon phosphatée saline. Enfin, la formation de NADH est mesurée par l'augmentation de l'absorbance à la longueur d'onde de 340 nm. Les vitesses maximales des réactions enzymatiques ( $V_{max}$ ) et les constantes de Michaelis ( $K_M$ ) ont été estimées à partir des données graphiques de la cinétique michaelienne.

## 3.3. Résultats et interprétations

### 3.3.1. Isothermes d'adsorption

Avec un point isoélectrique de 6,5, la lactate déshydrogénase est chargée négativement à  $\text{pH} \geq 7$  et, par conséquent elle sera adsorbée favorablement sur les particules HDL par attractions électrostatiques. En effet, l'affinité entre la lactate déshydrogénase et les matrices

HDL a été étudiée en utilisant les isothermes d'adsorption obtenus en faisant le tracé graphique de la quantité en lactate déshydrogénase adsorbée  $C_s$  (mg/mg) en fonction de la concentration à l'équilibre en solution  $C_e$  (mg/mL) où:

$$C_s = (C_i - C_e) \frac{V}{m} \quad \text{Equation 2.1}$$

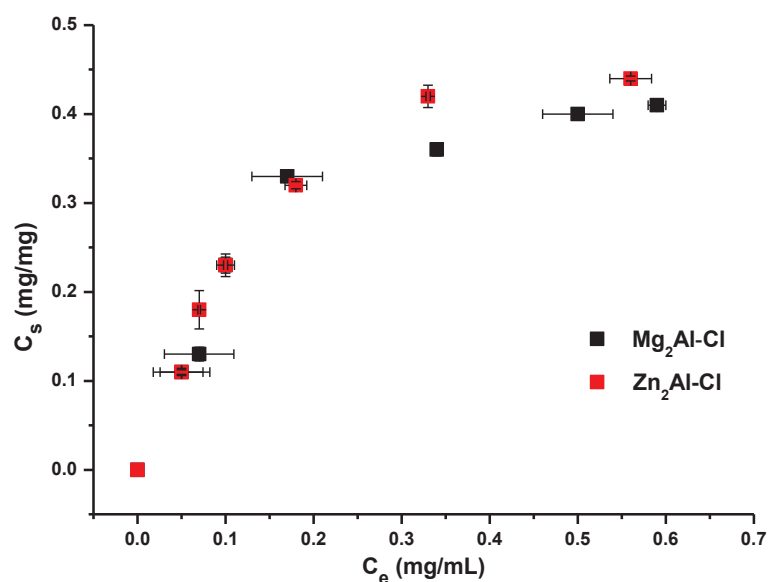
avec :

$C_i$  (mg/mL) : la concentration initiale en solution ;

$V$  (mL) : représente le volume de la suspension et

$m$  (mg) : la masse de l'adsorbant.

Dans la [Figure 3.1](#) sont reportées les isothermes d'adsorption du lactate déshydrogénase sur les phases MgAl-Cl et ZnAl-Cl. Elles sont clairement considérées comme proches du type L selon la classification de Giles ([Giles et al., 1960](#)). En effet, on peut distinguer deux parties sur les isothermes; pour des faibles concentrations d'équilibre  $C_e$  inférieur à 0,3 mg/mL, un accroissement nette de la lactate déshydrogénase retenue et au-delà de cette valeur on observe un plateau dont la longueur et la hauteur sont liées à la capacité d'adsorption, 0,41 et 0,44 mg/mg respectivement pour les phases MgAl-Cl et ZnAl-Cl. Ces résultats suggèrent que l'adsorption procède d'une progression linéaire d'adsorption suivie par une saturation des sites externes de la structure minérale par l'enzyme.



**Fig. 3.1.** Isothermes d'adsorption du lactate déshydrogénase par les phases MgAl-Cl et ZnAl-Cl.

Plusieurs modèles ont été développés afin de décrire les phénomènes d'adsorption. En l'occurrence, les données de sorption ont été analysées selon les modèles de Langmuir (Eq. 2.2) et Freundlich (Eq. 2.4) (Figure 3.2) :

$$\frac{C_e}{C_s} = \frac{C_e}{C_m} + \frac{1}{L \cdot C_m} \tag{Equation 2.2}$$

$$\ln C_s = \ln K_f + \frac{1}{n} \ln C_e \tag{Equation 2.4}$$

où  $C_m$  et  $K_f$  sont des constantes qui permettent d'estimer la capacité d'adsorption respectivement selon Langmuir et Freundlich, alors que  $L$  et  $n$  sont des constantes qui estiment l'affinité de l'adsorbat-adsorbant respectivement selon Langmuir et Freundlich. Les paramètres calculés sont énumérés au Tableau 3.1.

Tableau 3.1. Résultats de l'ajustement des isothermes par les modèles de Langmuir et Freundlich.

HDL/LDH	$C_s$ (mg/mg)	Langmuir			Freundlich		
		$C_m$ (mg/g)	$L$	$r$	$K_f$ (mg/g)	$n$	$r$
MgAl-CI/LDH <sub>ads</sub>	0,41	53,4	6,2	0,9860	59,3	1,7796	0,9748
ZnAl-CI/LDH <sub>ads</sub>	0,44	59,5	6,0	0,9883	71,9	1,8518	0,9530

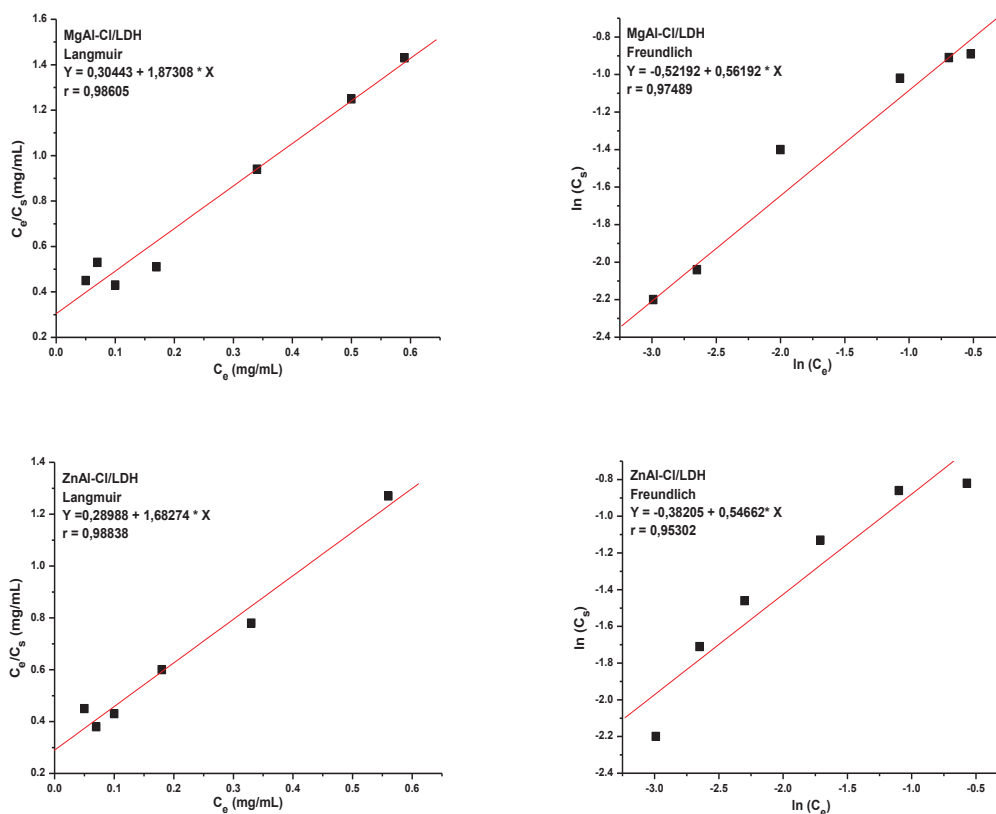


Fig. 3.2. Modélisation des isothermes d'adsorption selon les modèles de Langmuir et Freundlich.



Les valeurs de coefficients de corrélation linéaire ( $r$ ) dans le [Tableau 3.1](#) montrent que le modèle de Langmuir est plus adapté pour l'adsorption de la lactate déshydrogénase aussi bien que la capacité d'adsorption théorique est plus compatible avec les résultats expérimentaux. Cela indique que l'adsorption de l'enzyme sur les feuillettes HDL a lieu sur des sites bien définis ainsi que sur le bord des surfaces ([Sheng et Boyd, 1998 ; Khalfaoui et al., 2003](#)). Ce fait confirme que le processus d'adsorption se produit par un mécanisme d'adsorption monocouche.

Il est noté aussi que la validité de ce modèle reste discutable car il ne permet pas de rendre compte de la réalité des différents types d'interactions mis en jeu entre des objets moléculaires de taille nanométrique comme les enzymes et les matrices HDL. Il permet uniquement de comparer les capacités d'adsorption calculées avec les quantités maximales d'enzymes adsorbées au plateau, c'est-à-dire à la monocouche recouvrant la surface du support.

### 3.3.2. Caractérisations des biohybrides

#### 3.3.2.1. Diffraction des rayons X

Deux différentes matrices HDL (MgAl-Cl et ZnAl-Cl) ont été préparées pour l'immobilisation de la lactate déshydrogénase par des réactions d'échanges directs ou bien par co-précipitation. Afin de montrer leur type de caractéristique comme structure hôte, des analyses par diffraction des rayons X ont été menées ([Fig. 3.3](#)). Les diffractogrammes résultants ([Fig. 3.3A et 3.3B](#)) révèlent bien les réflexions 003, 006, 012 et 110 caractéristiques de la structure HDL. Ces réflexions peuvent être indexées dans un réseau hexagonal avec le groupe d'espace  $R\bar{3}m$ . Les paramètres de maille  $c$  et  $a$  de la structure rhomboédrique ont été déterminés à partir de la position des réflexions 003, 006 et 110 respectivement ([Tableau 3.2](#)). La réflexion 003 correspond à la distance interlamellaire et permet de calculer le paramètre  $c$  ( $c = 3/2[d_{003} + 2d_{006}]$ ) alors que la réflexion 110 située au voisinage de  $60^\circ$  en  $2\theta$  renseigne sur la distance intermétallique ou interatomique cation-cation au sein des feuillettes hydroxydes et permet de calculer de manière approximative le paramètre  $a$  ( $a = 2d_{110}$ ) ([Pérez-Ramirez et al., 2001](#)).

Cependant, les résultats cristallographiques montrent des différences importantes du fait de la présence de la lactate déshydrogénase dans le milieu de précipitation. Lors de l'échange anionique, l'allure des diffractogrammes sont peu altérés. Les paramètres de maille affinés sont proches de ceux des précurseurs ([Tableau III-2](#)). Un léger changement des espacements basaux, indiquant une distance interlamellaire de 0,76 et 0,79 nm respectivement pour les



phases MgAl–Cl/LDH<sub>ads</sub> et ZnAl–Cl/LDH<sub>ads</sub>, dénote une perte de molécules H<sub>2</sub>O à l'intérieur ou à la surface des HDL. Seules les intensités diffractées s'effondrent montrant un pourcentage de phase cristallisée plus faible dans la phase traitée par l'enzyme. L'enzyme s'échange à la surface et conduit à une adsorption plutôt qu'une intercalation comme c'est le cas pour les phosphatases alcalines (Mousty et al., 2008), trypsines (Mansouri et al., 2009), uréases (Vial et al., 2006) au sein des feuillettes HDL. En effet, l'échange anionique est structuralement sélectif, il affecte principalement la fraction du solide la moins bien ordonnée laissant la charpente hôte non perturbée.

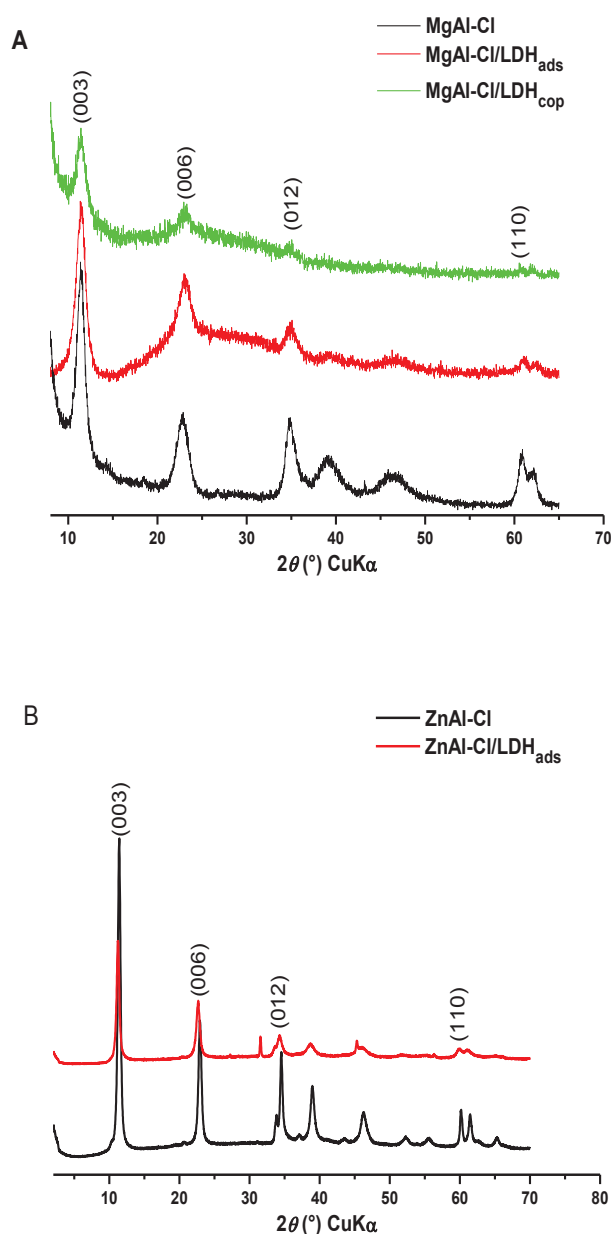


Fig. 3.3. Diffractogrammes des rayons X des phases biohybrids adsorbées et co-précipitées pour un rapport Q = 1 (A) MgAl–Cl/LDH et (B) ZnAl–Cl/LDH.

Contrairement aux phases préparées par échange, le procédé de co-précipitation n'a été utilisé que pour la phase hybride MgAl–Cl à raison que la lactate déshydrogénase a un pH optimal entre 8,8–9,8 et le caractère basique de la phase MgAl–Cl, préférant miser sur l'optimisation des conditions dans lesquelles opère l'enzyme (pour empêcher la dénaturation de l'enzyme et adapter le pH dans une activité optimum). En effet le procédé de co-précipitation conduit aux phases biohybrides les moins structurées, avec une diminution d'intensité et un élargissement des réflexions 00 $l$ . La préservation des réflexions 012 et 110 caractéristiques du feuillet HDL est constatée et confirme la formation de la phase HDL malgré l'influence importante de la lactate déshydrogénase sur la structuration de ce composé. En effet, la présence de l'enzyme entraîne à la fois une forte modification de l'ordre d'empilement des feuillets ainsi qu'une réduction de la taille des particules selon l'équation de Debye-Scherrer (Tableau 3.2). Par ailleurs, la position angulaire des réflexions 00 $l$  suggère la présence de chlorures dans les domaines interlamellaires. Comme pour l'autre procédé de synthèse, l'enzyme n'est pas insérée de manière ordonnée entre les feuillets HDL.

**Tableau 3.2.** Données cristallographiques des phases biohybrides adsorbées et co-précipitées.

Propriétés	HDL		HDL/Lac Deh		
	MgAl–Cl	ZnAl–Cl	par échange (adsorption)		par co-précipitation
			MgAl–Cl/Lac Deh <sub>ads</sub>	ZnAl–Cl/Lac Deh <sub>ads</sub>	MgAl–Cl/Lac Deh <sub>cop</sub>
Espacement basal, nm	0,780	0,782	0,769	0,792	0,771
$d_{110}$ , nm	0,152	0,153	0,152	0,154	0,152
Paramètre $a$ , nm	0,305	0,307	0,304	0,309	0,305
Paramètre $c$ , nm	2,337	2,341	2,307	2,376	2,313
Taille des cristallites* (selon la direction $c$ , nm)	21,4	32,6	14,0	27,8	6,8

\*Equation de Debye-Scherrer:  $D = k\lambda/\beta\cos\theta$  (où  $k$  désigne la constante de Scherrer ( $k = 0,9$ ),  $\lambda$  est la longueur d'onde de la radiation incidente utilisée,  $\beta$  est la largeur à mi-hauteur de la ligne de diffraction et  $\theta$  est l'angle de Bragg de la diffraction).

### 3.3.2.2. Spectroscopie infrarouge

La spectroscopie infrarouge est souvent utilisée pour identifier les groupes fonctionnels et les liaisons chimiques présentes dans les composés puisqu'il y a un nombre d'onde et une absorption spécifique pour chaque groupe fonctionnel. Par conséquent la spectroscopie infrarouge peut être utilisée pour compléter d'autres techniques et d'identifier le mécanisme d'immobilisation. Les spectres infrarouges des différentes phases biohybrides obtenues sont représentés sur la Figure 3.4. Ils coïncident avec la superposition des spectres de l'enzyme et de la matrice de référence. Ces résultats montrent la formation d'une phase biohybride HDL/Lac Deh quel que soit le mode d'association de ces deux partenaires, en favorisant la disposition de la lactate déshydrogénase sur les feuillets des matrices.

Pour toutes les phases préparées, nous observons les bandes de vibrations  $\text{-NH}_2$  (groupe amide) à  $2900\text{ cm}^{-1}$ ,  $\text{-Cs=C-}$  (groupe aromatique) autour de  $1550\text{ cm}^{-1}$ ,  $\text{C-C}$  or  $\text{C-N}$  à  $1100\text{ cm}^{-1}$  et de déformation  $\text{C-H}$  à  $950\text{ cm}^{-1}$  caractéristiques de l'enzyme (Sass et al., 1989 ; Blandino et al., 2001 ; Pereira et al., 2007) et les bandes de vibrations du réseaux HDL ( $\text{O-M-O}$  à  $427\text{ cm}^{-1}$  et  $\text{M-O}$  entre  $850$  et  $550\text{ cm}^{-1}$ ). Toutefois il n'y a pas de grandes différences observées entre les signatures de la lactate déshydrogénase libre ou immobilisée. Les bandes de vibrations sont identiques en nombres aussi bien qu'en positions ce qui confirme la préservation de la configuration spatiale de l'enzyme au sein des feuillettes HDL. La bande large à  $3400\text{ cm}^{-1}$  correspond à la vibration du groupement hydroxyle  $\text{O-H}$  présent dans les feuillettes brucitiques qui était le groupement même que pour celle à  $1640\text{ cm}^{-1}$ . Alors que la bande à  $1360\text{ cm}^{-1}$  caractéristique des groupements  $\text{-CO}_3^{2-}$  prouve la carbonatation des phases HDL/Lac Deh.

Les intensités des bandes attribuées à l'enzyme sont plus intenses pour les matériaux hybrides préparés par co-précipitation suggérant que la quantité de lactate déshydrogénase immobilisée par ce mode de synthèse est plus importante. En effet, par ce procédé par co-précipitation, la surface d'échange de la matrice HDL avec l'enzyme est beaucoup plus importante, car le solide se construit à la surface de l'enzyme. Dans le cas de l'échange, la bande située à  $1100\text{ cm}^{-1}$  semble plus intense et est due à la présence d'ions phosphates provenant du milieu aqueux tamponné utilisé pour disperser l'enzyme, l'insertion est défavorisée à la fois par la taille trop importante de l'enzyme et par la stabilité des phases HDL. Le taux d'immobilisation de la lactate déshydrogénase a été déterminé par spectroscopie UV-visible (à  $340\text{ nm}$ ). La masse d'enzyme immobilisée est calculée par soustraction de la masse d'enzyme libre en solution à la masse initiale. Pour un rapport initial  $Q = 1$ , environ 40% de la lactate déshydrogénase est immobilisée par échange, contre 98% par co-précipitation.

D'autre part l'élargissement et la diminution de l'intensité de la vibration de valence  $\text{O-H}$  pour les phases biohybrides, comparés avec ceux des références révèlent l'existence d'un réseau de liaisons hydrogènes entre l'enzyme et la matrice. L'immobilisation de la lactate déshydrogénase sur les phases HDL retient un taux d'hydratation qui permet de préserver leur intégrité structurale.

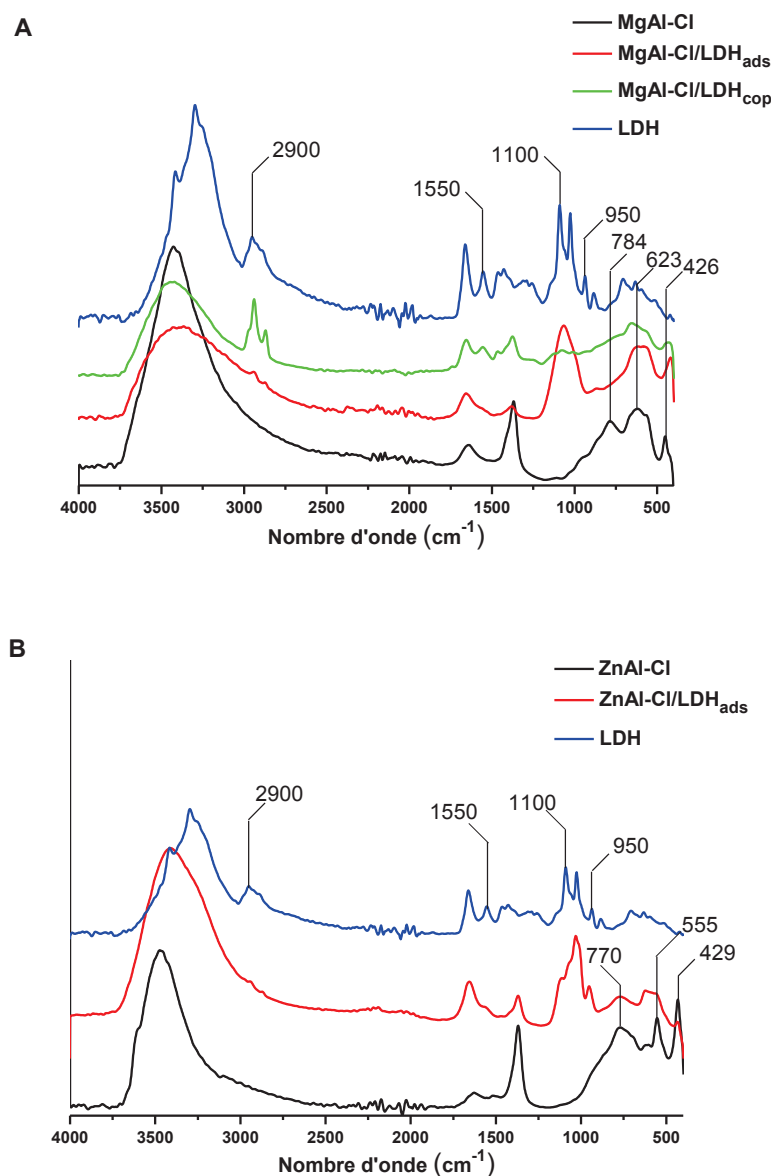


Fig. 3.4. Spectres infrarouges des phases biohybrides adsorbées et co-précipitées pour un rapport  $Q = 1$  (A) MgAl-Cl/LDH et (B) ZnAl-Cl/LDH.

### 3.3.2.3. Microscopie électronique à transmission

Pour déterminer l'effet du processus d'immobilisation de la lactate déshydrogénase sur la morphologie de la phase HDL, la morphologie de surface du HDL avant et après immobilisation a été observée. La Figure 3.5 présente les clichés MET de la phase de référence MgAl-Cl et les phases biohybrides MgAl-Cl/LDH adsorbées et co-précipitées ( $Q = 1$ ). Le nanographe du précurseur MgAl-Cl (Fig. 3.5A) indique des particules individuelles distinctes de forme hexagonale et d'une taille inférieure à 200 nm, qui entraînent la formation d'agrégats. Lors de l'échange, une légère modification au niveau de l'agrégation est observée, due à la présence d'enzymes face à face avec les agrégats HDL (Fig. 3.5B), tandis

que le cas de co-précipitation (Fig. 3.5C) ne permet plus de distinguer aussi nettement les plaquettes arrondies d'HDL, en favorisant l'affectation des agrégats HDL et mettant en évidence un film très dense du biohybride. En effet, le procédé d'échange apparaît comme un processus d'échange partiel a eu lieu sur les surfaces des cristallites HDL, alors que la présence de l'enzyme dans le milieu de précipitation s'oppose à la croissance cristalline des HDL. Les particules HDL semblent être dispersées dans un film d'enzymes, laissant penser à une forte interaction et association entre l'enzyme et les particules HDL.

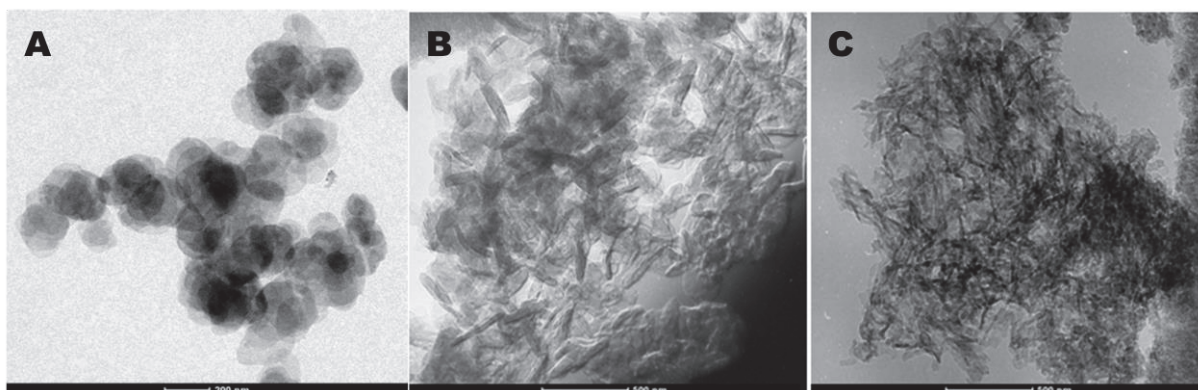


Fig. 3.5. Clichés MET de (A) MgAl-Cl, (B) MgAl-Cl/LDH<sub>ads</sub> et (C) MgAl-Cl/LDH<sub>cop</sub>.

### 3.3.3. Activité enzymatique

#### 3.3.3.1. Activité des lactates déshydrogénases libres et immobilisées

La Figure 3.6 présente les valeurs d'activité en pourcentage des lactates déshydrogénases libres et immobilisées par les phases HDL. Les activités de l'enzyme immobilisée restent inférieures, quelle que soit la méthode d'immobilisation, à l'activité de l'enzyme libre qui a été fixé à 100% comme référence. Toutefois, ce sont les phases obtenues par échange qui présentent les meilleurs résultats. Cela signifie qu'il y a une perte partielle de l'activité de la lactate déshydrogénase au cours de la réaction chimique d'immobilisation. Diverses études (Chaubey et al., 2001 ; Li et al., 2002 ; Saengdee et al., 2015) concernant l'immobilisation de la lactate déshydrogénase ont été publiées dans la littérature montrant que l'activité spécifique de cette dernière diminuait après immobilisation du fait que les matrices d'immobilisation subissent un effondrement au cours de l'inclusion de l'enzyme, limitant ainsi l'accessibilité du substrat. Cependant, les réponses de l'enzyme vis-à-vis de l'ajout du substrat ont changé d'une phase à une autre. Cette variation est attendue du fait de l'influence du mode d'immobilisation de la lactate déshydrogénase et de la nature de la matrice d'accueil ( $Zn^{2+}$  est un cofacteur métallique pour la lactate déshydrogénase). En effet, jusqu'à 75% et 78% de l'activité de l'enzyme libre est atteinte par les phases échangées MgAl-Cl et ZnAl-Cl respectivement, ce qui constitue un résultat satisfaisant par rapport à celle atteinte par la phase

co-précipitée MgAl–Cl qui ne présente plus que 44% de l'activité de l'enzyme libre. Contrairement à la co-précipitation qui suggère une forte adsorption du substrat, ces résultats prouvent l'accessibilité du substrat au site actif de l'enzyme en cas de formation par l'échange direct. Mansouri et al., (2009) ont montré ainsi que plus l'affinité avec la structure hôte augmente plus l'enzyme perd de son activité. Cette perte d'activité s'explique par une immobilisation plus efficace au cours de la co-précipitation par rapport à l'échange direct.

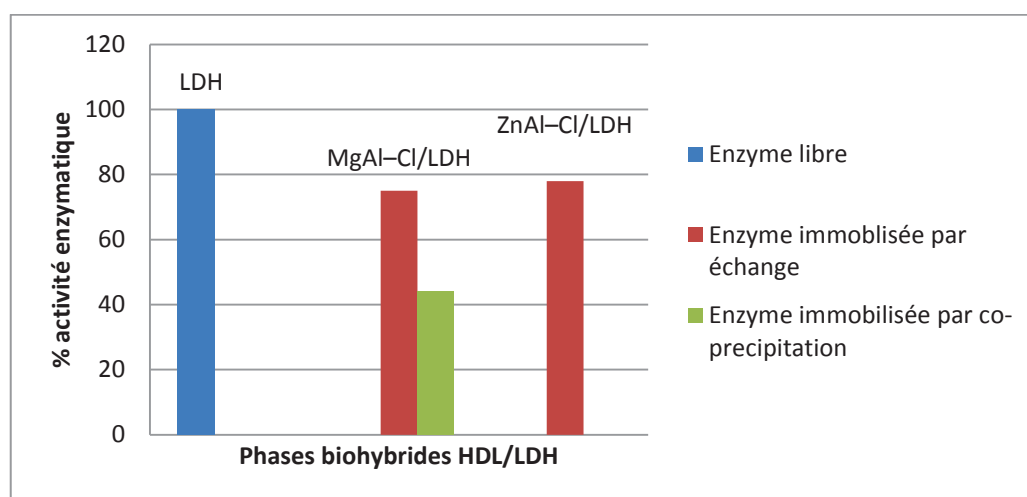


Fig. 3.6. Comparaison de l'activité enzymatique de la lactate déshydrogénase libre et immobilisée.

### 3.3.3.2. Réponse cinétique

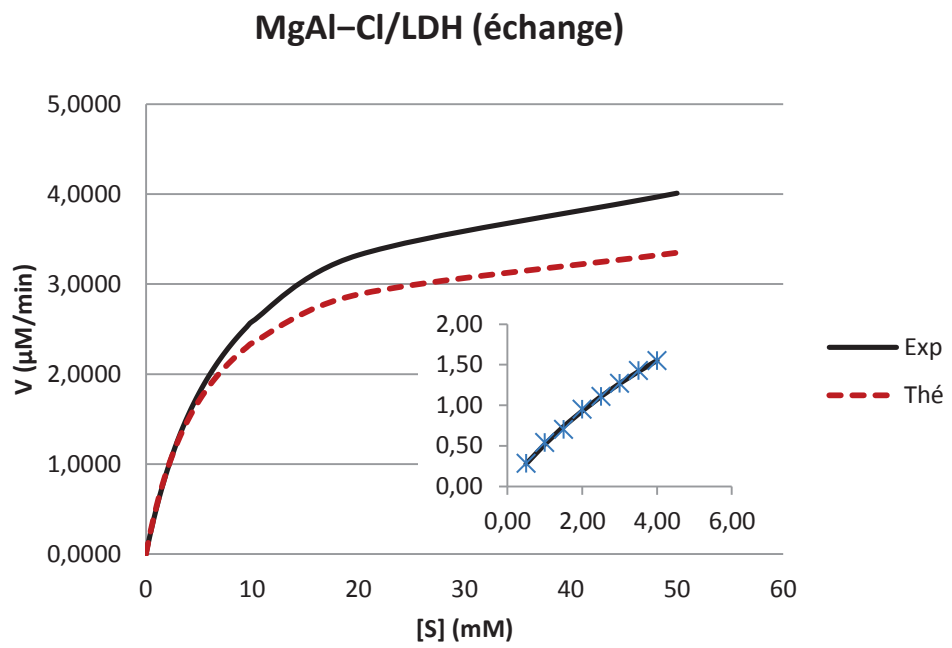
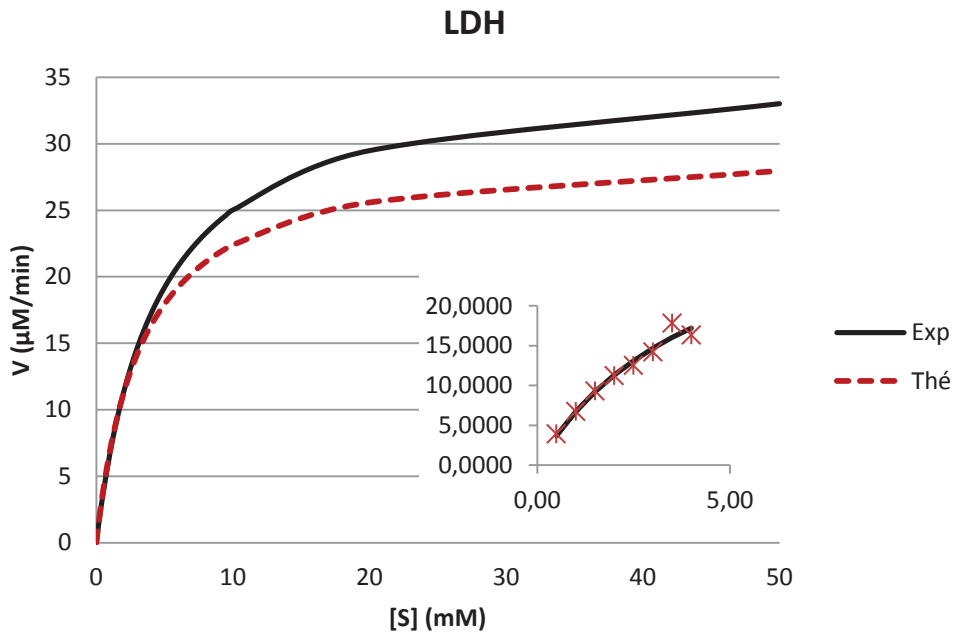
Pour mieux comprendre la chute de l'activité après immobilisation, nous avons étudié l'évolution de la vitesse de la réaction enzymatique en fonction de la concentration du substrat (0,5 à 4 mM) avant et après immobilisation (Fig. 3.7), afin de déterminer les paramètres cinétiques  $K_M$  et  $V_{max}$ .

Traditionnellement, les estimées des valeurs cinétiques,  $K_M$  et  $V_{max}$  peuvent également être déterminées à partir de la linéarisation des hyperboles obtenues dans la Figure 3.7 conduisant aux représentations de Lineweaver-Burk (Eq. 2.7) ( Fig. 3.8) qui linéarisent l'équation de Michaelis-Menten (Eq. 2.6).

$$V = \frac{V_{max} \cdot [S]}{[S] + K_M} \quad \text{Equation 2.6}$$

(Utilisée sous forme linéarisée):

$$\frac{1}{V} = \frac{K_m}{V_{max} \cdot [S]} + \frac{1}{V_{max}} \quad \text{Equation 2.7}$$



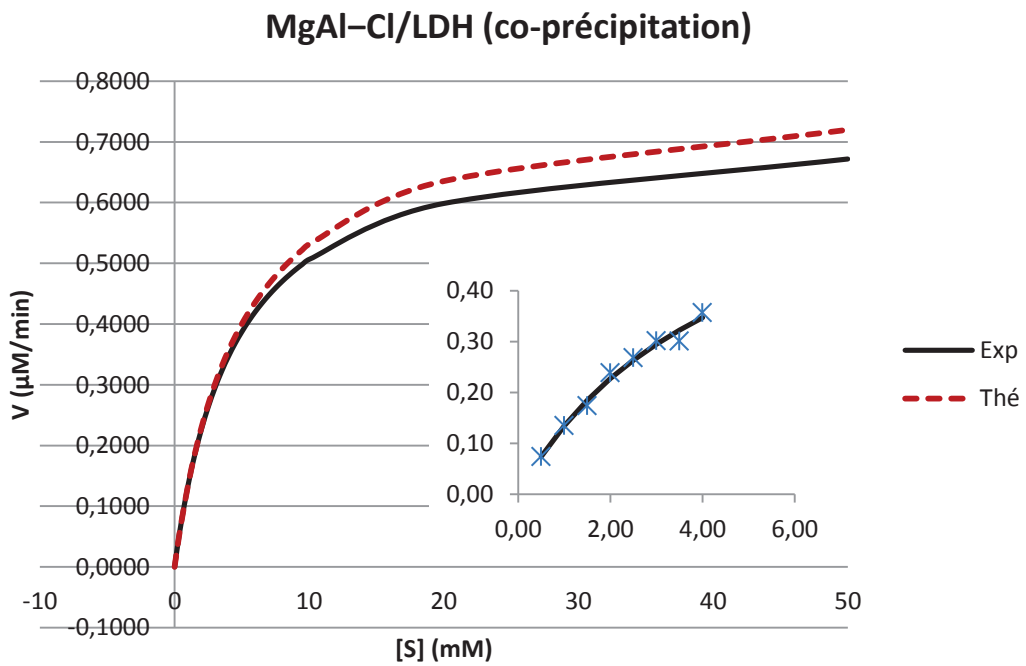
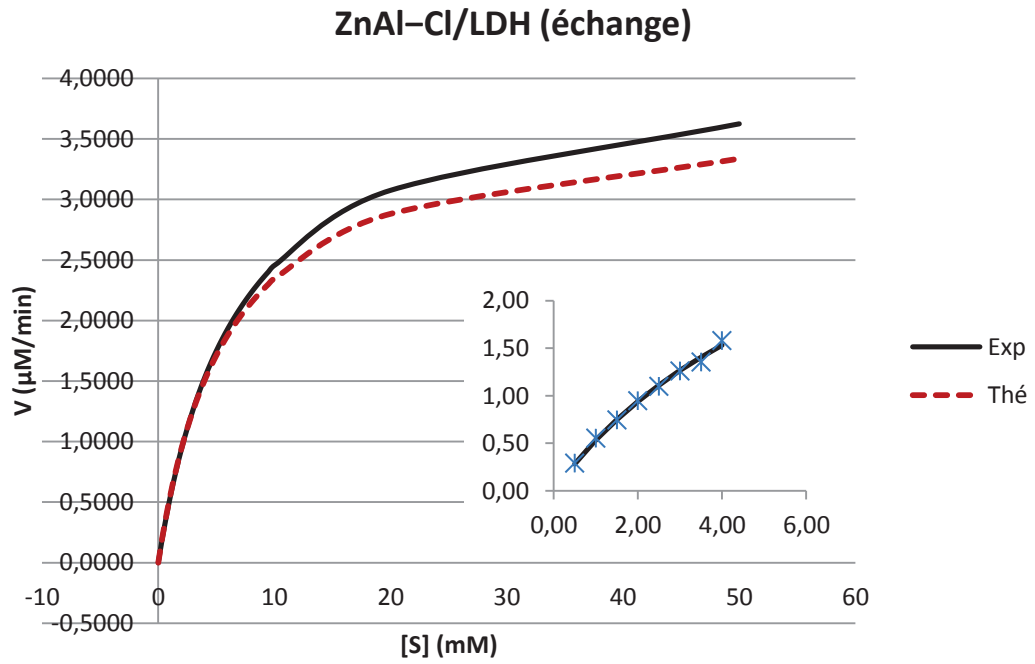


Fig. 3.7. Représentation graphique des  $V$  en fonction de la concentration en substrat  $[S]$  de la lactate déshydrogénase libre et immobilisée.



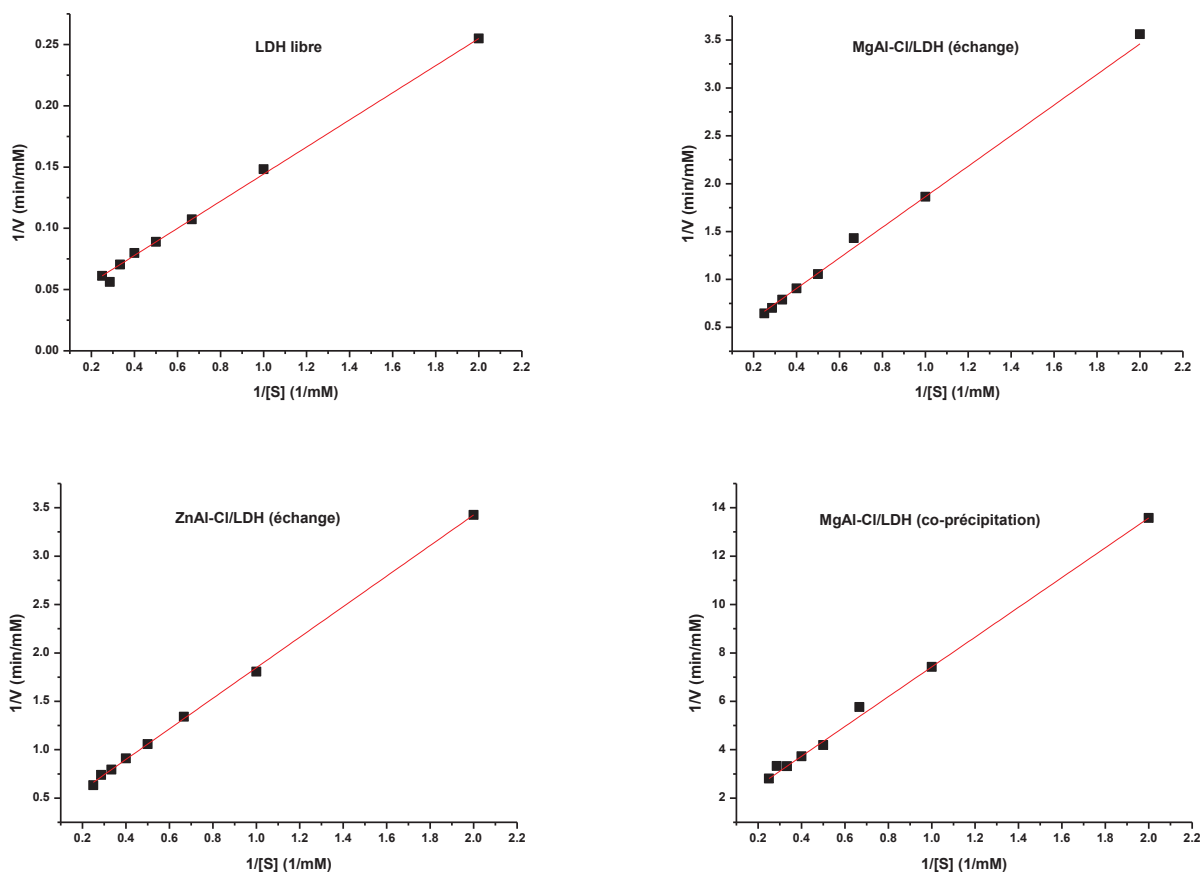


Fig. 3.8. Représentations graphiques de Lineweaver-Burk des mesures cinétiques de la lactate déshydrogénase libre et immobilisée.

Le [Tableau 3.3](#) nous permet de comparer le cas de l'enzyme libre et celle immobilisée en tant que catalyseur de la conversion du lactate en pyruvate. Normalement, les valeurs de  $K_M$  sont plus élevées et les valeurs de  $V_{max}$  sont plus faibles pour les enzymes immobilisés que celles des enzymes libres, cela concorde avec les travaux antérieurs ([Bulmu et al., 1997](#) ; [Li et al., 1998](#) ; [Blandino et al., 2001](#) ; [Chaubey et al., 2001](#) ; [Li et al., 2002](#)). Cependant, la valeur élevée de  $K_M$  de l'enzyme immobilisée est le plus probablement causée par la dénaturation partielle de l'enzyme due à un changement de conformation, engendré par les interactions avec la matrice hôte. Ces modifications structurales conduisant à une déformation du site actif de l'enzyme qui perd son affinité spécifique et à un empêchement stérique vis-à-vis du substrat. La diminution de  $V_{max}$  pourrait être souvent le résultat du changement de l'efficacité catalytique dans les formes immobilisées. La différence de  $K_M$  et  $V_{max}$  à travers les différentes formulations lors de l'échange et la co-précipitation peut être attribuée à un blocage de l'accessibilité au site actif de l'enzyme, dû à un assemblage enzyme/matrice défavorable empêchant la diffusion du substrat ou bien encore un taux d'agrégation élevé d'enzymes.

Tableau 3.3. Les paramètres cinétiques de la lactate déshydrogénase libre et immobilisée.

Formulations	$K_m$ (mM)	$V_{max}$ ( $\mu\text{M}/\text{min}$ )
LDH libre	3,30 (4,33)*	29,81 (35,88)*
MgAl–Cl/LDH (échange)	5,98 (7,99)*	3,75 (4,65)*
ZnAl–Cl/LDH (échange)	5,88 (6,75)*	3,73 (4,11)*
MgAl–Cl/LDH (co-précipitation)	4,86 (4,43)*	0,79 (0,73)*

\*Les valeurs de  $K_m$  et  $V_{max}$  estimés à partir des modèles hyperboliques de la cinétique michaelienne.

### 3.3.4. Corrélation entre structure/microstructure et activité enzymatique

A la lumière des résultats décrits ci-dessus, nous avons essayé d'établir une corrélation entre structure/microstructure et les activités enzymatiques des phases biohybrides élaborées. Afin de discriminer l'influence du mode d'immobilisation nous avons comparé les résultats obtenus lors de l'échange direct et la co-précipitation. Une teneur élevée en enzyme sur la surface cible n'implique pas un processus d'immobilisation réussi. Il est également nécessaire de déterminer l'activité enzymatique, qui est l'un des points clés dans le développement des biocapteurs enzymatiques. Cependant, l'effet de l'association lactate déshydrogénase/HDL sur l'activité catalytique de l'enzyme peut être étudié en comparant l'évolution cristalline des phases en présence de l'enzyme. Toutefois, les résultats structuraux et morphologiques obtenus prouvent que la co-précipitation affecte fortement la croissance cristalline des phases HDL avec la création de défauts d'empilement et une distorsion structurale au niveau des feuillets. En effet, les liaisons créées au cours de la co-précipitation diminuent l'activité biologique de l'enzyme et provoque un changement de conformation et un empêchement stérique limitant l'accessibilité du substrat au site catalytique de l'enzyme. En revanche, lors de l'échange direct, l'enzyme est plus libre de créer un environnement plus propice à son activité. La Figure 3.9 illustre les configurations possibles pouvant être atteintes au cours de l'interaction entre le matériau hôte HDL et la lactate déshydrogénase.

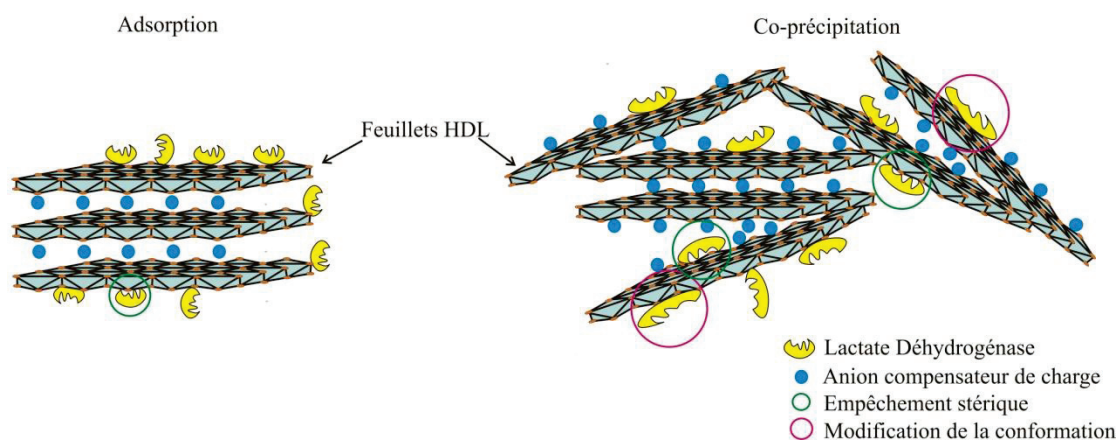


Fig. 3.9. Schéma représentatif de l'association HDL–lactate déshydrogénase.

### III-4. Conclusion

Des nouveaux matériaux bioinorganiques HDL/enzyme ont été synthétisés par immobilisation de la lactate déshydrogénase sur les phases MgAl–Cl et ZnAl–Cl HDL à travers des échanges direct (adsorption) et co-précipitation. Le rôle des cations métalliques constitutifs des feuillettes HDL sur l'interaction HDL–enzyme et en conséquence sur l'activité catalytique de l'enzyme a été étudié. Différentes techniques de caractérisations ont été mobilisées pour l'étude des phases biohybrides élaborées, Il est montré qu'un mécanisme d'adsorption est obtenu plutôt qu'une incorporation entre les feuillettes. En effet, les expériences d'échange ont mis en évidence la forte affinité de la lactate déshydrogénase pour les feuillettes HDL, l'échange est donc un mécanisme d'échange anionique partiel qui conduit à l'adsorption des biomolécules à la surface de particules d'HDL. En revanche, la co-précipitation de la matrice MgAl–Cl dans une solution de lactate déshydrogénase a permis d'immobiliser une quantité d'enzyme beaucoup plus importante. L'accumulation d'enzyme se fait en multicouches sur les feuillettes conduisant à une exfoliation de ces feuillettes. Cependant, l'activité enzymatique de la lactate déshydrogénase a diminué lors de son immobilisation. Cette perte est due soit à (i) un blocage des sites actifs engendré par la gêne stérique de l'HDL, (ii) l'accumulation de l'enzyme sur les phases HDL ou bien encore au (iii) changement de la conformation de l'enzyme limitant la diffusion du substrat vers le site actif de l'enzyme. En effet, les tests effectués sur les suspensions d'échange semblent plus appropriés pour un usage fonctionnel de l'enzyme. Toutefois, tous ces résultats préliminaires révèlent les potentialités de l'usage d'HDL comme structure hôte, pour une immobilisation de la lactate déshydrogénase, compatible avec la conservation de l'activité enzymatique, démontrant ainsi l'important potentiel d'application des HDL dans des biotechnologies avancées telles que les biocapteurs et les biopiles enzymatiques.

#### Remerciements

Je veux manifester ma gratitude à **Aisha Gharsalli** de "*LECOM School of Dental Medicine, FL 34211, USA*", qui a gracieusement offert l'aide linguistique nécessaire à la publication de ce travail.

# Préparation et optimisation d'un nouveau matériau hybride Berbérine – Hydroxyde Double Lamellaire en tant que système de libération contrôlée

4.1	<u>INTRODUCTION</u>	66
4.2	<u>PROTOCOLES ET TECHNIQUES EXPERIMENTAUX</u>	68
4.2.1	<u>Synthèse des biohybrides BBR–HDL par des réactions d'échanges</u>	68
4.2.2	<u>Synthèse des biohybrides BBR–HDL par co-précipitation</u>	69
4.2.3	<u>In-vitro libération de la berbérine</u>	69
4.2.4	<u>Techniques de caractérisations</u>	70
4.2.5	<u>Etude de l'activité anti-bactérienne</u>	70
4.3	<u>RESULTATS ET DISCUSSIONS</u>	71
4.3.1	<u>Isotherme d'adsorption</u>	71
4.3.2	<u>Caractérisations des biohybrides</u>	75
4.3.2.1	<u>Diffraction des rayons X</u>	75
4.3.2.2	<u>Spectroscopie infrarouge</u>	77
4.3.2.3	<u>Microscopie électronique à balayage</u>	78
4.3.2.4	<u>Analyse de surface</u>	79
4.3.3	<u>Cinétique de libération</u>	80
4.3.4	<u>Test anti-bactérien des biohybrides synthétisés</u>	82
4.3.5	<u>Etude approfondie de la co-précipitation</u>	83
4.3.5.1	<u>Caractérisation structurale</u>	83
4.3.5.2	<u>Caractérisation microscopique</u>	86
4.3.5.3	<u>Libération in-vitro de BBR</u>	87
4.3.5.4	<u>Biocompatibilité: étude anti-bactérienne</u>	90
4.3.5.1	<u>Corrélation entre structure/microstructure, profil de libération et activité anti-bactérienne</u>	92
4.4	<u>CONCLUSION</u>	93

## Préparation et optimisation d'un nouveau matériau hybride Berbérine – Hydroxyde Double Lamellaire en tant que système de libération contrôlée

Mohamed Amine Djebbi, Alae Elabed, Zaineb Bouaziz, Moulay Sadiki, Soumya Elabed, Philippe Namour, Nicole Jaffrezic-Renault et Abdesslem Ben Haj Amara

**Résumé** Les hydroxydes doubles lamellaires (HDL) suscitent aujourd'hui un intérêt considérable en tant que l'un des plus diversifiés systèmes d'administration des médicaments, notamment du fait de leur capacité d'adsorption et/ou de la propriété de libération contrôlée de principes actifs en raison de la combinaison de plusieurs propriétés issue de la synergie entre les matériaux biohybrides. De nouveaux composés hybrides organiques-inorganiques ont été élaborés par immobilisation du chlorure de berbérine (BBR) classée comme agent antibactérien dans MgAl et ZnAl HDLs. Le présent chapitre rend compte du travail entrepris dans le but de développer des nouvelles formulations pour la vectorisation de la BBR afin d'évaluer le potentiel antibactérien au cours de libération des molécules de BBR. Dans un premier temps, le chlorure de berbérine a été immobilisé sur des matrices MgAl par des réactions d'échange et co-précipitation. Les essais d'échanges ont été effectuée en accordant une attention particulière à l'influence de la densité de charge des feuillettes, la nature de l'anion interlamellaire intercalée et la morphologie de la matrice. L'affinité de la biomolécule avec la matrice dépend largement des facteurs étudiés ainsi que de la méthode d'immobilisation. Dans un deuxième temps, la matrice ZnAl a été co-précipitée en présence du berbérine par variant la masse de BBR vis-à-vis la masse de l'HDL afin de suivre la croissance cristalline de la phase biohybride. Les produits obtenus lors de ces différentes synthèses ont été caractérisé d'un point de vue structural (DRX, IR), d'un point de vue morphologique (MEB, MET) et en termes de surface de contact (angle de contact). L'immobilisation de BBR a lieu à la surface des cristallites HDL. Cependant la mise en suspension dans un milieu aqueux tamponné a montré une forte rétention de la biomolécule sur les phases co-précipitées. L'étude in-vitro de l'activité anti-bactérienne a été testé sur des souches multi-résistantes: *Staphylococcus aureus* CIP 543154, *Pseudomonas aeruginosa* A22 et *Bacillus subtilis* ILP 1428B. La sensibilité des souches aux différentes formulations a été réalisée par la technique de diffusion en milieu agar. Toutefois, ces résultats prouvent que les formulations biohybrides préparées préservent le caractère antibactérien de berbérine et ils représentent donc une menace éventuelle du fait de taux de libération.

**Mots-clés** **Hydroxyde double lamellaire (HDL), chlorure de berbérine (BBR), système d'administration des médicaments, immobilisation, contrôle de libération, activité anti-bactérienne.**

**Abstract** Layered double hydroxide (LDH) has attracted major interest as one of the most versatile drug delivery systems (DDS) especially for adsorption capacity and/or controlled delivery property of bioactive agents owing to their combining features of bionanohybrid. In this work, berberine chloride (BBR) class antibacterial agent was immobilized into magnesium-aluminum and zinc-aluminum LDH in order to improve the drug efficiency as well as to achieve the controlled release property. First, BBR molecules were immobilized into MgAl LDH through a conventional ion exchange reaction and co-precipitation method. The ion-exchange experiments of BBR on MgAl LDH were investigated with particular attention paid to the influence of the layer charge, the nature of the intercalated anion and the morphology. The affinity of the BBR molecules to the LDH matrix was dependent upon the LDH properties and

the immobilization process. And second, ZnAl precursor was co-precipitated in the presence of the BBR molecules by varying the amount of the BBR over the LDH in order to monitor the crystal growth of the biohybrid phase. Characterization by powder x-ray diffraction, Fourier transform infrared spectroscopy, scanning electron microscopy and contact angle measurements revealed that the interaction of BBR with both MgAl and ZnAl LDH occurs by adsorption rather than intercalation of BBR within LDH layers. In vitro anti-bacterial tests against three pathogenic bacteria: *Staphylococcus aureus* CIP 543154, *Pseudomonas aeruginosa* A22 and *Bacillus subtilis* ILP 1428B, were carried out using disc diffusion assay to prove the effectiveness of these novel biohybrid beads as a controlled drug delivery method. Nonetheless, the BBR–LDH co-precipitated formulation revealed an enhanced anti-bacterial activity not only due to an improvement of chemical stability and retained amount of BBR molecules but also due to the release property and are therefore potential modified drug delivery system (DDS).

**Keywords** Layered double hydroxide (LDH), berberine chloride (BBR), drug delivery system (DDS), immobilization, controlled release, anti-bacterial activity.

## 4.1. Introduction

Au cours des dernières années, le développement révolutionnaire de la nanomédecine a émergé comme l'un des domaines de recherche les plus importants en sciences biomédicales. Ce secteur technologique interdisciplinaire est la combinaison à la fois de technologies médicales traditionnelles et de la nanotechnologie dans lequel les matériaux de dimension nanométriques sont exploités (Tan et al., 2015). En particulier, les minéraux argileux ayant fait l'objet d'un grand nombre de recherche dans le monde entier non seulement en tant que matériaux écologiques mais également du fait de leur rôle clé comme vecteurs dans les formulations pharmaceutiques (Gereli et al., 2006). La part minérale pourrait contribuer à contrôler l'activité du médicament en augmentant ou diminuant sa biodisponibilité après administration (Wai et al., 1966 ; Qtaitat, 2004 ; Gereli et al., 2006).

La berbérine BBR (Fig. 4.1) est un alcaloïde<sup>1</sup> du groupe des isoquinolines, extrait de la famille des Berbéridacées comme *Berberis vulgaris* (épine-vinette), ou des Ranunculacées telles que *Coptis chinensis* et *Hydrastis canadensis* utilisées historiquement dans la pharmacopée asiatique (Ayurveda et la médecine traditionnelle chinoise) (Tan et al., 2011).

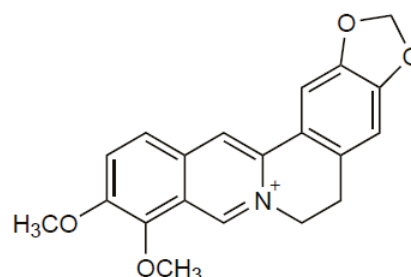


Fig. 4.1. Photo de l'épine-vinette (*Berberis vulgaris*) et structure chimique de la berbérine (BBR),  $M_{\text{BBR}} : 371.81 \text{ g/mol}$ .

Utilisée sous forme de chlorure, la BBR entre dans la pharmacopée en tant que constituants de la plupart des préparations pharmaceutiques pour ses propriétés biologiques anti-cancéreuse, anti-diabétique, anti-fongique, anti-inflammatoire et anti-oxydante (Tang and Eisenbrand, 1992 ; Yin et al., 2008 ; Zhao et al., 2010 ; Liu et al., 2011 ; Zhang et al., 2011 ; Bandyopadhyay et al., 2013 ; Wojtyczka et al., 2014), elle est également introduite en tant qu'agent anti-bactérien ou anti-diarrhéique dans le traitement de diarrhées et les infections du tube digestif causées par les bactéries (Vuddanda et al., 2010). Ainsi, la BBR a démontré une efficacité contre différentes souches de bactéries telles que le *Vibrio cholerae* (choléra), *Shigella*, et *Salmonella*, mais aussi les genres *Staphylococcus*, *Streptococcus* et *Clostridium* et un protozoaire flagellé (Hexamitidae) : *Giardia intestinalis* responsable de la giardiase



(Cernáková et Kostálová, 2002 ; Vuddanda et al., 2010). La biodisponibilité globale de BBR est assez faible, inférieur à 5% (Maeng et al., 2002 ; Pan et al., 2003) 0,68% ayant été rapporté chez le rat (Chen et al., 2011). Les études utilisant des doses de BBR de 1,000-1,500 mg seuls semblent toujours exercer des inconvénients après l'absorption. Du fait de sa faible absorption par le corps humain, des doses élevées de BBR peuvent entraîner des effets secondaires intestinaux (Preeti et al., 2015). L'administration et la libération contrôlée de la BBR permettrait d'améliorer l'absorption de la BBR afin d'avoir des doses thérapeutiques sans effets secondaires préjudiciables.

Les argiles telles que les hydroxydes doubles lamellaires (HDL) peuvent être considérées comme des adsorbants sélectifs pour les formulations à libération contrôlée en vue d'améliorer la tolérance à la BBR. En effet, les HDL ont trouvé des applications pharmaceutiques diverses (Choy et al., 2007 ; Ay et al., 2011 ; Chakraborty et al., 2013 ; Rives et al., 2014 ; Kuthati et al., 2015 ; Liu et al., 2015 ; Meng et al., 2015 ; Park et al., 2015). La structure lamellaire des HDL découle de celle de la brucite  $M(OH)_2$ , dans laquelle une fraction de l'élément métallique divalent est substitué par un métal trivalent. Une telle substitution crée ainsi un excès de charge positive sur le feuillet et la formule générale peut être définie comme suit :  $[M^{II}_{1-x}M^{III}_x(OH)_2]^{x+}[(A_{x/n})^n \cdot yH_2O]$  (voir bibliographie). Le vif intérêt pour les HDL est fondé sur la capacité d'adsorption/libération due à ses uniques propriétés structurales, y compris la composition chimique variée, la structure ouverte et la large surface spécifique. En outre, les HDL possèdent des propriétés essentielles, telles que la biocompatibilité, non-toxicité, non-allergénicité (Del Hoyo, 2007 ; Cunha et al., 2016 ; Senapati et al., 2016), la stabilité chimique et une solubilité dépendante du pH (Kuthati et al., 2015) qui peuvent offrir une solution beaucoup moins onéreuse pour plusieurs inconvénients médicaux.

Une recherche dans la littérature sur la base des données "Web of Science", a révélé un total de 63 rapports en 2016, abordant l'étude pharmacocinétique de la berbérine. Les plus communs étudient les problèmes de l'administration de BBR. Comme ci-mentionné précédemment, les éventuels usages thérapeutiques de la BBR sont limités par son goût amer (Wang et al., 2016) et sa faible biodisponibilité, principalement dus à sa faible absorption. Compte tenu de la nécessité d'améliorer l'absorption de la BBR certaines études ont exploré l'utilisation des promoteurs de perméation, y compris les épices, les promoteurs à base de peptides, tensioactifs, et des polymères (Aungst, 2000 ; Fan et al., 2013), inhibiteurs de la glycoprotéine P (abrégé en tant que P-gp) (Chen et al., 2011) et des systèmes de libération à base des microparticules telles que les nano/micro-émulsions, micelles, liposomes et des



nanoparticules lipidiques solides (Zhu et al., 2013), afin de résoudre ce problème (Liu et al., 2016). Cependant, un seul rapport décrivant l'amélioration de la biodisponibilité de la BBR par un minéral argileux proposé par Rytwo et al. (2010). Malgré l'énorme diversité des travaux, à notre connaissance, aucune étude n'a été faite sur la biodisponibilité et la libération de BBR par des matrices inorganiques tels que les HDL. Le présent chapitre présente un travail exhaustif fondé sur la pertinence d'HDL comme un système de libération contrôlée pour la BBR, pour lequel nous avons spécifiquement étudié l'influence du processus d'immobilisation de la BBR dans des HDL MgAl et ZnAl sur sa cinétique de libération. L'élaboration des biohybrides BBR–HDL a été réalisée dans des conditions de chimie douce: réaction d'échange ou adsorption de BBR dans le précurseur HDL et confinement par précipitation de la phase HDL en présence de BBR afin de préserver la structure de la berbérine et donc son activité. Une étude approfondie et comparative de ces procédés a été réalisée en vue de comprendre et de maîtriser la formation du biohybride BBR–HDL, et de contrôler le taux de libération de BBR, tenant compte des paramètres suivants: l'effet de charge des feuillets; l'effet de l'anion intercalée; l'effet de la surface spécifique et l'effet de rapport BBR:HDL, afin de définir un biohybride BBR–HDL modèle fournissant un système d'administration performant.

## 4.2. Protocoles et techniques expérimentaux

### 4.2.1. Synthèse des biohybrides BBR–HDL par des réactions d'échanges

Typiquement, 50 mg de HDL (MgAl) sont mis en suspension dans 10 mL d'une solution de BBR préalablement dissous dans l'eau déionisée à différentes concentrations (0 – 5 mg/mL) sous agitation magnétique pendant 15 min à 37° C pour faciliter sa solubilisation. Ensuite, la suspension est vigoureusement agitée pendant 24 h dans un réacteur fermé à 37° C avec pH<sub>i</sub> 9,0. Après, la suspension colloïdale est centrifugée à 3500 tr/min, lavée avec de l'eau déionisée afin de séparer la phase biohybride BBR–HDL et le surnageant contenant la BBR non adsorbée par l'HDL et puis laissée sécher à température ambiante pendant 24 h. Le système résultant est nommé BMAE. Le surnageant est alors analysée par spectroscopie UV-vis à 420 nm, longueur d'onde d'absorption maximale de la BBR. Les essais sont répétés trois fois à chaque débit et la moyenne des résultats est calculée afin d'obtenir des résultats statistiquement valides. En outre, ces essais ont été optimisés en fonction de: l'effet de charge (rapport molaire Mg<sup>2+</sup>:Al<sup>3+</sup>), l'anion interlamellaire (Cl<sup>-</sup> et CO<sub>3</sub><sup>2-</sup>) et la morphologie (précurseur préparée par co-précipitation et par méthode d'urée).

---

Selon la nomenclature IUPAC: le 5,6-dihydro-9,10-dimethoxybenzo[g]-1,3-benzodioxolo[5,6-a]quinolizinium, CAS: 2086-82-1

### 4.2.2. Synthèse des biohybrides BBR–HDL par co-précipitation

Le protocole est similaire à celui utilisé pour la préparation des HDL de référence mais dans un volume plus réduit (voir méthodologie). Brièvement, 10 mL de chlorures métalliques  $MgCl_2$  or  $ZnCl_2$  et  $AlCl_3$  de concentration totale 0,1 M (avec un rapport molaire  $M^{2+}:Al^{3+}$  de 2) et une solution aqueux de soude (0,2 M) sont ajoutés simultanément avec un débit constant dans un réacteur contenant une solution aqueuse de BBR (10 mL) à différentes concentrations afin d'obtenir un pH de consigne constant tout au long de la réaction,  $9 \pm 0,3$  et  $7,5 \pm 0,3$  respectivement, pour les phases MgAl et ZnAl. Q désigne le rapport théorique massique définit comme le rapport de BBR sur la masse d'HDL théorique formé à partir du chlorure ajouté. Le système est maintenu avec agitation vigoureuse et sous atmosphère d'azote pendant 24 h. Ensuite, les précipités sont recueillis et entreposés en suivant la même procédure décrite ci-dessus et les produits finaux sont nommés BMAC et BZAC, respectivement pour les phases à base de magnésium et zinc. Les rendements de synthèses des phases biohybrides sont donnés sur la [Tableau 4.1](#).

**Tableau 4.1.** Rendement de synthèse des formulations biohybrides.

Formulation	BBR/HDL ( $Q_{th}$ )	% BBR ( $Q_{exp}/Q_{th}$ , %)	% HDL	BBR/HDL ( $Q_{exp}$ )
BMAC	1:20 (0,05)	99	98	0,05
	1:4 (0,25)	99	99	0,25
	1:2 (0,50)	97	88	0,55
	1:1 (1,0)	93	81	1,14
BZAC	1:20 (0,05)	99	99	0,05
	1:8 (0,125)	99	99	0,125
	1:4 (0,25)	98	97	0,25
	1:2 (0,5)	95	90	0,52
	1:1 (1,0)	91	89	1,02

### 4.2.3. In-vitro libération de la berbérine

Les essais de libération de la BBR à partir des phases biohybrides échangées BMAE et co-précipitées BMAC et BZAC ont été réalisées dans un milieu aqueux tamponné saline (0,1 M, pH 7,4) à 37° C et sous agitation lente continue de 100 tr/min. Typiquement, 10 mg de la biohybride sont dispersée dans 20 mL de la solution tampon phosphate (0,1 M, pH 7,4). 5 mL de surnageant sont ensuite prélevés et remplacés par le même volume de tampon phosphate; l'expérience est réalisée à différents intervalles de temps pendant 200 min et les quantités cumulées de BBR libérées sont dosées par spectroscopie UV-vis à 420 nm.

#### 4.2.4. Techniques de caractérisations

Les diffractogrammes de rayons X ont été enregistrés sur un diffractomètre Bruker D8 Advance, équipé d'une anticathode au cuivre ( $\lambda = 1,54060 \text{ \AA}$ ), d'un monochromateur avant en germanium, pour un pas angulaire de  $0,02^\circ$  en 2 $\theta$  et un temps de comptage de 31,50 s. Les signaux infrarouges ont été enregistrés en mode absorbance à l'aide d'un spectrophotomètre à transformée de Fourier Nicolet 200 FTIR (Thermo Scientific) dans une gamme de fréquences comprises entre  $400 \text{ cm}^{-1}$  et  $4000 \text{ cm}^{-1}$ . Les clichés de microscopie électronique en balayage et en transmission ont été obtenus respectivement à l'aide d'un Quanta 200 FEI (FEI Corp., USA) à 10 kV et Jeol JSM-5400 à 15 kV pour MEB et FEI Tecnai G2 à 200 kV pour MET. Les déterminations quantitatives de BBR immobilisées et libérées ont été acquises par spectrophotomètre UV-vis de type Shimadzu UV mini-1240. Les mesures de mouillabilités des surfaces ont été déterminées à l'aide d'un appareil Contact Angle Metre Digidrop GBX. La surface spécifique a été déterminée par des mesures d'adsorption-désorption d'azote sur un ASAP 2020 Gas Adsorption Instruments. Avant traitement, les échantillons ont été dégazés pendant 2 h sous un vide de  $10^{-2}$  torr environ, à  $200^\circ \text{ C}$ .

#### 4.2.5. Etude de l'activité anti-bactérienne

L'activité antibactérienne des différentes formulations biohybrides est évaluée sur trois souches bactériennes pathogènes *S. aureus* CIP 543154, *P. aeruginosa* A22 et *B. subtilis* ILP 1428B par la méthode de diffusion en milieu gélosé telle que décrite par Heatley (1966). A partir de colonies jeunes de 18 à 24 h, une suspension bactérienne est réalisée dans l'eau distillée stérile pour chaque souche. La turbidité de cette suspension est ajustée à 0,5 McFarland puis diluée au 1/100. On obtient alors un inoculum estimé à  $10^6$  unités formant colonie par millilitre (ufc/ml). Cet inoculum estensemencé par inondation sur des boîtes de Pétri contenant la gélose Luria-Bertani.

Les disques (5 mm de diamètre) imprégnés de différentes fractions biohybrides sont ensuite délicatement déposés à la surface de la gélose. Il en est de même pour les disques de BBR. Les boîtes de Pétri sont d'abord laissées pendant 1 h à la température ambiante pour une pré-diffusion des substances, avant d'être incubées à  $37^\circ \text{ C}$  à l'étuve pendant 24 h (Adesokan et al., 2007). L'activité antibactérienne est déterminée en mesurant le diamètre de la zone d'inhibition autour de chaque disque (Doughari et al., 2007).

### 4.3. Résultats et discussions

#### 4.3.1. Isothermes d'adsorption

En présence d'un sel d'ammonium quaternaire à l'origine de l'activité bactérienne, la BBR a été choisie comme une biomolécule modèle pouvant être aisément introduite et stabilisée par des matrices HDL dans le but d'une administration contrôlée du principe actif au fil de temps dans les formulations des médicaments. L'affinité entre les molécules de BBR et les matrices HDL a été étudiée à l'aide des isothermes d'adsorption lors desquels la quantité de BBR adsorbée  $C_s$  (mg/mg) est suivie en fonction de la concentration à l'équilibre en solution  $C_e$  (mg/ml) où :

$$C_s = (C_i - C_e) \frac{V}{m} \quad \text{Equation 2.1}$$

avec :

$C_i$  (mg/mL) : la concentration initiale en solution ;

$V$  (mL) : représente le volume de la suspension ;

$m$  (mg) : la masse de l'adsorbant.

Tout d'abord, des expériences préliminaires d'adsorption ont été menées afin de déterminer la condition optimale pour l'adsorption de BBR en termes de temps de contact. La [Figure 4.2](#) montre l'étude cinétique de l'adsorption de la BBR (1 mg/ml) sur 10 mg de HDL. L'équilibre d'adsorption est atteint au bout de 7 h de contact comme le montre la [Figure 4.2](#). Cependant, avant 7 h de contact une légère quantité de BBR est relarguée puis réadsorbée par la matrice hôte. Au bout de 24 h de réaction, la rétention de la biomolécule a faiblement diminuée. Donc, pour s'assurer que l'état d'équilibre soit complètement atteint, les études suivantes ont été réalisées avec des temps de contact de 24 h.

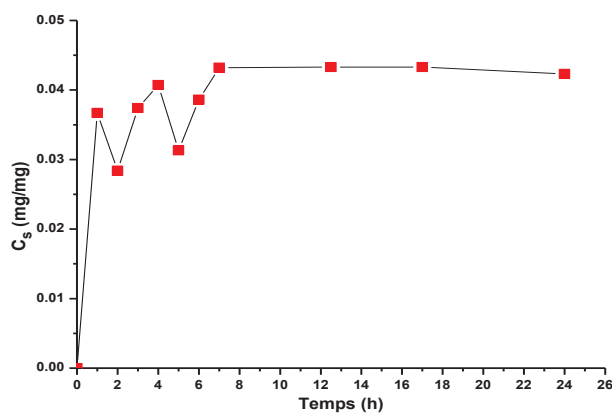


Fig. 4.2. Etude cinétique de l'adsorption de la BBR.

De façon générale, les expériences d'échange montrent une faible adsorption de BBR. La [Figure 4.3](#) présente l'ensemble des isothermes d'adsorption de BBR par les phases HDL en fonction du rapport molaire  $Mg^{2+}:Al^{3+}$ , de l'anion interlamellaire et de la morphologie de la matrice hôte. Les isothermes d'adsorption de BBR sur les phases  $[Mg_RAl-Cl]_{cop}$  avec  $R = 2, 3$  et  $4$  sont montrées dans la [Figure 4.3A](#). En effet, on peut distinguer 3 segments sur les isothermes ; pour des faibles concentrations de BBR ( $C_e < 0,125$  mg/mL), la rétention des biomolécules progresse linéairement jusqu'à atteindre un plateau dont la longueur et la hauteur sont liées à la capacité d'adsorption, dépendant également du l'effet de charge de feuillet. Au-delà, une deuxième étape d'adsorption est mise en évidence. L'adsorption reprend plus rapidement pour des valeurs de  $C_e$  élevées. Ces résultats prouvent que l'adsorption procède en deux étapes: une progression linéaire jusqu'à la saturation des sites de surface suivie soit par un effet d'agrégation de surface des biomolécules soit d'une modification de la surface spécifique des solide créant nouveaux sites sous l'effet de la concentration croissante des biomolécules. La capacité d'adsorption définie comme le rapport entre la quantité d'adsorbat et d'adsorbant sur le plateau, la capacité d'adsorption est de 24%, 14%, 8,3% respectivement, pour  $R = 2, 3$  et  $4$ . Ce même genre de comportement a aussi été observé en cas d'adsorption du MCPA sur  $[Mg_RAl-Cl]$  ([Inacio et al., 2011](#)). En revanche, les [Figures 4.3B et 4.3C](#) correspondent respectivement aux isothermes d'adsorption de BBR par MgAl intercalé avec des anions  $CO_3^{2-}$  et MgAl préparé avec la méthode thermique de l'urée. Il est clair que la même forme d'isotherme est obtenue comme exposé ci-dessus. Comme lors de l'adsorption sur  $[Mg_2Al-Cl]_{cop}$ , l'adsorption sur  $[Mg_2Al-CO_3]_{cop}$  et  $[Mg_2Al-Cl]_{urée}$  se produit en deux étapes. En effet, dans le cas de  $[Mg_2Al-CO_3]_{cop}$ , la concentration en équilibre requis pour atteindre le plateau d'adsorption était de 0,1 mg/ml et la capacité d'adsorption engendré était de 15%. Les interactions adsorbat/adsorbant concordent bien avec l'ordre de l'affinité matrice/anion ( $NO_3^- < Cl^- < CO_3^{2-}$ ) proposée par [Miyata \(1983\)](#) car les anions carbonate sont fortement ancrées par les feuillets hydroxyles. La présence d'anions carbonate à la surface des feuillets, difficiles à extraire dans des conditions d'échanges ioniques standards, est l'un des éléments défavorables à l'adsorption de BBR par les HDL. D'autre part, la phase  $[Mg_2Al-Cl]_{urée}$  préparée par l'hydrolyse thermique de l'urée, seul 12% de la capacité d'adsorption est atteinte comparée à celle par co-précipitation. La méthode de co-précipitation conduit à la formation de petites plaquettes de forme pseudo-hexagonale dont la taille varie entre 50-200 nm et agrégée en rose de sable. La méthode urée produit des particules de taille supérieure à 1 $\mu$ m, faiblement agrégées. Ces différences texturales se traduisent par des surfaces spécifiques distinctes, 59 et 24 m<sup>2</sup>/g respectivement ([Fig. 4.4, Tableau 4.2](#)).

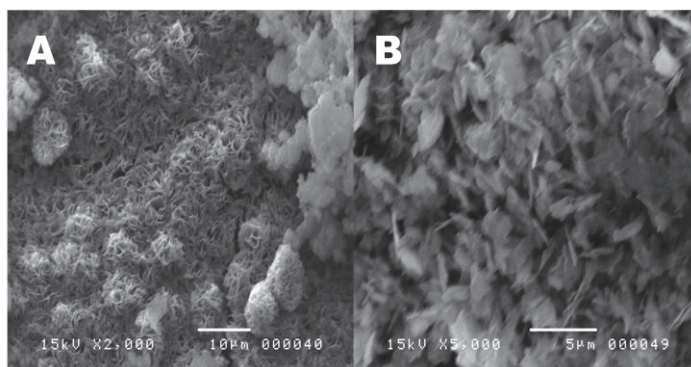


Fig. IV-4. Clichés MEB (A) phase co-précipitée, (B) phase préparée par hydrolyse thermique de l'urée.

Afin de mieux comprendre l'adsorption de la berbérine par les phases HDL, nous avons appliqué le modèle de Freundlich :

$$C_s = K_f \cdot C_e^n \quad \text{Equation 2.3}$$

(utilisé sous forme linéarisée):

$$\ln C_s = \ln K_f + \frac{1}{n} \ln C_e \quad \text{Equation 2.4}$$

avec :

$K_f$  : la capacité d'adsorption de l'HDL et

$n$  : l'affinité adsorbat/adsorbant (ou le degré de linéarité entre  $C_s$  et  $C_e$ ).

Les résultats de la transformés linaires sont rapportés dans le [Tableau 4.2](#). Comme le montre les isothermes, il est difficile de les classer. Si l'on se réfère à la classification de Giles ([Giles et al., 1960](#)), la première partie de ces isothermes est de type S ( $1/n > 1$ ) indiquant des interactions compétitives adsorbat-adsorbant et adsorbat-adsorbat. Pour des valeurs élevées de  $C_e$ , les interactions adsorbat-adsorbant s'imposent et les isothermes se rapprochent du type L. Les valeurs de  $n$ , obtenues par ajustement. Les valeurs de  $n$ , obtenues par ajustement selon le modèle de Freundlich des deux régions de l'isotherme, confirment ce passage du type S ( $1/n > 1$ ) au type L ( $1/n \leq 1$ ) ([Tableau 4.2](#)). L'adsorption procède donc par échange ionique et s'effectue en deux temps avec tout d'abord échange des sites en surface, suivi d'une agrégation de surface ou bien encore d'une modification de la surface spécifique de la matrice conduisant à la libération de nouveaux sites de surface permettant de rendre compte de l'isotherme à haute concentration. Compte tenu de ces résultats, l'adsorption de la BBR sur les hydroxydes doubles lamellaires révèle une faible affinité dépendant de différents paramètres. La BBR se fixe à la surface externe du matériau avec un taux d'échange de 25 % dans le cas le plus favorable.

Tableau 4.2. Paramètres de Freundlich et surface spécifique des précurseurs.

Formulations		$K_f$ (mg/mg)	1/n	r	$S_{BET}$ (m <sup>2</sup> /g)
BMAE	$[Mg_2Al-Cl]_{cop}$	0,24	1,19	0,9593	59
	$[Mg_3Al-Cl]_{cop}$	0,14	1,14	0,9795	-
	$[Mg_4Al-Cl]_{cop}$	0,083	1,02	0,9980	-
	$[Mg_2Al-CO_3]_{cop}$	0,15	1,10	0,9976	-
	$[Mg_2Al-Cl]_{urée}$	0,12	1,04	0,9951	24

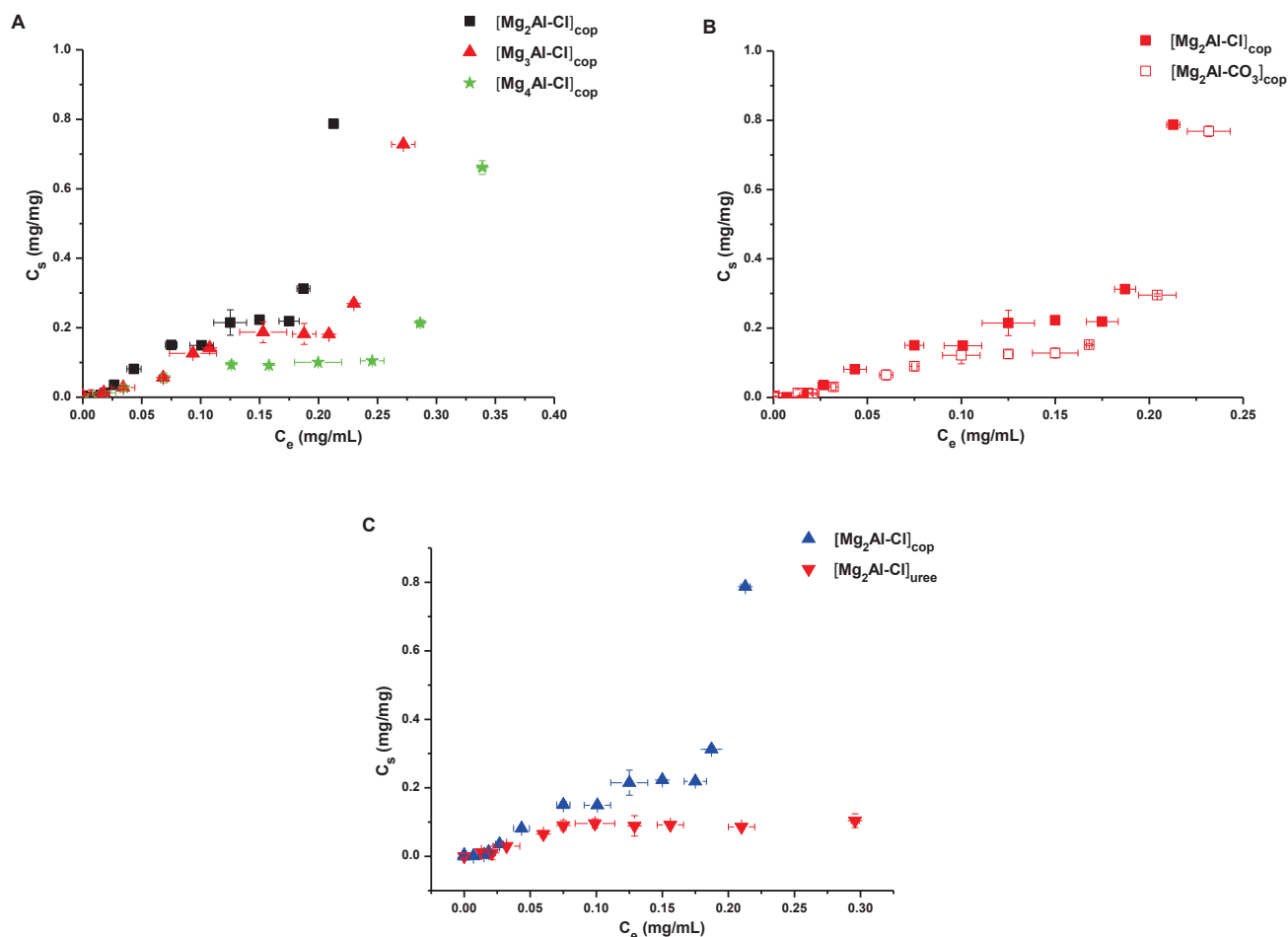


Fig. 4.3. Isothermes d'adsorption de BBR sur des phases MgAl HDL (A) l'effet de rapport  $Mg^{2+}:Al^{3+}$ , (B) l'effet de l'anion interlamellaire et (C) l'effet de la morphologie.

Depuis que l'interaction entre les molécules de BBR et la phase MgAl HDL semble favorable et que les conditions de synthèse ont été optimisées, la co-précipitation de l'HDL en présence de BBR a également réussi afin d'améliorer la quantité de BBR retenue par la matrice MgAl HDL et de préparer un véritable matériau biohybride basé sur l'association intime de mono-feuillets BBR–MgAl HDL. Cette méthode est réalisée dans des conditions douces (pH constant, 37° C) favorables à la protection des propriétés biologiques de la BBR et à l'immobilisation d'une quantité plus importante (Tableau 4.1). Toutefois, la présence de la BBR au milieu du précipité ne s'oppose pas à la formation de la phase minérale. La



méthode de co-précipitation permet de conserver le rapport BBR/HDL initial et ainsi de contrôler la quantité de biomolécules. Cependant un excès entraîne une saturation des sites d'adsorption et la présence de domaines riches en BBR. La Figure 4.5 présente la variation de la quantité de BBR retenue vis-à-vis la concentration de BBR en solution. L'isotherme obtenue s'apparente à un isotherme de type L, mettant en évidence deux évolutions: une progression linéaire d'adsorption jusqu'à  $Q = 0,5$  suivie par une dépréciation due à la saturation de la surface du minérale.

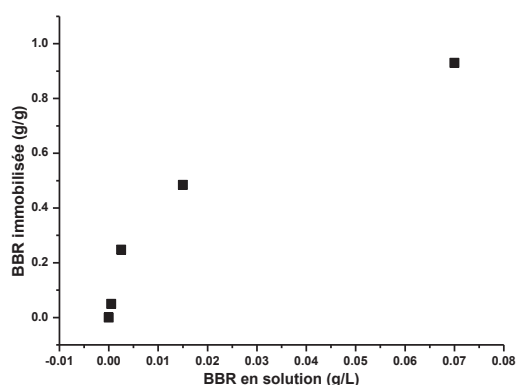


Fig. 4.5. Isotherme d'adsorption de BBR lors de la co-précipitation de la phase MgAl HDL.

### 4.3.2. Caractérisations des biohybrides

#### 4.3.2.1. Diffraction des rayons X

Les diffractogrammes des composées biohybrides BMAE et BMAC obtenues sont représentés sur la Figure 4.6 en comparaison avec le précurseur de référence. En effet, les diffractogrammes résultants révèlent trois régions distinctes : (i) la région des petites angles ( $2\theta < 30^\circ$ ) contenant les réflexions  $00l$  dont les positions dépendent de la taille de l'anion intercalé ; (ii) la mi- $2\theta$  région ( $30^\circ < 2\theta < 50^\circ$ ) contenant les réflexions  $0kl$  dont les positions sont fortement affectées par le désordre structural et (iii) la région des grandes angles ( $2\theta > 60^\circ$ ) contenant les réflexions  $hk0$  et  $hkl$  caractéristiques de l'ordre métallique au sein des feuillets hydroxydes. Ces réflexions peuvent être indexées dans un réseau hexagonal avec le groupe d'espace  $R\bar{3}m$ . Les paramètres de maille affinés  $c$  et  $a$  de la structure rhomboédrique ont été déterminés à partir de la position des réflexions 003, 006 et 110 respectivement (Tableau 4.3). La réflexion 003 correspond à la distance interlamellaire et permet de calculer le paramètre  $c$  ( $c = 3/2[d_{003} + 2d_{006}]$ ) alors que la réflexion 110 située au voisinage de  $60^\circ$  en  $2\theta$  renseigne sur la distance intermétallique ou interatomique cation-cation au sein des



feuillet hydroxydes et permet de calculer de manière approximative le paramètre  $a$  ( $a = 2d_{110}$ ) (Pérez-Ramirez et al., 2001).

La présence des raies de diffractions caractéristiques de la structure HDL sur les diffractogrammes des phases préparées à la fois par échange et co-précipitation valident l'utilisation de ces méthodes de synthèse pour la préparation de phases biohybrides BBR-HDL. La distance interlamellaire moyenne est de 0,76989 nm pour BMAE et de 0,76626 nm pour BMAC suggère l'intercalation d'anions chlorures et par conséquent il s'agit d'adsorption de la BBR sur la surface de l'HDL plutôt qu'une intercalation entre les feuillets comme c'est le cas pour la phosphatase alcaline (Mousty et al., 2008), la trypsine (Mansouri et al., 2007), l'urease (Vial et al., 2006), l'ADN (Li et al., 2014), les anti-inflammatoires ibuprofène, naproxène et ketoprofène (Rojas et al., 2015). Cependant, les légers changements relatifs à la distance interlamellaire après immobilisation de la berbérine, en comparaison du précurseur de référence, peuvent s'expliquer par une perte des molécules de H<sub>2</sub>O à la surface des cristallites HDL due à la présence de biomolécules. Le pic apparu à 18 (indexé par flèche) en  $2\theta$  pourrait être causé par les bandes de coordinations formées après adsorption de BBR et provenant de l'aggrégation BBR-BBR à la surface de l'HDL. En outre, on peut noter, une diminution d'intensité, un élargissement des réflexions après adsorption de BBR conduisant à une réduction de la taille des particules suivant la direction de  $c$ . En effet, ce chevauchement structural, plus fortement apparue pour les phases BMAC que celles du BMAE, serait dû à la quantité importante retenue par la co-précipitation. Ces résultats concordent bien avec les isothermes d'adsorption de BBR et suggèrent que l'immobilisation a lieu à la surface des feuillets HDL avec une différence de désordre entre les deux méthodes de synthèse.

Tableau 4.3. Paramètres structuraux des phases MgAl HDL et BBR-MgAl HDL ( $Q = 1$ ).

Paramètres DRX		MgAl HDL	BBR-MgAl HDL	
			BMAE	BMAC
$d_{hkl}$ , nm	$d_{003}$	0,780	0,769	0,766
	$d_{006}$	0,389	0,383	0,380
	$d_{110}$	0,152	0,152	0,152
Paramètre $a$ , nm		0,305	0,304	0,304
Paramètre $c$ , nm		2,337	2,305	2,291
Taille des cristallites (selon l'axe $c$ ), nm		23,2	11,4	7,4

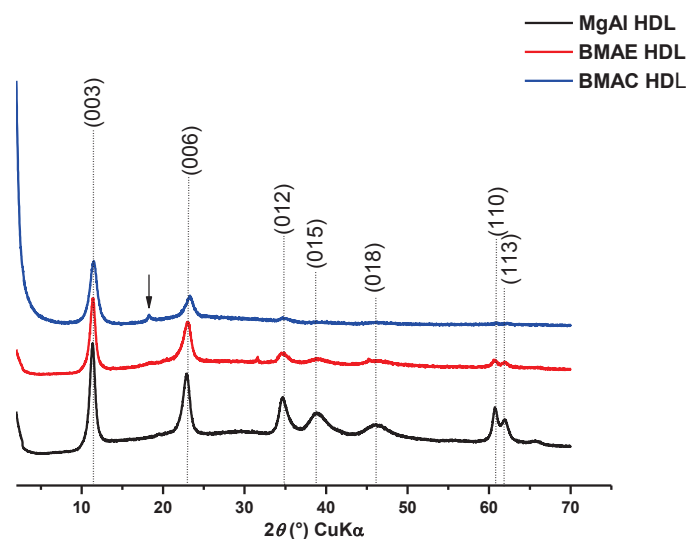


Fig. 4.6. Diffractogrammes X de MgAl HDL et BBR–MgAl HDL (Q = 1).

#### 4.3.2.2. Spectroscopie infrarouge

L'identification des groupements fonctionnels ainsi que les natures des liaisons chimiques présentes dans les systèmes biohybrides obtenues ont été déterminées par spectroscopie infrarouge. La Figure 4.7 présente les spectres infrarouges des phases biohybrides obtenues en comparaison avec les spectres du précurseur de référence et de la BBR. Les spectres montrent clairement la présence des deux entités biologique et minérale, confirmant l'immobilisation de la biomolécule dans la matrice MgAl HDL. Parmi les bandes de vibration caractéristique du réseau HDL qui couvrent la région entre  $1000$  et  $400\text{ cm}^{-1}$  (Rives, 2001) ; la bande à  $449\text{ cm}^{-1}$  correspond à la bande de déformation O–M–O et les bandes de vibration entre  $850$  et  $550\text{ cm}^{-1}$  sont attribuées aux vibrations d'élongation M–O. Comparé au spectre de précurseur, BMAE et BMAC montrent de nouvelles bandes centrées à  $1496\text{-}1522\text{ cm}^{-1}$ ,  $1232\text{-}1273\text{ cm}^{-1}$  et  $1002\text{-}1042\text{ cm}^{-1}$  correspondant respectivement aux vibrations du groupement benzène, éther cyclique –O–C–O– et à la vibration d'élongation antisymétrique C–O–C. Ces bandes sont typiques de la BBR (Li et Xu, 2010). Toutefois, il est clair que les signaux de BMAE et BMAC sont la superposition des signaux de MgAl HDL et BBR. Il est évident donc que le mécanisme d'intercalation n'a pas lieu lors de l'immobilisation. En outre, nous notons une augmentation d'intensités des bandes de vibration attribuées à la BBR autant qu'une diminution de celle du minéral tant pour BMAC que pour BMAE, cette variation met en évidence l'augmentation de la quantité de BBR immobilisée lors de la réaction de co-précipitation. Ces résultats coïncident avec les résultats obtenus par

diffraction des rayons X, indiquant que les biomolécules de BBR sont logés à la surface de l'HDL.

La large bande avec un maximum à  $3400\text{ cm}^{-1}$  est attribuée à la vibration d'élongation du groupement hydroxyle O–H présent dans les feuillets brucitiques autant que dans les molécules  $\text{H}_2\text{O}$  principalement intercalées dans l'espace interfeuille. La bande à  $1640\text{ cm}^{-1}$  est attribuée à la bande de valence de formation de molécules  $\text{H}_2\text{O}$  intercalées. Alors que la bande à  $1360\text{ cm}^{-1}$  est attribuée à la vibration symétrique des anions  $-\text{CO}_3^{2-}$  due à la carbonatation de la phase HDL pendant l'incubation dans le réacteur fermé à l'air, cette bande est disparue dans le spectre BMAC dû à la forte adsorption de la BBR lors de la méthode de co-précipitation.

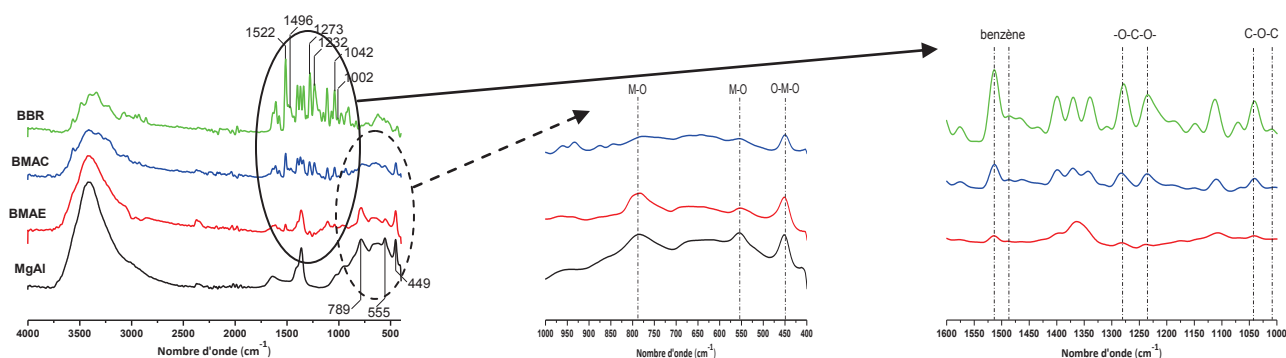


Fig. 4.7. Spectres infrarouges de MgAl HDL et BBR–MgAl HDL ( $Q = 1$ ).

#### 4.3.2.3. Microscopie électronique à balayage

Les clichés MEB de la phase de référence MgAl et des phases biohybrides BMAE et BMAC sont représentés sur la Figure 4.8. En effet, les phases MgAl co-précipitées présentent une morphologie homogène constituée de plaquettes individuelles de forme pseudo-hexagonale agrégées en « rose de sables » et de diamètre variables allant de  $2,5\ \mu\text{m}$  jusqu'à  $5\ \mu\text{m}$ . Par ailleurs, les clichés MEB des matériaux biohybrides affichent certaines modifications texturales. La phase préparée par échange BMAE ( $Q = 1$ ) présente un aspect morphologique peu différent du précurseur. L'adsorption de la BBR sur la surface externe des particules secondaires conduit à la désagrégation des petites cristallites de surface et l'apparition des zones d'agglomérat BBR-BBR permet d'orienter les plaquettes modifiées par la BBR et de diminuer légèrement la cristallinité. Tandis que, la présence de la BBR dans le milieu de précipitation lors de la co-précipitation BMAC ( $Q = 1$ ) provoque une forte orientation des cristallites comme le révèle l'image avec des zones d'aggrégations denses BBR-BBR. La présence de BBR dans le milieu de synthèse joue donc un rôle texturant important lors de la

précipitation de l'HDL favorise une plus forte diminution de cristallinité que celle de la phase préparée par échange.

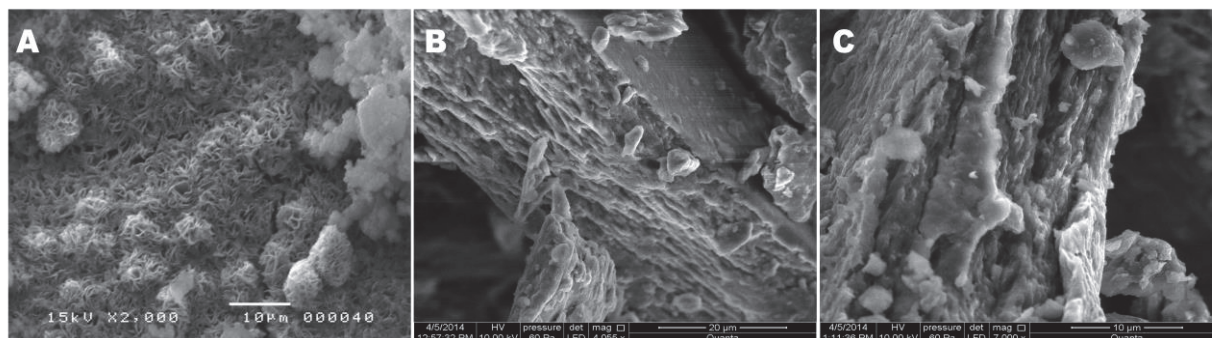


Fig. 4.8. Clichés MEB de (A) MgAl, (B) BMAE et (C) BMAC HDL.

#### 4.3.2.4. Analyse de surface

Afin de confirmer la présence de BBR sur la surface des cristallites HDL, une étude sur la mouillabilité des différentes phases préparées déposées sur une lame de verre a été réalisée. Cette méthode permet de savoir s'il y a une modification au niveau de la surface du support minéral. Le principe consiste à déposer sur la surface du substrat une goutte d'eau et de mesurer l'angle de contact (voir méthodologie). Les mesures des angles de contact avant et après immobilisation de la BBR sont représentées sur la Figure 4.9. Il est évident que toutes les phases montrent un caractère hydrophile (l'angle de contact inférieur à  $90^\circ$ ), l'angle de contact de la phase MgAl est de  $35,3^\circ \pm 0,3^\circ$  ; lors de la présence de BBR l'angle de contact augmente et tend vers l'hydrophobicité,  $45,8^\circ \pm 0,60^\circ$  et  $65,9^\circ \pm 0,95^\circ$  respectivement pour BMAE et BMAC (Tableau 4.4) favorisant l'adsorption de la BBR sur la surface externe des feuillettes HDL. Des travaux similaires ont été rapportés dans la littérature avec une surface d'acier modifiée par la BBR (Lin et al., 2015). En outre, la mouillabilité de surface dépend fortement de la force de propagation des molécules d'eau  $W_s$ , la surface des feuillettes s'avère de plus en plus hydrophobe au fur et à mesure de l'augmentation de la quantité de BBR retenue en tant que  $W_s$  est plus négative.



Fig. 4.9. Images d'angles de contact pour (A) MgAl, (B) BMAE et (C) BMAC HDL.

**Tableau 4.4.** Angle de contact (°) et force de propagation d'eau  $W_s$  (mN/m) des phases MgAl, BMAE et BMAC HDL.

Phase	Liquide	Angle de contact (°)	$W_s$ (mN/m)
MgAl HDL	eau	35,3 ± 0,05	-13,36
BMAE HDL	eau	45,8 ± 0,60	-22,06
BMAC HDL	eau	65,9 ± 0,95	-43,07

### 4.3.3. Cinétique de libération

La libération ionique de la BBR des matériaux biohybrides synthétisés a été étudiée dans un milieu tampon phosphate salin (0,1 M, pH 7,4) sur un intervalle de temps de 200 min. Les quantités libérées de la BBR ont été estimées par spectrophotométrie UV-vis à 420 nm et les graphes du pourcentage de BBR libérée en fonction de temps à partir des deux formulations BMAE et BMAC sont présentés sur la [Figure 4.10](#). Comme le montre la [Figure 4.10](#), l'allure des deux courbes est similaire mais le taux de libération de BBR semble plus rapide pour BMAE que pour BMAC, prévoyant le potentiel de libération de ces matériaux. [Barahuie et al. \(2014\)](#) ont rapporté un comportement identique en analysant la libération de la chlorogénate par des matrices ZnAl HDL synthétisées par des réactions d'échange et co-précipitation directe. Toutefois la libération totale de la BBR était presque terminée après 50 min, puis elle atteint un taux d'équilibre de 63% et 87% respectivement pour BMAE et BMAC. Cette différence d'efficacité de libération est due à une très forte interaction et association entre les molécules de BBR et la matrice HDL et à la différence importante en quantité de BBR retenue à travers les méthodes de préparation. En effet, la co-précipitation permet une grande diffusion des molécules BBR au sein des feuillettes HDL et donc de créer des fortes liaisons favorisant une libération moyennement longue ainsi qu'un contrôle plus efficace. Ces résultats prouvent l'avantage de la co-précipitation en tant que méthode assurant une grande disponibilité de la BBR ainsi qu'une libération contrôlée de cette dernière, améliorerait son efficacité thérapeutique et l'observance du traitement en réduisant la fréquence d'administration et les effets secondaires systémiques.

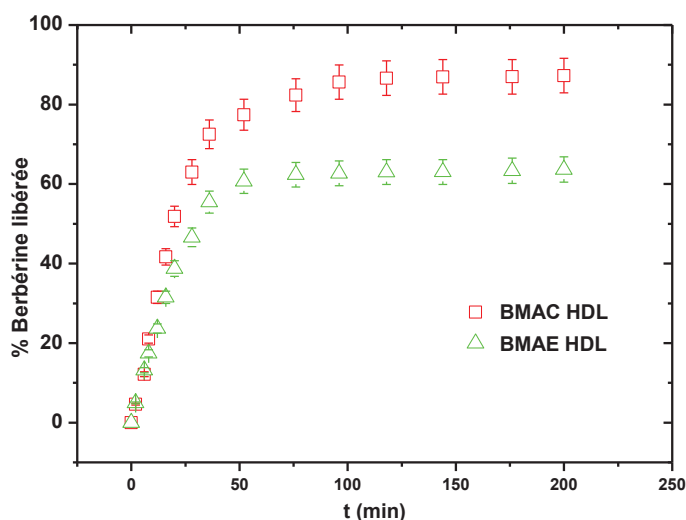


Fig. 4.10. Variation du pourcentage de BBR libérée avec les temps par les phases biohybrides BMAE et BMAC.

Afin de stimuler les courbes de libération in-vitro, des modèles mathématiques basés sur les théories interfaciales des transferts de matière ont été validés et ont permis d'identifier par ajustement les mécanismes impliqués (Tableau 4.5).

Tableau 4.5. Modèles cinétiques utilisés pour analyser la libération de BBR.

Modèle	Relation
Ordre 0 (Dash et al., 2010)	$C_t/C_0 = k_0 t$
Ordre 1 (Gao et al., 2014)	$\ln(C_t/C_0) = -k_1 t$
Freundlich (Gao et al., 2014)	$\ln(1-C_t/C_0) = \ln k_F + a \ln t$

Les données de la modélisation sont présentées dans le Tableau 4.6. D'après les observations, il est clair que tous les modèles peuvent être utilisés pour décrire la libération de BBR par les phases biohybrides BMAE et BMAC. Cependant, selon les valeurs des coefficients de détermination ( $R^2$ ) (Tableau 4.6), le modèle d'ordre 1 est plus adéquat pour décrire ces courbes (Fig. 4.11). Ce modèle décrit la dissolution des médicaments lors de dosages pharmaceutiques, tels que ceux qui sont solubles dans l'eau dans des matrices poreuses (Narashimhan et al., 1999 ; Silvina et al., 2002).

Tableau 4.6. Données de la modélisation des courbes de libération.

Ordre 0		Ordre 1		Freundlich	
BMAE	BMAC	BMAE	BMAC	BMAE	BMAC
$R^2 = 0,9851$	$R^2 = 0,97895$	$R^2 = 0,99718$	$R^2 = 0,9898$	$R^2 = 0,99668$	$R^2 = 0,98047$

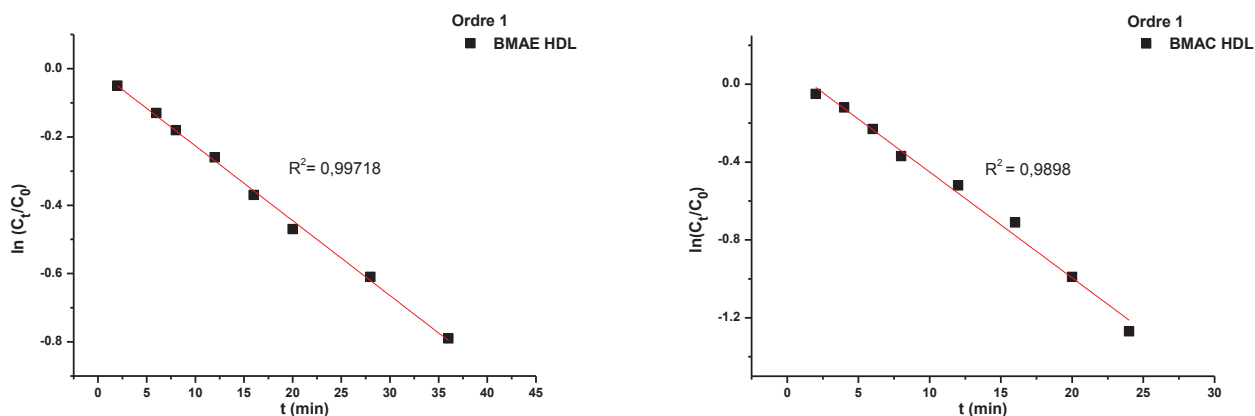


Fig. 4.11. Modélisation linéaire de la libération de la BBR selon le modèle de premier ordre.

#### 4.3.4. Test anti-bactérien des biohybrides synthétisés

Dans ce test, l'évaluation de l'activité anti-bactérienne des formulations biohybrides synthétisées BMAE et BMAC sur des germes à l'origine des infections de système digestif et de diarrhée est d'abord réalisée à partir des suspensions aqueuses de ces matériaux. Les résultats montrent que ces suspensions sont actives sur les souches de *S. aureus*, *P. aeruginosa* et *B. subtilis* étudiées. Le précurseur et la BBR sont également employés dans l'étude pour comparaison. La phase de précurseur ne relève aucune activité anti-bactérienne tandis que l'activité de BBR a été définie 100% comme référence pour les activités ultérieures. Cependant, les diamètres des zones d'inhibition produits par BMAE et BMAC sont variables d'une souche à autre et à travers les deux fractions (Tableau 4.7). Ces résultats sont fortement dépendants de la méthode d'immobilisation et du comportement lors de la libération. En effet, on enregistre une efficacité d'inhibition de 54%, 68% et 59% avec BMAE alors que BMAC montre une capacité d'inhibition de 83%, 68% et 85%, à l'égard des germes testés *S. aureus*, *P. aeruginosa* et *B. subtilis*, respectivement. Cela signifie que BMAC est la fraction la plus active et que cette fraction concentrerait mieux le principe actif anti-bactérien (la BBR dans notre cas). Nous pouvons noter également que les taux d'inhibition corroborent ceux de la libération. Par ailleurs, l'effet synergique de la BBR et des différentes fractions a été attribué contre *P. aeruginosa* (Fig. 4.12). Ce résultat suggère un potentiel plus inhibiteur contre ce pathogène pouvant s'expliquer par les charges positives de la fonction ammonium contenue dans la BBR qui détruit l'enveloppe cellulaire chargé négativement de *P. aeruginosa* en perturbant les équilibres de charge de celle-ci (Kim et Son, 2004 ; Sarkar et al., 2011).



Tableau 4.7. Performances anti-bactérienne de BBR, BMAE et BMAC.

Fraction	Zone d'inhibition ( <i>S. aureus</i> )			Zone d'inhibition ( <i>P. aeruginosa</i> )			Zone d'inhibition ( <i>B. subtilis</i> )		
	Diamètre moyen (mm)	CV %	% d'inhibition	Diamètre moyen (mm)	CV %	% d'inhibition	Diamètre moyen (mm)	CV %	% d'inhibition
MgAl	5 ± 0,0	0	0	5 ± 0,0	0	0	5 ± 0,0	0	0
BMAE	6,83 ± 0,3	4	54	10,2 ± 0,8	8	68	7,7 ± 0,3	4	59
BMAC	10,5 ± 0,5	5	83	14 ± 1,0	7	93	11 ± 1,0	9	85
BBR	12,7 ± 0,3	2	100	15 ± 0,9	6	100	13 ± 0,0	0	100

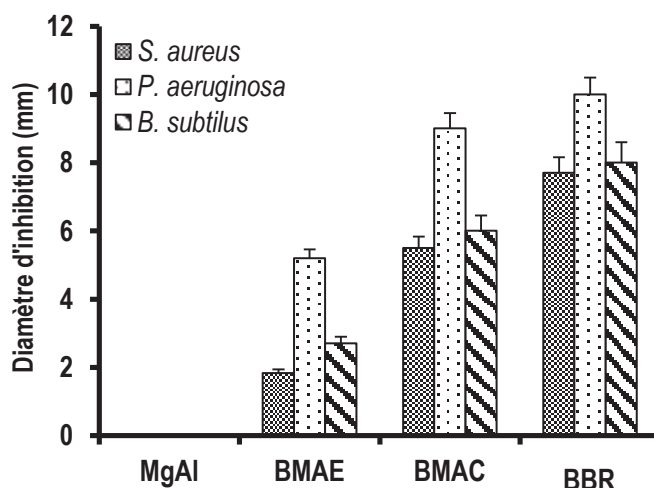


Fig. 4.12. Variation des diamètres d'inhibition de la BBR libre et immobilisée.

#### 4.3.5. Etude approfondie de la co-précipitation

Lors de l'étude comparée des méthodes de préparation des phases biohybrides BBR–MgAl HDL, la méthode de co-précipitation a permis d'obtenir un taux d'immobilisation de BBR plus élevé que l'échange direct (Tableau 4.1) ainsi qu'un taux de libération très important (Fig. 4.10). Le deuxième volet des travaux allant dans le même sens concerne l'étude des phases biohybrides co-précipitées BBR–ZnAl HDL, mais nous devons investiguer de manière détaillée la co-précipitation de la matrice ZnAl HDL en présence de la BBR en variant la quantité de BBR vis-à-vis la quantité d'HDL (rapport  $Q = \text{BBR:HDL}$ ) afin de pouvoir relever l'effet de ce rapport sur le comportement structural et morphologique ainsi que sur la cinétique de libération.

##### 4.3.5.1. Caractérisation structurale

L'identification de la structure et la pureté des phases biohybrides obtenues ont été étudiées par la technique des diffractions des rayons X. Les diffractogrammes des rayons X des phases biohybrides BZAC sont comparées au diffractogramme de la phase de référence ZnAl HDL, (Fig. 4.13).



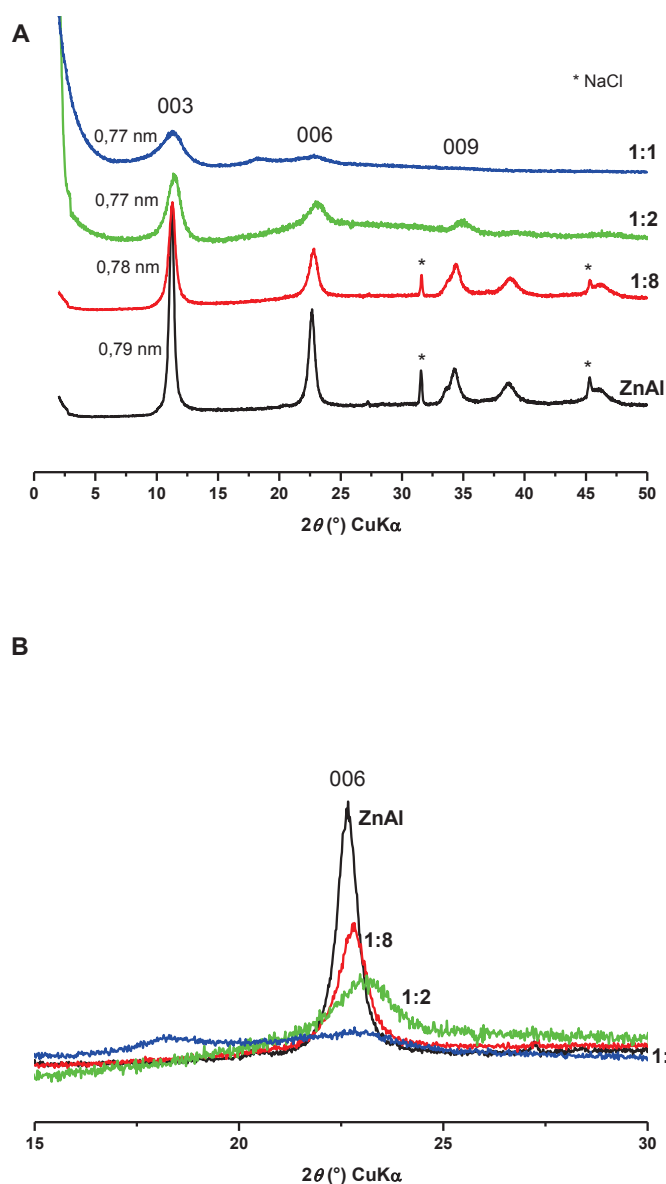


Fig. 4.12. Diffractogrammes X (A) des phases biohybrides BZAC co-précipitées à différents rapports BBR:HDL et (B) de la région comprise entre  $2\theta = 15^{\circ}$ – $25^{\circ}$ .

La Figure 4.12A révèle la structure HDL pour les différentes phases synthétisées à travers trois pics de diffraction symétriques et aigues (003, 006 et 009). Ces observations structurales montrent la possibilité de précipiter la phase ZnAl HDL dans un réseau bioorganique. La distance interlamellaire  $d_{003}$  du précurseur était 0,79 nm, indiquant la présence des anions chlorures entre les feuillettes, en concordance avec les études antérieures (Barriga et al., 1998). La distance interlamellaire des phases contenant la BBR, à son tour, montre une légère modification peut se traduire par une perte de molécules d'eau à l'intérieur ou sur la surface de l'HDL et conduit donc à déduire que l'intercalation de la BBR n'est

jamais réellement atteinte, c'est plutôt une adsorption à la surface de l'HDL, ainsi que le révèle, les  $d_{003}$  0,78 nm pour Q = 1:8, et 0,77 nm pour Q = 1:2 et 1:1.

D'autre part, les phases ZnAl HDL contenant la BBR montrent une forte diminution de la cristallinité. La [Figure 4.12B](#) présente le domaine comprise entre  $2\theta = 15^\circ$ – $25^\circ$ . Selon cette figure, l'intensité des réflexions 006 diminue au fur et à mesure de l'augmentation de la concentration de berberine. Leur élargissement montre un désordre plus important de l'empilement des feuillets selon la direction de c et pourrait donner lieu à la réduction des tailles de cristallites. Le [Tableau 4.8](#) montre l'évolution de la taille des cristallites des matériaux synthétisés estimés à partir des valeurs de la largeur à mi-hauteur des raies 006 en utilisant l'équation de Debye-Scherrer :

$$D = \frac{k \cdot \lambda}{\beta \cos\theta} \quad \text{Equation 4.1}$$

Avec:

k : la constante de Scherrer (k = 0.9) ;

$\lambda$  : la longueur d'onde de la radiation incidente utilisée ( $\lambda = 1.54060 \text{ \AA}$ ) ;

$\beta$  : la largeur à mi-hauteur de la ligne de diffraction ;

$\theta$  : l'angle de Bragg de la diffraction.

D'après les données présentées dans le [Tableau 4.8](#), la taille moyenne des cristallites est considérablement affectée par la quantité de BBR retenue. On note ainsi une réduction de 91% de la taille des domaines ordonnées suivant c, permet de conclure que la présence de BBR dans le milieu de précipité s'oppose à la croissance cristalline de l'HDL selon la direction c ainsi qu'à l'organisation de la structure lamellaire du biohybride.

**Tableau 4.8.** Données DRX de la raie de diffraction 006 des phases biohybrides synthétisées.

Echantillon	$2\theta_{006}$ (°)	$\beta_{006}$ (°)	$D_{006}$ (nm)
ZnAl	22.651	0.075	188.5
BBR:HDL 1:8	22.799	0.131	107.9
BBR:HDL 1:2	23.050	0.598	23.6
BBR:HDL 1:1	23.024	0.897	15.7

Afin de mieux appréhender l'interconnexion entre les molécules de BBR et les feuillets de l'HDL, une autre technique de caractérisation structurale: l'infrarouge (IR), a été utilisée et permet de mettre en évidence les interactions au niveau du système biohybride. La [Figure 4.14](#) représente les spectres infrarouges des phases élaborées en fonction du rapport BBR:HDL. Ils correspondent à la superposition des bandes de vibration de la BBR et de la phase ZnAl HDL confirmant que la BBR est bien immobilisée. Le comportement de la BBR est le même, tant avant qu'après l'immobilisation, les signatures infrarouges sont identiques

en nombres et positions des bandes. Les interactions BBR–HDL ne modifient pas la conformation de la biomolécule.

Nous notons aussi la présence des bandes situées vers 1453-1520, 1235-1277 et 1001-1051  $\text{cm}^{-1}$  attribuées respectivement aux groupement benzène, éther cyclique –O–C–O– et à la vibration antisymétrique C–O–C, typiques de la structure de la BBR comme c'est mentionné auparavant. Ces bandes sont de plus en plus intenses avec l'augmentation du rapport Q tandis que les bandes caractéristiques de réseau HDL (voir section 4.3.2.2) semblent de plus en plus faibles. Par ailleurs, la bande à 1362  $\text{cm}^{-1}$  certainement due à la contamination par des anions carbonates issues de l'air est masquée avec la forte diffusion de la BBR sur la surface HDL (Q = 1:1).

En résumé, les investigations réalisées par infrarouge confirment bien l'adsorption de la BBR sur la surface externe du matériau inorganique puisque aucun déplacement des bandes n'est observé et sont donc propices avec les observations par diffraction des rayons X.

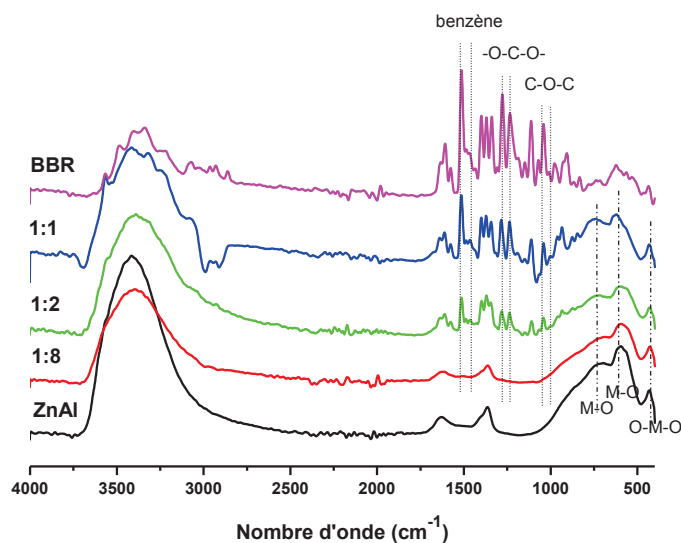


Fig. 4.14. Spectres infrarouges des phases biohybrides BZAC co-précipitées à différents rapports BBR:HDL conjointement avec celui de la BBR libre.

#### 4.3.5.2. Caractérisation microscopique

L'état de surface d'un échantillon est une donnée importante dans la compréhension des mécanismes de liaison à cette surface. Des analyses micrographiques et nanographiques ont été réalisées respectivement par microscope électronique à balayage à différentes agrandissements et par microscopie électronique à transmission afin de corréliser les analyses structurales avec la morphologie. La Figure 4.15 présente les différents clichés obtenus. En effet, la BBR (Fig. 4.14A) est configurée par l'agrégation des protofilaments allant de 1,184

jusqu'à 13,30  $\mu\text{m}$ , ainsi que la phase ZnAl HDL co-précipitée nous rappelons d'une morphologie homogène et particules de forme pseudo-hexagonale (Fig. 4.14E) s'agréant sous forme de « rose de sables » (Fig. 4.14B). Lors de l'immobilisation de la BBR, un peu de changement est constaté pour  $Q = 1:8$  (Fig. 4.14C) qui devient significatif à  $Q = 1:1$  (Fig. 4.14D) par la formation d'une texture compacte au fur et à mesure de l'augmentation de la quantité de BBR nettement clair dans le cliché MET (Fig. 4.14F). Les phases biohybrides co-précipitées révèlent donc une morphologie irrégulière due à la non-uniformité de la croissance des cristaux en directions cristallographiques. La présence de la biomolécule dans le milieu de précipité en quantité importante influence la morphologie du matériau et s'ingère en quelque sorte à leur la croissance cristalline. Ces observations n'évoquent qu'une forte dispersion de la BBR sur les surfaces et les côtes autant que dans les mésopores conduit à une exfoliation des feuillets HDL.

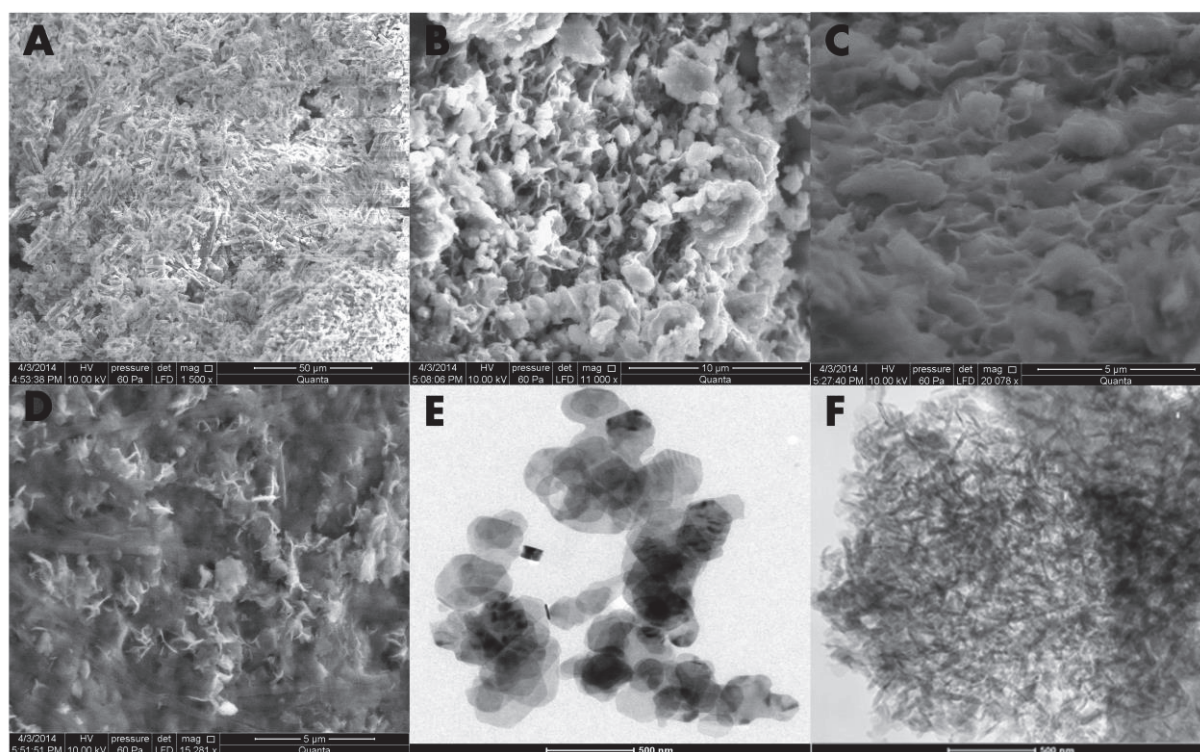


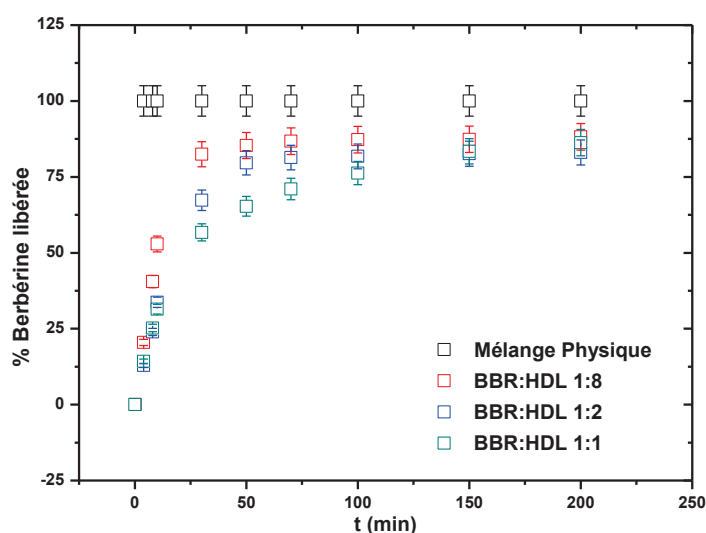
Fig. 4.15. Clichés MEB de (A) BBR, (B) ZnAl-HDL, (C) BZAC ( $Q = 1:8$ ), (D) BZAC ( $Q = 1:1$ ); clichés MET de (E) précurseur ZnAl-HDL et (F) BZAC ( $Q = 1:1$ ).

#### 4.3.5.3. Libération in-vitro de BBR

Le contrôle de l'étape de la libération ionique du BBR à partir des biohybrides co-précipités BZAC a été évalué comme décrit précédemment. Un mélange physique de BBR et ZnAl-HDL a été utilisé dans l'expérience de libération pour comparer le taux de libération de

BBR. Sur la [Figure 4.16](#) sont reportées les courbes cinétiques de la libération de la BBR. L'analyse de ces courbes conduit aux conclusions suivantes:

Le mélange physique ne montre aucun effet de libération prolongée, la BBR a été libérée totalement dans la solution. Alors que les différents rapports des biohybrides synthétisés montrent bien l'effet administrateur du médicament « drug payload ». Cela suggère un attachement fort entre les molécules BBR et le matériau inorganique due aux bandes de coordination à la surface des feuillets HDL. Cependant, l'effet retardateur de ces fractions était fortement dépendant du rapport  $Q$ , jusqu'à 82% de libération pendant 30 min pour  $Q = 1:8$ , 79% de BBR libéré par la phase à  $Q = 1:2$  durant 50 min et le meilleur effet a été enregistré avec le rapport  $Q = 1:1$  76% durant 100 min de réaction. En outre, une autre observation qui mérite d'être mentionnée est la libération brutale du médicament "burst effect" observé jusqu'à 30 min après le début de la libération. Ce "burst effect" diminue progressivement avec l'affinité de BBR aux feuillets HDL jusqu'à atteindre un taux d'équilibre approximatif de 86%, effet logique compte tenu de la diffusion importante de la BBR au sein du réseau inorganique au fur et à mesure de l'augmentation du rapport BBR:HDL. La littérature a rapporté un profil similaire pour la libération de l'acide ascorbique de particules à base de composites d'oléate de sodium-MgAl-HDL ([Kameshima et al., 2009](#)).



**Fig. 4.16.** Courbes cinétiques de la libération de BBR dans un milieu tampon salin à partir de biohybride BBR-ZnAl-HDL à différents rapports BBR:HDL.

Pour en savoir plus sur la cinétique de libération de BBR des biohybrides BBR-ZnAl-HDL, trois modèles mathématiques (ordre 0, ordre 1 et Freundlich) sont utilisés pour faciliter l'interprétation quantitative de ces résultats et la compréhension des mécanismes de libération

du BBR. Les valeurs de la constante de vitesse et du coefficient de détermination ( $R^2$ ) obtenus sont données sur le [Tableau 4.9](#). Parmi les modèles actuels, le modèle d'ordre zéro révèle des mauvaises valeurs de ( $R^2$ ) et n'est pas apte à expliquer le mécanisme de libération. Au contraire les modèles d'ordre 1 et Freundlich sont plus appropriés pour expliquer le processus de libération de BBR à partir des fractions biohybrides. Afin d'aller jusqu'au bout de notre analyse, il est important de scinder les courbes cinétiques de libération en deux phases : (i) la libération brutale « burst effect » (phase I jusqu'à 80% de BBR cumulée) suivi par (ii) la libération lente (phase II 80-100% de libération). Les phases I et II sont mieux décrites par le modèle de Freundlich avec un coefficient de détermination très élevé ( $R^2 \sim 0.95-0.99$ ) ([Fig. 4.17](#)). En effet, dans le modèle d'ordre 1 le logarithme de la fraction de dissolution est la fonction du temps, la vitesse de dissolution diminue en fonction du temps. Ce modèle est généralement observé avec une matrice poreuse pour une molécule active soluble dans l'eau ([Narashimhan et al., 1999 ; Silvina et al., 2002](#)). Alors que le modèle de Freundlich suppose la diffusion hétérogène sur des surfaces planes à la fois par diffusion contrôlée et phénomène d'échanges d'ions externes ([Senapati et al., 2016](#)). Ces résultats de simulation suggèrent que le processus de libération de BBR des biohybrides BBR–ZnAl-LDH est un mélange d'effets comprenant à la fois la dissolution des nanoparticules et des échanges entre les anions confinés dans la structure lamellaire et les phosphates de la solution tampon. Selon Freundlich, la constante de vitesse ( $k$ ) de la fraction à  $Q = 1:8$  est supérieure à celle de  $Q = 1:2$ , qui est à sa tour plus élevée que celle de  $Q = 1:1$  ([Tableau 4.9](#)). Toutes ces observations conduisent à conclure que plus le rapport de BBR:HDL est modifié en faveur d'importants taux d'immobilisation, plus la quantité de BBR libérée est lente.

**Tableau 4.9.** Constante de vitesse ( $k$ ) et coefficient de détermination ( $R^2$ ) obtenus selon les modèles d'ordre 0 et 1 et Freundlich.

Modèle	BBR:HDL 1:8		BBR:HDL 1:2		BBC:HDL 1:1	
	I	II	I	II	I	II
Ordre 0						
$k_0$	1,014	0,163	0,826	0,195	0,704	0,329
$R^2$	0,9971	0,6647	0,9328	0,9834	0,8415	0,8424
Ordre 1						
$k_1$	0,118	$1,16 \cdot 10^{-3}$	0,066	$7,44 \cdot 10^{-4}$	0,024	$5,48 \cdot 10^{-3}$
$R^2$	0,9757	0,8232	0,9939	0,9842	0,9817	0,9689
Freundlich						
$k_F$	0,165	0,794	0,105	0,745	0,103	0,333
$R^2$	0,9983	0,9756	0,9961	0,9883	0,9554	0,9793

I pour 0–80% de libération et II pour 80–100% de libération.



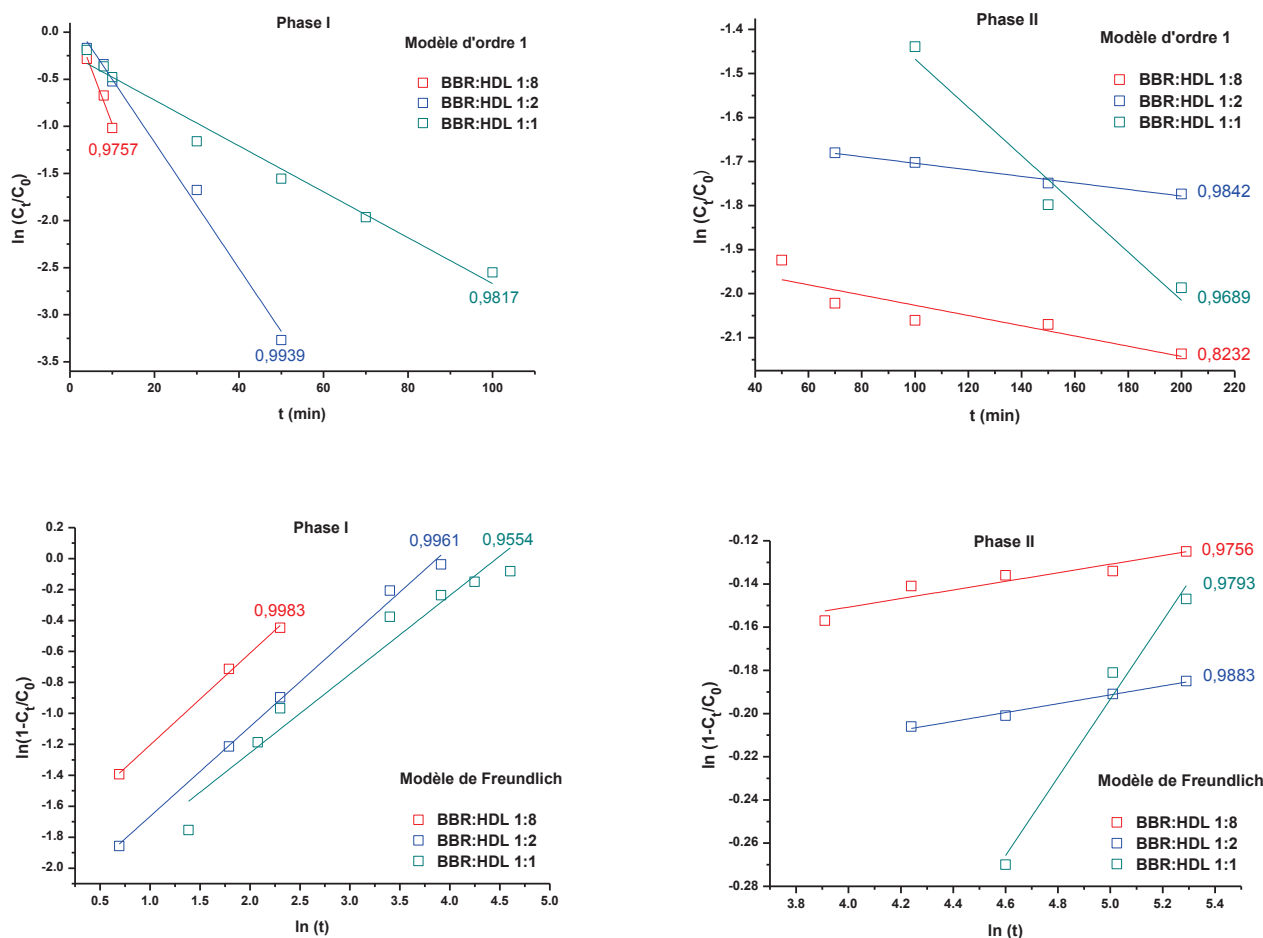


Fig. 4.17. Représentations graphiques des cinétiques de libération selon les modèles d'ordre 1 et Freundlich.

#### 4.3.4.5. Biocompatibilité: étude anti-bactérienne

Comme nous l'avons présenté précédemment, la BBR révèle un potentiel anti-bactérien après son immobilisation dans des phases MgAl-HDL. Il est nécessaire d'une part que le matériau hôte (précurseur ZnAl-HDL) soit biocompatible, mais d'autre part la cinétique de libération de la formulation biohybride BBR-ZnAl-HDL doit également permettre de détruire les cellules bactériennes. L'efficacité anti-bactérienne des différentes fractions préparées à différents rapports BBR:HDL a été testée sur les mêmes souches étudiées auparavant selon la même procédure décrite ci-dessus. La viabilité des cellules bactériennes mises en contact avec les formulations biohybrides est réduite et entraînant une destruction en fonction de la concentration de BBR dans le biohybride. Les inhibitions produites par les fractions biohybrides sont exposées dans le [Tableau 4.10](#). ZnAl-HDL comme MgAl-HDL ne montre aucune activité anti-bactérienne puisque la structure minérale ne contribue pas à l'activité anti-bactérienne, alors que l'activité de BBR a été fixée à 100% comme référence. D'autre

part, les fractions de biohybrides ont démontré une activité anti-bactérienne fortement dépendante de la quantité de la biomolécule retenue au sein des feuilletts HDL. Toutefois, la zone d'inhibition augmente au fur et à mesure de l'augmentation de la quantité de BBR chargé sur l'HDL suggérant que plus de BBR est disponible plus l'effet anti-bactérien est important. Ces résultats indiquent aussi que la BBR est libérée des biohybrides sous forme active. D'après les tests anti-bactériens, *P. aeruginosa* est plus sensible envers la BBR, alors que *S. aureus* et *B. subtilis* semblent être moins sensibles. Cela peut se traduire par la différence dans la structure de l'enveloppe cellulaire résultant du fait que *P. aeruginosa* est une bactérie à Gram-négatif tandis que *S. aureus* et *B. subtilis* sont des bactéries à Gram-positifs. Classiquement, les bactéries sont divisées en deux groupes principaux: les bactéries à Gram-positifs et les bactéries à Gram-négatifs. Les deux groupes ont une enveloppe cellulaire constituée d'une membrane cytoplasmique (ou membrane interne) et d'un espace périplasmique (paroi cellulaire composée de peptidoglycane): dans les Gram-positives, la paroi est épaisse, alors que dans les Gram-négatives, la paroi est mince. Dans les bactéries à Gram-négatives, la paroi cellulaire est entourée par une membrane externe contenant des lipopolysaccharides et des lipoprotéines. Les porines sont des protéines présentes dans cette membrane cellulaire, permettant aux substances de passer à travers cette dernière. Dans les bactéries à Gram-positives, la paroi cellulaire de l'enveloppe cellulaire peut s'ancrer par l'acide lipotéichoïque (Fig. 4.18).

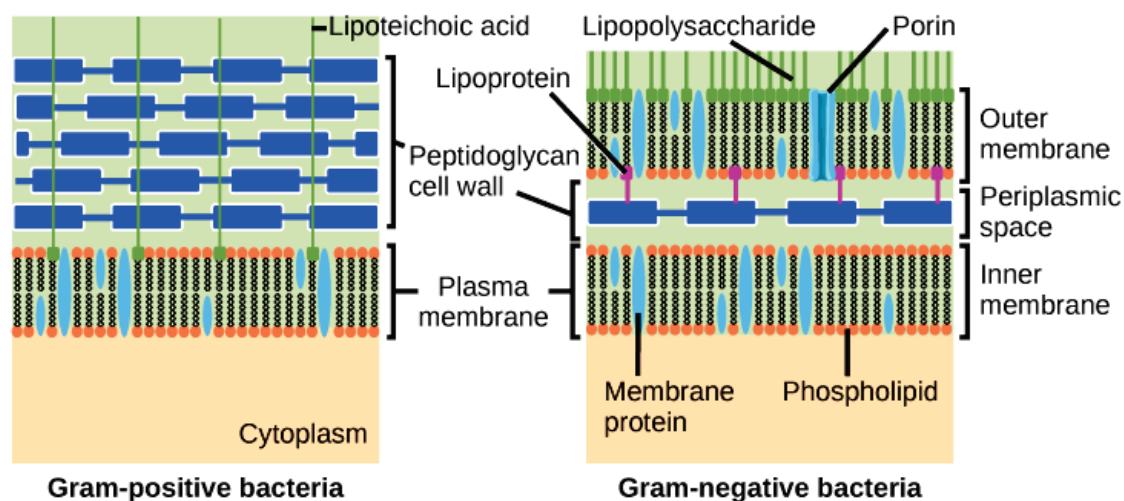


Fig. 4.18. La composition de l'enveloppe cellulaire dans les bactéries à Gram-positives et à Gram-négatives (OpenStax college, 2013).



Deux mécanismes d'interactions possibles peuvent être responsables de l'activité anti-bactérienne observée. Le premier mécanisme implique l'adsorption du *P. aeruginosa* sur les feuillettes brucitiques chargés positivement et interagissant avec les molécules chargées négativement sur la membrane externe de l'enveloppe cellulaire, composée de phospholipides et lipopolysaccharides. Les lipopolysaccharides confèrent une charge fortement négative à la surface cellulaire des bactéries à Gram-négatives. Des études similaires ont montré cette tendance, se trouvent dans les travaux de Jiang et al., (2007), Rong et al., (2008), Meng et al., (2009) et Zhao et al., (2012). Alors que le deuxième mécanisme résulte de la charge positive révélée par la fonction ammonium dans la structure de BBR, qui pourrait détruire l'équilibre de charge de la membrane cytoplasmique de *P. aeruginosa* due à l'interaction électrostatique avec la membrane externe chargée négativement, en permettant leur passage au paroi cellulaire (Kim et Son, 2005; Sarkar et al., 2011). Le mécanisme de l'activité anti-bactérienne de BBR se décompose en différentes phases (Meng et al., 2009): (i) adsorption sur la surface de la cellule bactérienne (membrane externe), (ii) la diffusion sur la paroi peptidoglycane à travers les porines de la membrane externe, (iii) enchère pour la membrane cytoplasmique, (iv) perturbation de la membrane cytoplasmique, (v) libération des constituants cytoplasmiques et (vi) mort de la cellule.

**Tableau 4.10.** Performances anti-bactériennes des fractions biohybrides co-précipitées BZAC en fonction du rapport BBR:HDL.

Fraction	Zone d'inhibition ( <i>S. aureus</i> )			Zone d'inhibition ( <i>P. aeruginosa</i> )			Zone d'inhibition ( <i>B. subtilis</i> )		
	Diamètre moyen (mm)	CV %	% d'inhibition	Diamètre moyen (mm)	CV %	% d'inhibition	Diamètre moyen (mm)	CV %	% d'inhibition
ZnAl	5 ± 0,0	0	0	5 ± 0,0	0	0	5 ± 0,0	0	0
BBR:HDL 1:8	5 ± 0,0	0	0	9 ± 0,5	6	60	7 ± 0,5	7	54
BBR:HDL 1:2	7,17 ± 0,6	8	57	11,17 ± 0,6	6	77	10 ± 0,5	5	75
BBR:HDL 1:1	10 ± 0,0	0	79	12 ± 0,5	4	85	11 ± 1,0	9	80
BBR	12,7 ± 0,3	2	100	15 ± 0,9	6	100	13 ± 0,0	0	100

#### 4.3.5.5. Corrélation entre structure/microstructure, profil de libération et activité anti-bactérienne

À la lumière des résultats ci-dessus, une corrélation entre structure/microstructure, vitesse de libération et potentiel anti-bactérien peut être fait. Une importante quantité de biomolécule sur la surface cible (HDL) avec une libération lente permet une administration optimale. L'influence de l'interaction entre la BBR et les feuillettes HDL sur le taux de libération et l'efficacité anti-bactérienne peut être décrite par un véritable modèle d'association BBR–HDL. Les caractérisations physico-chimiques ont montré la création d'un défaut

d'empilement suivi par un désordre structural et une perte de cristallinité avec l'augmentation du rapport BBR:HDL. La plupart des molécules de la BBR se désorbent de la surface de l'HDL et diffusent dans le milieu en solution via un échange ionique externe, responsable de l'évolution rapide de la libération en phase I, alors que la forte diffusion de BBR au sein des feuillets HDL est responsable de l'exfoliation de ces dernières et du ralentissement de libération en phase II, qui prend plus de temps. La Figure 4.19 illustre un modèle réaliste de l'association BBR–HDL.



Fig. 4.19. Schéma représentatif de l'interaction BBR–HDL.

#### 4.4. Conclusion

L'étude de l'immobilisation de la BBR sur des phases hydroxydes doubles lamellaires MgAl et ZnAl en modifiant les conditions de synthèse a montré la possibilité de former des matériaux biohybrides quelle que soit la méthode de synthèse employée afin d'obtenir un nouveau système de libération de la BBR de type implant pour la voie ionique. Les synthèses directes par co-précipitation entraînent l'immobilisation d'une quantité de BBR plus importante. La méthode par co-précipitation permet de conserver le rapport BBR:HDL initial et ainsi de mieux contrôler la quantité de biomolécule. Ces nouveaux matériaux ont été caractérisés par différentes techniques physico-chimiques (DRX, IR, UV-vis, MEB, MET et angle de contact) qui nous ont permis de contrôler la structure et la composition des matériaux afin d'identifier le mécanisme d'immobilisation. L'immobilisation de la BBR sur les phases HDL a eu lieu sur la surface des cristallites HDL en entraînant une perte de cristallinité et un désordre structural au niveau de l'empilement des feuillets, fortement dépendant de la méthode de préparation et du taux de BBR retenue. Cependant, la spectroscopie infrarouge montre que la structure de la biomolécule immobilisée est globalement préservée. Les biohybrides obtenus sont utilisés par la suite pour évaluation de cinétiques de libération. L'HDL peut être utilisé dans une préparation thérapeutique et les phases co-précipités sont une parfaite illustration au regard de ses taux de libération et activités anti-bactériennes in-

vitro. En effet, la co-précipitation concentre mieux le principe actif (BBR) que la méthode d'échange et donne l'espoir d'utiliser ce principe actif à la hauteur d'autres spécialités pharmaceutiques couramment employées. Cette étude, au-delà de ses objectifs d'optimisation de l'immobilisation et libération de la BBR, est avant tout la validation de l'usage traditionnelle de la BBR dans un système d'administration performant à large application.

### Remerciements

Je tiens à exprimer ma sincère appréciation à tous ceux qui ont participé de manière constructive à la réalisation de ce travail de recherche. Une gratitude toute spéciale pour ce qui concerne la publication et révision attentive de la version anglaise du manuscrit, va à **Aisha Gharsalli** de "*LECOM School of Dental Medicine, FL 34211, USA*".

# Contribution des Hydroxydes Doubles Lamellaires à l'élaboration de matériaux d'électrodes: Vers une nouvelle génération de source d'énergie électrochimique

5.1 <u>INTRODUCTION</u> .....	98
5.2 <u>TECHNIQUES EXPERIMENTALES</u> .....	101
5.2.1 <u>Préparation des électrodes</u> .....	101
5.2.2 <u>Caractérisations physiques</u> .....	101
5.2.3 <u>Caractérisations électrochimiques</u> .....	102
5.2.4 <u>Teste de PCM</u> .....	102
5.3 <u>RESULTATS ET INTERPRETATIONS</u> .....	103
5.3.1 <u>Caractérisations structurales des HDL</u> .....	103
5.3.2 <u>Morphologie des HDL</u> .....	105
5.3.3 <u>Propriétés de surface: mesures statiques d'angle de contact</u> .....	106
5.3.4 <u>Propriétés électrochimiques</u> .....	108
5.3.4.1 <u>Voltammétrie cyclique (VC)</u> .....	108
5.3.4.2 <u>Spectroscopie d'impédance électrochimique (SIE)</u> .....	110
5.3.4.3 <u>Chronoampérométrie (CA)</u> .....	113
5.3.5 <u>Application comme matériau d'anode dans un prototype de PCM</u> .....	114
5.4 <u>CONCLUSION</u> .....	116

# Contribution des Hydroxydes Doubles Lamellaires à l'élaboration de matériaux d'électrodes: Vers une nouvelle génération de source d'énergie électrochimique

*Mohamed Amine Djebbi, Mohamed Braiek, Philippe Namour, Abdesslem Ben Haj Amara, et Nicole Jaffrezic-Renault*

**Résumé** Les hydroxydes doubles lamellaires (HDL) ont été largement utilisés au cours des dernières années en raison de leurs propriétés physico-chimiques uniques et du vaste éventail d'applications prometteuses dans de nombreux domaines telle que l'électrochimie. L'objet du présent chapitre consacré à la synthèse des HDL magnésium-aluminium (MgAl) et zinc-aluminium (ZnAl) est de développer des nouveaux matériaux d'électrodes qui pourraient constituer des alternatives précurseurs aux matériaux à base de carbone. Les nanofeuilles MgAl et ZnAl HDL ont été préparés par la méthode de co-précipitation à pH constant et uniformément supportés sur des matériaux d'électrode à base de carbone, laissant envisager leur utilisation en tant que matériau ou précurseur de matériau d'électrode. La composition chimique des matériaux ainsi que leurs propriétés physico-chimiques en termes de structure globale et locale, morphologie et propriétés de surface ont été étudiées par le couplage de différentes techniques d'analyse (XRD, IRTF, MEB, MET, angle de contact, BET) avant de réaliser la caractérisation des propriétés électrochimiques par voltammétrie cyclique, spectroscopie d'impédance électrochimique et chronoampérométrie. En effet, les caractérisations physico-chimiques ont montré la formation de composés bien cristallisés dans un système hexagonal ayant des propriétés hydrophiles. Les analyses électrochimiques montrent que ces matériaux ont un comportement réversible. La hiérarchie de l'électrode modifiée prouve que l'effet conducteur du matériau dépend considérablement des cations métalliques divalents et confère au processus global d'oxydo-réduction à l'interface électrode/électrolyte. Les propriétés capacitives des phases MgAl et ZnAl ont été étudiées pour utilisation en tant que matériaux d'électrodes de pile à combustible microbienne (PCM). Ces analyses ont alors montré les potentialités applicatives des matériaux HDL choisis en révélant une nouvelle voie remarquable des électrodes performantes et rentables.

**Mots-clés** **Hydroxyde double lamellaire (HDL), pile à combustible microbienne (PCM), co-précipitation, électrode modifié, performance électrochimique**

**Abstract** Layered double hydroxides (LDHs) have been widely used in the past years due to their unique physicochemical properties and promising applications in electroanalytical chemistry. The present paper is going to focus exclusively on magnesium-aluminum and zinc-aluminum layered double hydroxides (MgAl & ZnAl LDHs) in order to investigate the property and structure of active cation sites located within the layer structure. The MgAl and ZnAl LDH nanosheets were prepared by the constant pH co-precipitation method and uniformly supported on carbon-based electrode materials to fabricate an LDH electrode. Characterization by powder x-ray diffraction, Fourier transform infrared spectroscopy, scanning electron microscopy and transmission electron microscopy revealed the LDH form and well-crystallized materials. Wetting surface properties (hydrophilicity and hydrophobicity) of both prepared LDHs were recorded by contact angle measurement show hydrophilic character and basic property. The electrochemical performance of these hybrid materials was investigated by mainly cyclic voltammetry, electrochemical impedance spectroscopy and chronoamperometry techniques to identify the oxidation/reduction

processes at the electrode/electrolyte interface and the effect of the divalent metal cations in total reactivity. The hierarchy of the modified electrode proves that the electronic conductivity of the bulk material is considerably dependent on the divalent cation and affects the limiting parameter of the overall redox process. However, MgAl LDH shows better performance than ZnAl LDH, due to the presence of magnesium cations in the layers. Following the structural, morphological and electrochemical behavior studies of both synthesized LDHs, the prepared LDH modified electrodes were tested through microbial fuel cell configuration, revealing a remarkable, potential new pathway for high-performance and cost-effective electrode use in electrochemical power devices.

**Keywords** Layered double hydroxide (LDH), Microbial fuel cell (MFC), co-precipitation, modified electrode, electrochemical performance.

## 5.1. Introduction

Les piles à combustibles microbiennes (PCM), aussi appelées biopiles microbiennes sont des nouveaux systèmes électrochimiques qui exploitent des bactéries électrogènes pour produire de l'énergie électrique tout en dégradant les polluants organiques contenus dans les eaux usées (Logan et al., 2006 ; Rozendal et al., 2008). Cependant, l'optimisation des biopiles qui facilitera à terme la récupération d'énergie reste l'un des facteurs qui compromettent sérieusement l'efficacité de telles applications. Il est donc intéressant de chercher des moyens d'améliorer leurs performances électriques.

De nos jours, de sérieuses perspectives de développement et beaucoup de recherches se concentrent sur l'amélioration du transfert d'électrons entre les bactéries et les électrodes en utilisant diverses approches, matériaux et conception d'électrodes. Car il est démontré que la nature et la structure des électrodes sont des points cruciaux dans les PCM du fait que la réaction biologique se produit principalement sur leurs surfaces. En effet, au cours de la bio-électrocatalyse anodique, les micro-organismes oxydent la matière organique et les électrons libérés sont transférés vers l'électrode. D'où la nécessité de développer des stratégies nouvelles et simples pour fabriquer des anodes efficaces permettant d'augmenter la charge bactérienne et d'améliorer la capacité de transfert.

Le matériau qui constitue l'anode dans une PCM doit respecter plusieurs critères (Erable et al., 2010 ; Zhou et al., 2011). Le matériau idéal adapté devrait être un bon conducteur, biocompatible, durable, stable chimiquement et résistant à la corrosion. Il possède une surface spécifique élevée par unité de volume pour maximiser la croissance directe des micro-organismes à sa surface et une faible résistance électrique. Enfin, il devrait être facilement disponible et à bas coût. En fait, des matériaux à base de graphite commerciale tels que le feutre, tissu, carbone vitreux, papier et des barres semblent plus prometteurs et largement utilisés dans la conception d'anodes pour une PCM car ils réunissent toutes ces conditions (Min et Logan, 2004 ; Liu et al., 2010 ; Wei et al., 2011 ; Zhou et al., 2011). De plus la modification des matériaux d'anodes s'avère un moyen efficace d'améliorer le transfert d'électrons entre les bactéries et les électrodes.

Les argiles ont été fréquemment vu comme l'un des matériaux les plus prometteurs pour des électrodes à bas coût et aisément modifiable, susceptibles de répondre à des applications dans le domaine de la production ou du stockage d'énergie du fait de leurs propriétés uniques, telles que présence de lamelles métalliques, grande surface spécifique, granulométrie contrôlable et une stabilité thermique élevée (Zhao et al., 2010), laissant envisager leur



utilisation en tant que matériau ou précurseur de matériau d'électrode électrochimiquement active et stable (Li et al., 2006 ; Wang et al., 2013). Particulièrement intéressant en argiles anioniques, spécifiquement les composés hydrotalcite (HT), qui sont conformes aux normes environnementales et relativement faciles à synthétiser. Les HT présentent une large versatilité qui permet leur synthèse avec différentes combinaisons de cations divalents et trivalents pour applications spécifiques (Valente et al., 2010 ; Aguilar-Vargas et al., 2013), y compris la dégradation et l'adsorption d'une grande variété de polluants, comme des phénols, des colorants et des oxyanions (Goh et al., 2008 ; El Gaini et al., 2009 ; Valente et al., 2011). Récemment, Tonelli et al. (2013) et Mousty et al. (Mousty et al., 2013 ; Vialat et al., 2015) ont révélé les potentialités applicatives de certaines compositions des matériaux HT en tant que matériaux d'électrodes de capteurs et biocapteurs chimiques.

Les hydrotalcites (HT) sont des composés appelés argiles anioniques du fait des possibilités d'échange d'anions qu'ils possèdent, répondant à la formule  $Mg_6Al_2(OH)_{16}CO_3 \cdot 4H_2O$ . Même si les HT sont relativement rares dans la nature et sont associés à des formations métamorphiques, la plupart sont des matériaux de synthèse connue ailleurs par des hydroxydes doubles lamellaires (HDL). Les HDL sont constitués de feuillets d'hydroxydes métalliques de type brucitique  $Mg(OH)_2$  dans lesquels une partie des cations divalents  $M^{II}$  a été substitué par des cations trivalents  $M^{III}$  ce qui induit un excès de charges positives des feuillets. Cet excès de charge va être compensé par la présence d'anions  $A^{n-}$  dans l'espace interlamellaire (Rives, 2001 ; Duan et Evans, 2006). La composition des feuillets associés à la présence d'espèces chargée négativement donne ainsi la formule générale suivante:  $[M^{II}_1-xM^{III}_x(OH)_2]^{x+}[(A_{x/n})^{n-} \cdot yH_2O]$ , abrégé par  $(M^{II}M^{III}-A)$  pour des raisons de commodité (voir bibliographie).

En tant qu'argiles synthétiques largement étudiées, les HDL ont fait l'objet d'un grand nombre de travaux de recherches par la communauté d'électrochimistes. Cependant l'usage des HDL en tant que matériaux d'électrodes restera l'un des questions concrètes, il n'est pas préoccupant mais il faut s'en occuper afin d'améliorer son applicabilité et son efficacité (Indira et al., 1994 ; Kamath et al., 1994 ; Yarger et al., 2008 ; Obayashi et al., 2012). Il a ainsi été signalé dans la littérature que les HDL dont leur composition comprend des cations divalents et trivalents ou des médiateurs redox capable de subir une réaction d'oxydo-réduction dans une large gamme de potentiel appliqué et ont été proposés en tant que matériaux d'électrodes pour la transformation de l'énergie électrique (Qiu et Villemure, 1997 ; Ballarin et al., 1998 ; Ballarin et al., 1999 ; Scavetta et al., 2002 ; Scavetta et al., 2003). C'est cette propriété conductrice qu'il est alors nécessaire d'améliorer soit par l'insertion

directement des cations métalliques redox dans les feuillets, soit par l'intercalation de molécules électroactives dans l'espace interfoliaire (Vialat et al., 2015). En conséquence, l'association de ces deux approches peut être envisagée pour moduler les propriétés intrinsèques de l'HDL (conductivité électronique, propriété acido-basique ou redox) (Sánchez-Valente et al., 2000) afin de créer un relais d'électron tout au long du matériau par augmentation de la conductivité inter et intrafeuillets ainsi que la conductivité interparticulaire. Par ailleurs, les études abordant le comportement électrochimique des HDL en se référant sur la nature des cations sont très limitées, elles sont dédiés aux HDL avec des métaux de transition comme Ni et Co (Scavetta et al., 2003 ; Scavetta et al., 2005 ; Scavetta et al., 2006 ; Faour et al., 2012 ; Vialat et al., 2013 ; Feng et al., 2014 ; Nejati et al., 2014). Du fait de leurs propriétés bénéfiques y compris faible coût, une bonne biocompatibilité, une forte activité catalytique, et une haute stabilité chimique, les matériaux HDL pourraient trouver une application en tant que matériaux d'anodes pour les piles à combustibles comme s'est rapporté très récemment dans la littérature (Ding et al., 2010 ; Zebda et al., 2011). A des fins analytiques, les électrodes modifiées à base des HDL sont principalement préparés sous forme de films minces déposés sur la surface de l'électrode (Guo et al., 2010). Typiquement, une goutte de la suspension colloïdale de l'HDL est déposée sur la surface de l'électrode puis laissée séchée à l'air (Tonelli et al., 2013). D'autres stratégies de synthèse ont été également appliquées pour la préparation des électrodes modifiées, comme par exemple le procédé d'électrosynthèse qui consiste à modifier l'électrode au cours de la synthèse de la matrice HDL (Scavetta et al., 2007) et la méthode dite couche par couche "layer by layer" qui permet de réaliser des assemblages supramoléculaires des feuillets HDL, et de tout substrat chargé négativement (Guo et al., 2010 ; Shao et al., 2010).

La maîtrise des performances des matériaux HDL nécessite une compréhension de plus en plus fine de leur structure ainsi que des relations entre structure, morphologie, comportement électrochimique et propriétés d'emploi. Le présent chapitre est dédié à une étude comparative entre MgAl et ZnAl HDL en termes de structure, morphologie et performance électrochimiques pour arriver enfin à une application potentielle pour la production d'énergie tant que précurseurs de PCM.

## 5.2. Techniques expérimentales

### 5.2.1. Préparation des électrodes

Les électrodes de carbone modifiées ont été préparées en déposant un mélange de suspension aqueuse d'HDL (MgAl et/ou ZnAl) sur la surface de l'électrode ; carbone vitreux ( $A = 0,07 \text{ cm}^2$ ) et feutre de carbone ( $A = 1,13 \text{ cm}^2$ ). Typiquement, 10 et 100  $\mu\text{L}$  d'une suspension d'HDL (2 mg/mL) dans de l'eau déionisée, agitée toute une nuit, ont été déposés respectivement sur le carbone vitreux et le feutre de carbone puis séchés à température ambiante. Avant le dépôt, la surface de carbone vitreux est polie avec un papier de verre et lavée à l'acétone puis polie ensuite avec une pâte d'alumine  $\text{Al}_2\text{O}_3$  avant d'être finalement rincée à l'eau et à l'éthanol. Dans le cas du feutre de carbone, le feutre est oxydé dans une solution d'acide nitrique (0,1 M) et inséré à l'intérieur d'un porte-échantillon (092-C 013) ayant un diamètre extérieur de 12 mm. La connexion entre le porte-échantillon et le feutre de carbone s'est fait par d'acier inoxydable.

### 5.2.2. Caractérisations physiques

Les diffractions des rayons X ont été enregistrées sur un diffractomètre à poudre D8 Advance en géométrie Bragg-Brentano, équipé d'un tube anticathode de cuivre en utilisant des rayonnements  $\text{CuK}\alpha$  ( $\lambda = 1,5406 \text{ \AA}$ , 40 kV et 40 mA) et d'un monochromateur avant en germanium. Les diffractogrammes ont été réalisés dans le domaine angulaire en  $2\theta$  : 2-70°, avec un incrément angulaire en  $2\theta$  de 0,02° et un temps d'intégration par comptage de 129,07 s. Les mesures infrarouges ont été réalisées en mode absorbance avec un spectromètre à transformée de Fourier de type Nicolet 200 FTIR (Thermo Scientific) sur le domaine de nombre d'ondes de 400 à 4000  $\text{cm}^{-1}$ . Les analyses MEB ont été effectuées en utilisant un microscope Quanta 200 FEI (FEI Corp., USA) avec une tension d'accélération de 10 kV et des agrandissements de 30000 et 38030. Les clichés MET ont été pris sur un microscope Tecnai G2 opérant à 200 kV; les poudres HDL sont mises en suspension dans de l'éthanol durant une nuit et une goutte de la suspension a été déposée sur une grille de cuivre (400 mesh) couverte de carbone et mis à sécher à température ambiante.

Les mesures de mouillabilités des surfaces ont été déterminées à l'aide d'un appareil Contact Angle Metre DIGIDROP GBX; gouttelette d'eau de 2  $\mu\text{L}$  est utilisée dans les mesures pour un temps d'acquisition de 30 s et les échantillons HDL sont séchés sous forme de films minces sur une lame de verre. La surface spécifique a été déterminée par des mesures d'adsorption-désorption d'azote sur un ASAP 2020 gas adsorption Instruments. Avant

traitement, les échantillons sont été dégazés pendant 2 h sous un vide de  $10^{-2}$  torr environ, à 200 °C.

### 5.2.3. Caractérisations électrochimiques

Les analyses électrochimiques ont été réalisées en utilisant un potentiostat VoltaLab 80 PGZ 402 piloté par le logiciel VoltaMaster 4. Les expériences ont été faites dans un électrolyte de  $K_4Fe(CN)_6$  (10 mM) + PBS (20 mM, pH 7,4) en utilisant une cellule à trois électrodes, comprenant une électrode au calomel saturée (ECS) comme électrode de référence, un fil de platine comme contre électrode les électrodes de carbone vitreux ou de feutre de carbone comme électrode de travail. Les courbes de voltammétrie cyclique VC ont été enregistrées sur des fenêtres de potentiels comprises entre -0,6 et 0,6 V (vs. ECS) avec des vitesses de balayages de 0,01 à 0,3 V/s. Les mesures d'impédances IES ont été enregistrées sur une gamme de fréquence de 100 mHz à 100 kHz et avec une amplitude de signal de -0,4 V. Les tracés de Nyquist obtenus ont été modélisés à l'aide de circuits équivalents et du logiciel VoltaMaster 4. L'évolution du courant stationnaire en fonction du temps a été enregistrée par des mesures de chronoampérométrie CA à 0,2 V.

### 5.2.4. Test de PCM

Une chambre simple de type « Wheaton cell » (200 mL) a été mise en place dans le laboratoire à température ambiante. Trois différentes anodes de dimensions (2,5 cm × 2,5 cm : 6,25 cm<sup>2</sup>) ont été utilisées dans le système de PCM; feutre de carbone nu, feutre de carbone/MgAl HDL et feutre de carbone/ZnAl HDL. La cathode utilisée est un feutre de carbone de diamètre 2,5 cm. Les systèmes de PCM ont été remplis avec 150 mL d'effluent primaire de la station de traitement des eaux résiduaires de Bizerte et nourris avec 1 g/L d'acétate de sodium dans 50 mmol/L de tampon phosphate (pH 7,4) (Shi et al., 2012). Le contact électrique avec les électrodes est assuré par des fils de titane. Le pH de système est de l'ordre de  $7,0 \pm 0,3$ . Les anodes microbiennes ont été soumises à une polarisation constante de 0,2 V vs. ECS pendant 30 jours. Les tensions de système ont été contrôlées toutes les 30 min à l'aide d'un voltmètre numérique DT.92058. Les courbes de polarisation ont été obtenues en variant la résistance de 10 à  $10^6 \Omega$ . Pour la résistance appliquée, la densité de courant est calculée à partir de la loi d'Ohm  $i = E/R$  normalisée à la surface projetée de l'anode où  $i$  est le courant,  $E$  la tension mesurée et  $R$  la résistance. Les densités de puissances étaient calculées en utilisant l'équation  $P = iE$ , et normalisées à la surface projetée de l'anode.

### 5.3. Résultats et interprétations

#### 5.3.1.1. Caractérisations structurales des HDL

Les diffractogrammes X des phases HDL préparées MgAl et ZnAl sont présentés sur la [Figure 5.1](#). Les diffractogrammes démontrent deux types de réflexions ; (i) des réflexions intenses, aigus et symétriques : 003, 006, 110 et 113, ainsi que (ii) des réflexions larges antisymétriques : 012, 015 et 018, correspondent à des valeurs d'angle élevées, caractérisant une phase pure de type hydrotalcite indexées dans un groupe d'espace  $R\bar{3}m$  comme vu dans les chapitres précédents ([Chitrakar et al., 2008](#) ; [Feng et al., 2012](#)). Nous observons ainsi une différence d'intensité de réflexion 003 caractéristique de la distance interlamellaire entre les deux phases se traduisant par une différence de degré de cristallinité. La valeur moyenne calculée de cette distance, de l'ordre de 0,78 nm pour les deux phases ([Tableau 5.1](#)), témoigne de la formation d'HDL intercalés par les anions chlorures, en accord avec celle trouvé dans la littérature ([Barriga et al., 1998](#)). La position en  $2\theta$  des réflexions  $00l$  et 110 renseigne directement sur les valeurs des paramètres de maille,  $c$  et  $a$  respectivement. Comme vu précédemment, le paramètre intrafeuillelet  $a = 2d_{110}$  est relié à la nature des cations (rayon ionique) constituant le feuillelet et leur rapport alors que le paramètre  $c = 3/2[d_{003} + 2d_{006}]$ , défini dans la direction d'empilement des feuillelets, dépend de l'épaisseur des feuillelets et de la nature de l'anion intercalé. Les valeurs de ces paramètres sont regroupées dans le [Tableau 5.1](#).

**Tableau 5.1.** Données cristallographiques des phases HDL synthétisées.

HDL	$d_{003}$ (nm)	$d_{006}$ (nm)	$d_{110}$ (nm)	Paramètre de maille (nm)	
				$c$	$a$
MgAl	0,780	0,388	0,152	2,337	0,304
ZnAl	0,782	0,389	0,153	2,341	0,307

La largeur des réflexions  $00l$  à mi-hauteur (FWHM : Full Width at Half Maximum) ainsi que le faible rapport signal/bruit témoignent de la cristallinité des matériaux. Celle-ci est liée aux aspects qui influent la formation d'une phase HDL (facteurs liés aux cations, vitesse d'addition) qui limitent la croissance des cristallites. La variation des domaines de cohérence  $D$  et les micro-contraintes  $\varepsilon$  dans le matériau a pu être réalisé à partir de la largeur intégrale  $\beta$  et l'angle de diffraction de Bragg  $\theta$  des réflexions, en se référant aux équations de Debye-Scherrer ([Eq. 4.1 et 5.1](#)):

$$D = \frac{k \cdot \lambda}{\beta \cos\theta} \quad \text{Equation 4.1}$$

$$\varepsilon = \frac{\beta}{4 \tan\theta} \quad \text{Equation 5.1}$$

Où  $k$  représente la constante de Scherrer ( $k = 0,9$ ) et  $\lambda$  est la longueur d'onde du rayonnement X. Les tailles des cristallites et les micro-contraintes calculées à partir des raies de diffraction sont regroupées dans le [Tableau 5.2](#).

**Tableau 5.2.** La variation de tailles des cristallites et des micro-contraintes des phases HDL synthétisées.

HDL	$2\theta$ (°)	Orientation	Taille des cristallites D (nm)	Micro-contrainte $\varepsilon$
MgAl	11,33	(003)	194,7	0,542
	22,55	(006)	53,5	1,710
	60,69	(110)	277,0	0,352
ZnAl	11,88	(003)	266,2	0,435
	23,63	(006)	111,2	0,358
	60,35	(110)	399,6	0,068

La dimension des cristallites selon la direction de  $a$  sont plus importantes que celle selon  $c$ . Cette différence peut résulter soit d'un effet individuel, soit d'un effet combiné du domaine de cohérence ou de la micro-contrainte. On note aussi une différence considérable de taille de cristallite entre MgAl et ZnAl, qui peut s'expliquer par l'influence du rayon ionique, la charge et les orbitales disponibles du cation divalent.

L'observation par spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier permet d'étudier la nature des liaisons des feuillets ainsi que de l'anion intercalé. L'étude des spectres IRTF des phases MgAl et ZnAl préparées révèle toutes les bandes caractéristiques de la structure HDL. Ces bandes sont présentées sur la [Figure 5.2](#) et correspondent aux vibrations des liaisons à l'intérieur du feuillet (O–M–O et M–O) mais aussi des liaisons des espèces présentes entre les feuillets (anions chlorures et H–OH). Comme nous l'avons vu aux chapitres précédents, la bande de vibrations situées vers  $440\text{ cm}^{-1}$  correspond à la bande de déformation O–M–O et les bandes de vibration entre  $850$  et  $550\text{ cm}^{-1}$  sont attribuées aux vibrations d'élongation M–O ([Rives, 2001](#)). La bande à  $1640\text{ cm}^{-1}$  est attribuée à la bande de valence de formation de molécules  $\text{H}_2\text{O}$  intercalées. Alors que la bande à  $1360\text{ cm}^{-1}$  est attribuée à la vibration symétrique des anions  $\text{CO}_3^{2-}$  qui se chevauche avec celle du  $\text{Cl}^-$  interlamellaire due à la contamination de surface par des anions carbonates adsorbés qui tend à masquer la réponse infrarouge des anions chlorures.

D'autre part la large bande centrée vers  $3400\text{ cm}^{-1}$  est attribuée à la vibration d'élongation du groupement hydroxyle O–H présent dans les feuillets brucitiques autant que dans les molécules  $\text{H}_2\text{O}$  principalement intercalées dans l'espace interfeuillet.

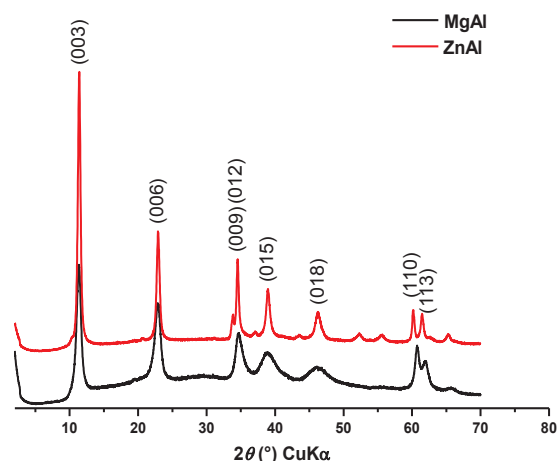


Fig. 5.1. Diffractogrammes X des phases MgAl et ZnAl HDL.

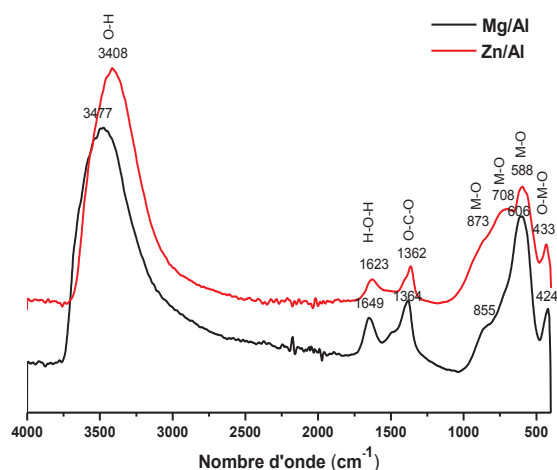


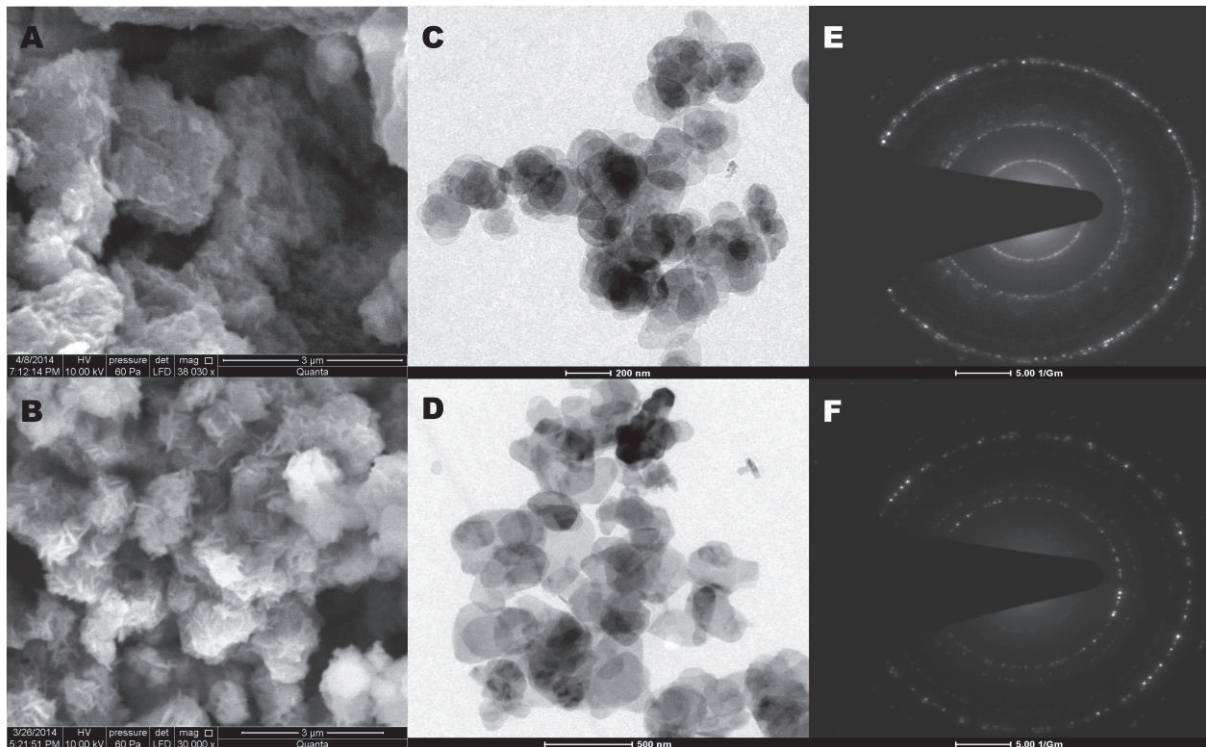
Fig. 5.2. Spectres infrarouges des phases MgAl et ZnAl HDL.

### 5.3.2. Morphologie des HDL

Les images MEB et MET des deux phases HDL (MgAl et ZnAl) sont montrées sur la Figure 5.3. Ils se présentent sous forme de plaquettes hexagonales de dimensions variables (Fig. 5.3C et 5.3D) s'agréant entre elles pour former des cristallites secondaires en forme de rose des sables ou de château de cartes (Fig. 5.3A et 5.3B), structure typique de matériau de type hydrocalcite (Evans et Duan, 2006). Cependant, la taille des particules de ZnAl (Fig. 5.3D) (100-500 nm) semble plus importante que la taille des plaquettes observées pour MgAl (Fig. 3C), inférieure à 200 nm. Cette observation est en accord avec l'évolution de la taille des domaines cohérents obtenus à partir de l'analyse par XRD discutée précédemment. La variation de taille des particules apparaît donc être liée à la composition. En outre, des clichés



SAED ont été également illustrés sur la [Figure 5.3](#) (Fig. 5.3E et 5.3F), montrent des anneaux diffus qui témoignent à des matériaux polycristallins.



**Fig. 5.3.** Clichés MEB (gauche), MET (milieu) et SAED (droite) des phases HDL préparées MgAl (A, C et E) et ZnAl (B, D et F).

### 5.3.3. Propriétés de surface: mesures statiques d'angle de contact

Des mesures statiques d'angles de contact témoignent des propriétés de mouillabilité (la charge de surface, l'énergie libre de surface et le caractère hydrophobe/hydrophile) sont considérées comme l'un des points essentiels pour comprendre la nature des interactions qui s'établissent à la surface des cristallites HDL. Le [Tableau 5.3](#) présente les différents paramètres de surfaces des phases MgAl et ZnAl HDL révélés avec trois liquides, eau, formamide et diiodométhane. Ces propriétés de surface ont été obtenues en se référant à l'approche de Van Oss ([Eq. 5.2](#)), l'équation de Young ([Eq. 5.3](#)) et les tensions interfaciales des trois liquides cités ci-dessous et sont rapportées dans le [Tableau 5.4](#).

$$\gamma^{\text{TOT}} = \gamma^{\text{LW}} + \gamma^{\text{AB}} = \gamma^{\text{LW}} + 2(\gamma^{\text{LW}})^{1/2} \quad \text{Equation 5.2}$$

où :

- $\gamma^{\text{TOT}}$  : l'énergie libre par unité de surface ( $\text{mJ}/\text{m}^2$ ),
- $\gamma^{\text{LW}}$  : la composante apolaire de Lifshitz-Van Der Waals,
- $\gamma^{\text{AB}}$  : la composante polaire acide-base,
- $\gamma^-$  : l'interaction donneur d'électron,
- $\gamma^+$  : l'interaction accepteur d'électron.

$$W_a = \gamma_l(1 + \cos\theta') = 2(\gamma_s^{LW}\gamma_l^{LW})^{1/2} + 2(\gamma_s^-\gamma_l^+)^{1/2} + 2(\gamma_s^+\gamma_l^-)^{1/2} \quad \text{Equation 5.3}$$

où :

$W_a$  : l'énergie d'adhésion par unité de surface ( $\text{mJ/m}^2$ ),

l : la phase liquide,

s : la phase solide,

$\theta'$  : l'angle de contact du liquide avec le substrat.

**Tableau 5.3.** Les tensions superficielles des liquides de référence (Azeredo et al., 1997), en  $\text{mJ/m}^2$ .

Liquide	$\gamma^{\text{TOT}}$	$\gamma^{\text{LW}}$	$\gamma^+$	$\gamma^-$
Eau	72,8	21,8	25,5	25,5
Formamide	58	39	2,3	39,6
Diiodométhane	50,8	50,8	0	0

L'analyse des résultats du [Tableau 5.4](#) montre que les deux phases HDL (MgAl et ZnAl) ont un caractère hydrophile. Les supports modifiés par HDL présentent un angle inférieur à  $90^\circ$  ainsi que les propriétés de mouillabilité sont fortement dépendant de l'énergie d'adhésion d'eau, la surface est de plus en plus hydrophobe au fur et à mesure que  $W_s$  devient plus négative. De plus, ils montrent des valeurs proches de la composante apolaire, possèdent une surface bipolaire ( $\gamma_s^{\text{AB}} \neq 0$ ) et laissant témoigner de matériaux de caractère donneur. La composante  $\gamma_s^-$  est plus élevée que  $\gamma_l^+$  révèle le caractère basique de ces matériaux. Ce caractère polaire peut se traduire par la présence du groupement hydroxyle au sein des feuilletts brucitiques et/ou des molécules d'eau intercalés. Cependant, MgAl révèle une plus importante interaction polaire que ZnAl ( $\gamma_s^{\text{AB}}$  de 9.6 et 5.2  $\text{mJ/m}^2$ , respectivement, pour MgAl et ZnAl HDL), bien que MgAl est moins donneur que ZnAl, les rendant ainsi plus utile en tant que milieu nourrissant pour l'électrolyse microbienne. Par ailleurs, l'énergie libre totale par unité de surface du MgAl est légèrement élevée que pour ZnAl, ces valeurs sont typiques pour des surfaces ayant des énergies libres intermédiaires.

**Tableau 5.4.** Angles de contact ( $^\circ$ ), les composantes de tension superficielle, l'énergie libre totale et l'énergie d'adhésion d'eau  $W_s$  en  $\text{mJ/m}^2$  des phases MgAl et ZnAl HDL.

H D L	Angle de contact			Composantes d'énergie libre				Energie totale	$W_s$
	$\theta'_E$	$\theta'_F$	$\theta'_{DM}$	$\gamma_s^{\text{LW}}$	$\gamma_s^-$	$\gamma_s^+$	$\gamma_s^{\text{AB}}$		
MgAl	23,4	17,4	28,4	43,4	43,5	0,5	9,6	53,0	-10,15
ZnAl	13,4	20,3	14,5	46,4	58,2	0,1	5,2	51,6	-1,50

\*E: Eau, F: Formamide et DM: Diiodométhane

### 5.3.4. Propriétés électrochimiques

Après avoir réalisé les caractérisations physico-chimiques développées précédemment, les caractérisations électrochimiques ont été menées sur les matériaux HDL préparés sous forme de films minces déposés à la surface des électrodes de carbone, carbone vitreux et feutre de carbone sans aucun additif afin de mieux voir la réponse électrochimique des matériaux HDL, ce qui constitue l'enjeu principale de ce chapitre. La voltammétrie cyclique (VC), la spectroscopie d'impédance électrochimique (SIE) ainsi que la chronoampérométrie (CA) ont été employées à ces fins.

#### 5.3.4.1. Voltammétrie cyclique (VC)

Afin de mieux comprendre l'effet du cation divalent (Mg ou Zn) sur les performances conductrices du matériau, une étude par voltammétrie cyclique a été réalisée sur les deux phases HDL en tant que précurseur d'électrode. La [Figure 5.4](#) montre la comparaison entre les courbes de voltammétrie cyclique des électrodes modifiées par MgAl et ZnAl, dans une solution tampon phosphate PBS (20 mM, pH 7,4) contenant (10 mM) du ferrocyanure de potassium  $K_4Fe(CN)_6$ . La réponse électrochimique des deux matériaux met en évidence l'activité électrochimique du fer accumulé dans la structure HDL (couple redox  $Fe^{II}/Fe^{III}$ ) qui se manifeste par un déplacement des potentiels d'oxydation  $E_{p,a}$  (potentiel anodique) et de réduction  $E_{p,c}$  (potentiel cathodique) et par l'intensité de courants obtenus ( $I_{p,a}$  et  $I_{p,c}$ ). La [Figure 5.4A](#) présente les voltamogrammes du carbone vitreux et carbone vitreux modifié, alors que la [Figure 5.4B](#) présente les voltamogrammes du feutre de carbone et du feutre de carbone modifié. On observe ainsi qu'une paire réversible de pics d'oxydo-réduction est obtenue, sauf pour le feutre de carbone nue aucun pic n'a été enregistré. En outre, on note également un changement notable de couleur du blanc au jaune à la surface d'électrodes, laissant présager que le processus d'oxydation commence à partir du bord de dépôt et se propage vers le centre des films HDL. Le processus d'oxydo-réduction au sein des feuillets HDL peut donc être décrit par la réaction suivant :



Le [Tableau 5.5](#) donne les caractéristiques relevées sur les voltamogrammes : potentiel de pics en oxydation et réduction  $E_{p,a}$  et  $E_{p,c}$  ainsi que leurs intensités de courant ( $I_{p,a}$  et  $I_{p,c}$ ), l'écart entre les pics d'oxydation et de réduction et le rapport entre les intensités des pics d'oxydation et de réduction. En effet, les positions des pics d'oxydation et de réduction des différentes électrodes sont : 0,298 V, 0,109 V pour le carbone vitreux nu ; 0,266 V, 0,131 V

pour le carbone vitreux modifié par MgAl ; 0,252 V, 0,134 V pour le carbone vitreux modifié par ZnAl ; et vers 0,255 V, 0,131 V pour le feutre de carbone modifié par MgAl. Alors que le feutre de carbone modifié par ZnAl n'induit pas de modification notable du comportement électrochimique du couple  $Fe^{II}/Fe^{III}$ , les pics d'oxydation et de réduction sont faibles et larges. En comparaison entre les électrodes de carbone nu et les électrodes de carbone modifié, la réponse électrochimique augmente et l'écart entre les potentiels anodique et cathodique ( $\Delta E_{a,c}$ ) diminue. Un faible écart et un faible rapport d'intensité  $I_{p,a}/I_{p,c}$  témoigne à un transfert rapide et facile d'électrons au travers des feuillettes HDL. D'autre part, les pics de courant varient linéairement avec la vitesse de balayage dans une gamme de 0,01 à 0,3 V/s comme c'est montré dans la [Figure 5.4](#), indiquant que la réaction électrochimique se fait sous contrôle diffusionnel.

**Tableau 5.5.** Les pics anodiques et cathodiques relevées sur les voltamogrammes ainsi que la résistance de transfert de charge déterminée par impédance électrochimique des électrodes de carbones nus et modifiés.

Electrode	$E_{p,a}$ (V)	$E_{p,c}$ (V)	$\Delta E_{a,c}$ (V)	$I_{p,a}$ ( $\mu A$ )	$I_{p,c}$ ( $\mu A$ )	$I_{p,a}/I_{p,c}$	$R_{CT}$ (kohm)
Carbone Vitreux	0,298	0,109	0,189	37,88	-21,20	1,78	202,4
MgAl HDL/ Carbone Vitreux	0,266	0,131	0,135	42,79	-25,31	1,69	185,5
ZnAl HDL/ Carbone Vitreux	0,252	0,134	0,118	33,71	-20,98	1,60	201,4
Feutre de Carbone	-	-	-	-	-	-	161,0
MgAl HDL/ Feutre de Carbone	0,255	0,131	0,124	22,91	-14,73	1,55	33,13
ZnAl HDL/ Feutre de Carbone	-	-	-	-	-	-	73,77

En résumé, ces résultats suggèrent que : (i) les électrodes de carbone modifiés sont plus réversible que les électrodes de carbone nus ; un faible écart ( $\Delta E_{a,c}$ ) prouve une meilleur réversibilité, (ii) la présence des films HDL induit une modification notable du comportement électrochimique du couple  $Fe^{II}/Fe^{III}$  ; (iii) les films HDL présentent un caractère non-bloquant vis-à-vis de la diffusion d'une espèce électroactive soluble et peuvent servir en tant que structure hôte pour différents anions tel que l'hexacyanoferrate comme l'a démontré [Carpani et al. \(2006\)](#) et (vi) la réponse électrochimique obtenue par le matériau MgAl semble supérieur à celle obtenue par ZnAl et peut se traduit par un meilleur processus de diffusion et répartition des espèces chargés au niveau de l'interface externe et interne solide/électrolyte à travers la membrane HDL jusqu'à l'électrode, MgAl est plus favorable au confinement des ions ferrocyanures.

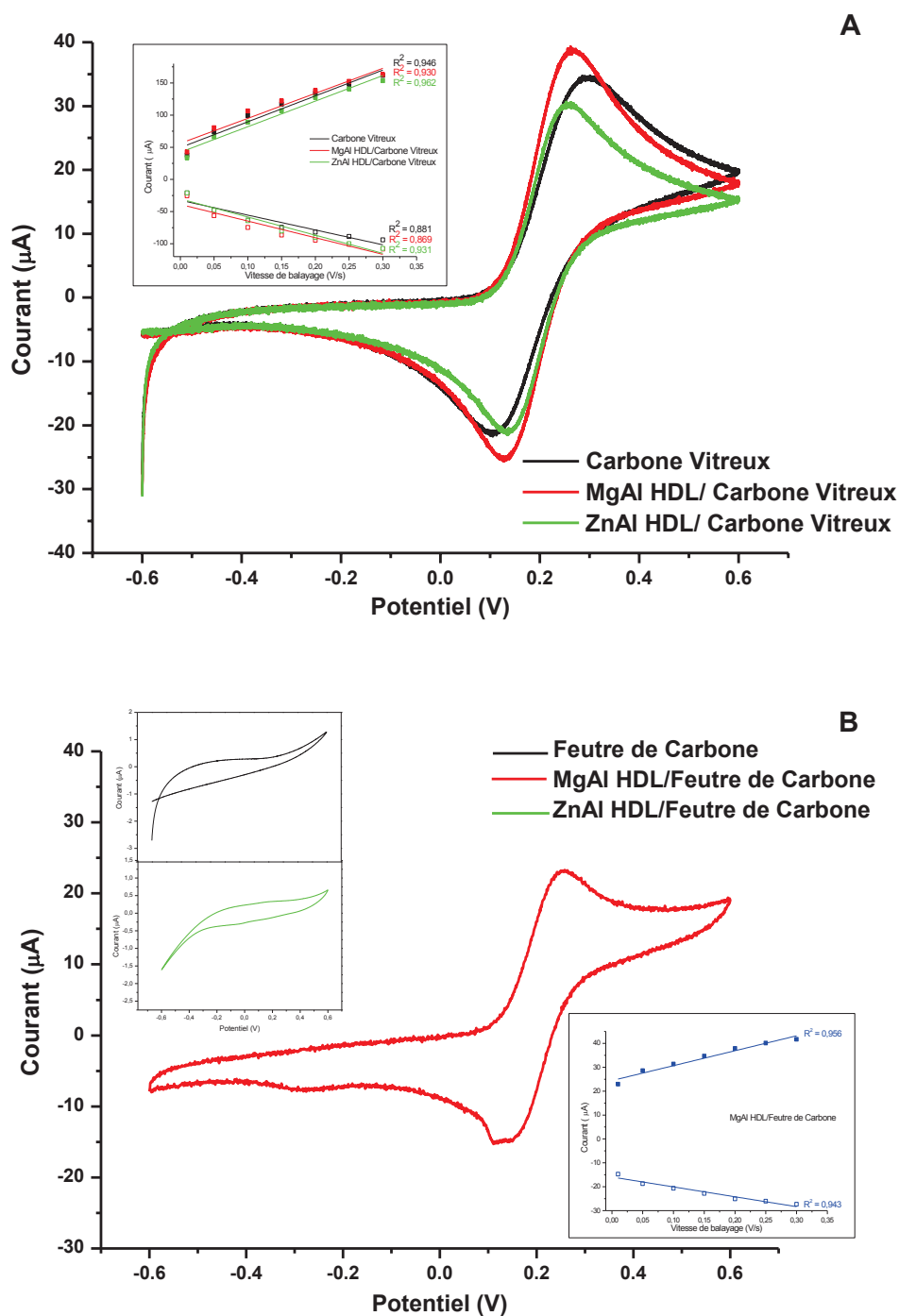


Fig. 5.4. Courbes de VC des électrodes de carbone nu et modifié, (A) carbone vitreux et (B) feutre de carbone, obtenues à une vitesse de balayage de 0,01 V/s dans un tampon phosphate (20 mM, pH 7,4) +  $K_4Fe(CN)_6$  (10 mM).

### 5.3.4.2. Spectroscopie d'impédance électrochimique (SIE)

Après avoir présenté les résultats obtenus par VC et afin d'aller plus loin dans notre étude des changements de conductivité pendant le processus électrochimique, des mesures par spectroscopie d'impédance électrochimique (SIE) ont été enregistrées dans une gamme de

fréquence allant de 100 mHz à 100 kHz avec une amplitude de -0,4 V. Ces mesures sont effectuées au potentiel de circuit ouvert ( $OCP_f$ ) après 10 cycles d'oxydation/réduction en VC. Toutes les données d'impédance ont été stimulées à l'aide du modèle de circuit équivalent représenté sur la Figure 5.5.

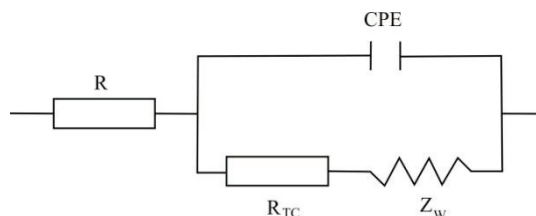


Fig. 5.5. Circuit équivalent employé pour modéliser les diagrammes de Nyquist obtenus avec des électrodes de carbone nu et modifié.  $R_s$  est la résistance ohmique,  $R_{TC}$  la résistance de transfert de charge,  $Z_W$  l'impédance de Warburg et CPE la constante de phase.

Les spectres EIS obtenus à l' $OCP_f$  pour les deux phases HDL MgAl et ZnAl recouverts à la fois par le carbone vitreux et le feutre de carbone sont présentés sur la Figure 5.6 sous la forme de diagrammes de Nyquist. On remarque des comportements bien différents d'une électrode à l'autre allant d'une allure en demi-cercle à une ligne quasiment droite.

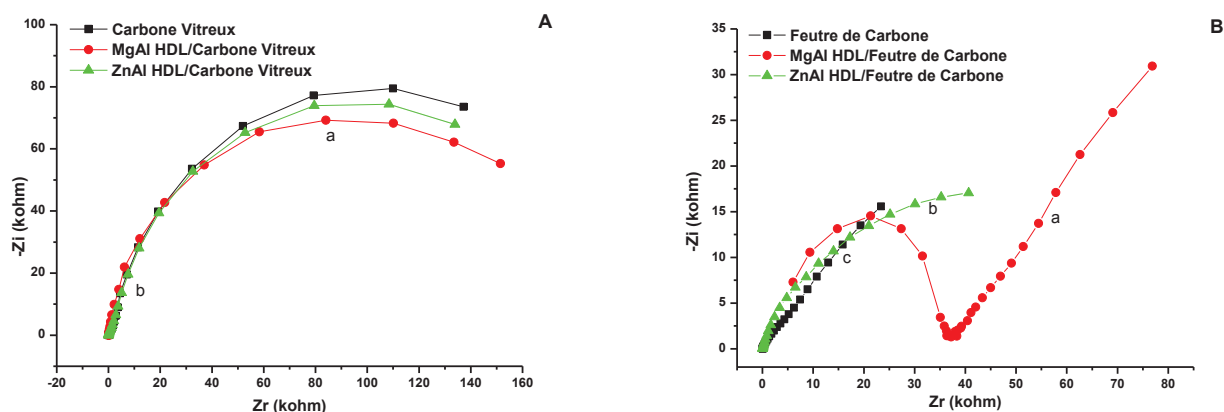


Fig. 5.6. Diagrammes de Nyquist des électrodes de carbones nus et modifiés, (A) carbone vitreux et (B) feutre de carbone.

La Figure 5.6A présente ainsi le comportement du carbone vitreux nu et modifié, tous les spectres montrent des caractéristiques communes dans la gamme allant de faible à haute fréquence : (a) des grands arcs semi-circulaires dans la région de basse fréquence dont le diamètre diminue en présence de l'HDL et (b) des lignes quasi-droites confondues d'une pente de  $60^\circ$  à la région des hautes fréquences. Particulièrement intéressant est la région de basses fréquences, les demi-cercles sont attribués généralement dans le circuit équivalent à la résistance de transfert de charge  $R_{TC}$  en parallèle avec la capacité de la double couche. La



composante principale de ce circuit est la résistance  $R_{CT}$  qui est un témoin direct de la conductance électronique du matériau, plus celle-ci est faible plus le transfert électronique est facilité (Feng et al., 2014). Le diamètre du demi-cercle subit à une diminution lors de l'ajout de l'HDL en comparaison de l'électrode nu, cela peut s'expliquer par une augmentation remarquable de la conductivité électronique suite à l'immobilisation des ions  $Fe^{2+}$  à travers la membrane HDL. En effet, les valeurs correspondant de la résistance  $R_{CT}$  des différentes électrodes sont présentés dans le [Tableau 5.5](#), il est à noter les résistances de 202,4, 201,4 et 185,5 kohm, respectivement pour le carbone vitreux nu, carbone vitreux/ZnAl et carbone vitreux/MgAl. Comme s'est observé en voltammétrie cyclique ([Fig. 5.4A](#)) le matériau MgAl apparaît donc plus conducteur que ZnAl. Alors que les lignes quasiment droites dans la région des hautes fréquences (b) décrivent un comportement diffusionnel des ions  $Fe^{2+}$  à la surface de l'électrode nue ou modifié. D'autre part, les diagrammes de Nyquist des feutres de carbone nu et modifié se trouvent dans la [Figure 5.6B](#). L'allure des diagrammes obtenus est totalement différente de celle présentée par le carbone vitreux. On observe des boucles semi-circulaires et des lignes quasiment droites. Le feutre de carbone nue révèle une ligne quasi-droite dans la région de hautes fréquences (c) attribuée à la diffusion des ions  $Fe^{2+}$ . Le feutre de carbone modifié par MgAl est caractérisé par un grand demi-cercle déprimé entre la région des hautes fréquences (c) et la région des fréquences moyennes (b), suivie par une ligne droite dans la région de basses fréquences (a). Ce comportement s'explique par une augmentation progressive de la conductivité d'électrode au fur et à mesure de l'augmentation de la fréquence. Enfin, l'allure du spectre du feutre modifié par ZnAl, montre une ligne quasi-droite dans la région de hautes fréquences (c) suivie d'une légère courbure dans la région des fréquences moyennes (b), cela suggère une faible conductivité et confirme les résultats obtenus par voltammétrie ([Fig. 5.4B](#)). Les valeurs de la résistance de transfert de charge  $R_{CT}$  des électrodes correspondantes sont affichées dans le [Tableau 5.5](#), on note 161,0 k $\Omega$  pour le feutre nu, 33,13 k $\Omega$  et 73,77 k $\Omega$ , respectivement pour feutre avec MgAl HDL et feutre avec ZnAl HDL. Ces données stimulées des spectres d'EIS confirment le caractère non-bloquant des films HDL, et particulièrement la meilleure performance électrochimique de MgAl. En outre, une fois que les nanofeuillets HDL ont revêtus la surface du carbone, ils augmentent la surface spécifique et améliorent la capacité de transfert électronique CPE parce que les ions de l'électrolyte sont facilement accessibles à l'extérieur et l'intérieur des solides (Wang, 2003 ; Zhou et al., 2005 ; Aricò et al., 2005 ; Xie et al., 2012). En effet, MgAl HDL présente une surface spécifique plus élevée (59 m<sup>2</sup>/g) que ZnAl HDL (42 m<sup>2</sup>/g), ce qui explique le meilleur résultat obtenus avec MgAl HDL.



A la lumière des résultats ci-dessus avec les investigations VC et SIE, nous pouvons dire que le transport de charge se produit à travers la HDL via des sauts d'électrons entre les cations métalliques et les ions confinés à travers les pores et les canaux du matériau (Lovric et Scholz, 1997 ; Lovric et al., 1998 ; Schröder et al., 2000 ; Doménech-Carbó, 2010 ; Vialat et al., 2015). Afin de certifier les résultats précédents et d'expliquer l'effet entre les cations Mg et Zn, un intérêt spéciale est accordé à la modification possible des phases se produisant au cours de la réaction d'oxydation de  $\text{Fe}^{2+}$ , les films oxydés résultants ont été caractérisés par DRX. La Figure 5.7 montre les diffractogrammes X de ces films. On observe ainsi une modification significative avec la phase MgAl HDL. Tout d'abord, l'espacement basal de MgAl est considérablement augmenté comme c'est visible par l'augmentation des valeurs de distance inter-réticulaire des réflexions  $00l$  de l'ordre de 0,5 nm (orientation ionique des anions ferrocyanure) (Kikkawa et Koizumi, 1982). On remarque également un décalage vers le bas des angles  $2\theta$  qui est probablement lié au départ des anions chlorures dans l'espace interlamellaire des feuillets remplacés ensuite par les ions ferrocyanures de l'électrolyte comme déjà suggéré par Villemure et al. (2012). D'autre part, le diffractogramme X de film ZnAl après la réaction d'oxydation des ions  $\text{Fe}^{2+}$  est similaire à celui du film avant oxydation. Il n'y a donc aucun changement structural lors de l'oxydation électrochimique des atomes de fer ce qui indique qu'aucune intercalation des anions ferrocyanure n'a jamais obtenue, suggérant la diffusion de ces derniers seulement sur les sites externes de la structure minérale.

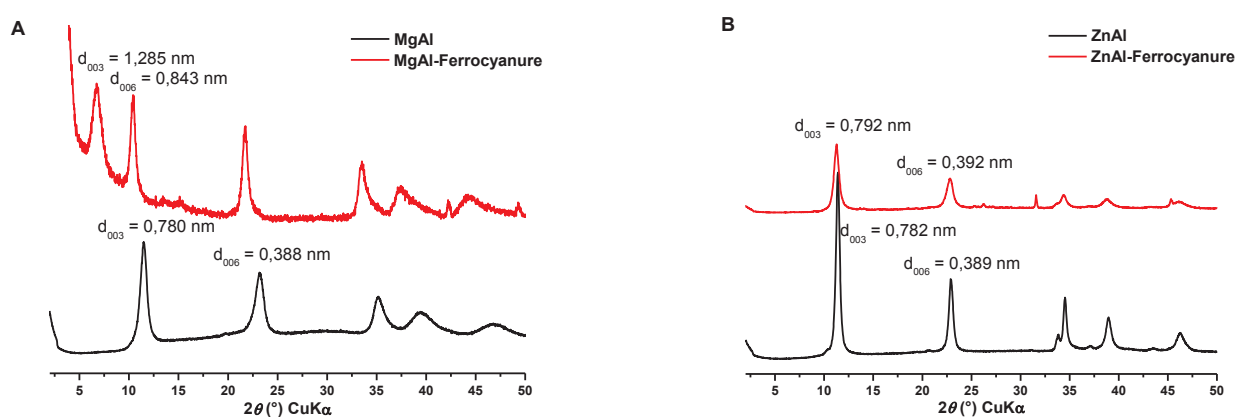
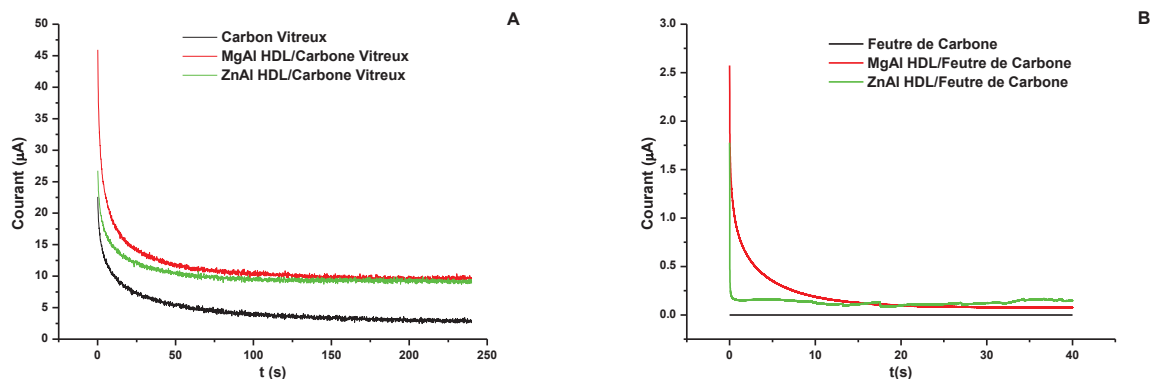


Fig. 5.7. Diffractogrammes des rayons X des films déposés (A) MgAl et (B) ZnAl.

### 5.3.4.3. Chronoampérométrie (CA)

Afin de bien cerner le comportement électrochimique des électrodes modifiées, nous avons choisi de mettre en œuvre la chronoampérométrie sur les électrodes de carbones,

carbone vitreux et feutre de carbone, revêtus par les matériaux MgAl et ZnAl HDL. La [Figure 5.8](#) reporte l'évolution de courant d'électrodes nues ou modifiées en fonction du temps de réaction électrochimique à la surface des électrodes pour un potentiel appliqué de 0,2 V.



**Fig. 5.8.** Evolution de courant  $i$  en fonction de temps d'oxydation électrochimique des ions  $\text{Fe}^{2+}$  à potentiel imposé de 0,2 V des électrodes de carbones nus et modifiés, (A) carbone vitreux et (B) feutre de carbone.

La [Figure 5.8A](#) présente le comportement du carbone vitreux nu et modifié alors que la [Figure 5.8B](#) montre le comportement du feutre de carbone nu et modifié. En absence du HDL le courant se stabilise autour de 3  $\mu\text{A}$  pour le carbone vitreux nu et on note que le courant est nul pour le feutre de carbone confirmant le caractère bloquant. En présence de HDL le courant diminue lentement jusqu'à se stabiliser autour de 10  $\mu\text{A}$  pour MgAl (et ZnAl)/carbone vitreux et autour de 0,08 et 0,14  $\mu\text{A}$  pour respectivement MgAl/feutre de carbone et ZnAl/feutre de carbone. Par ailleurs on constate que le courant chute plus lentement avec MgAl que celui avec ZnAl, ces résultats expérimentaux sont cohérentes avec ceux obtenus avec VC et SIE.

### 5.3.5. Application comme matériau d'anode dans un prototype de PCM

La mise au point de matériaux biocompatibles permettant de produire de l'énergie et de faire fonctionner des dispositifs inspiré du concept de l'électro-catalyse a poussé les chercheurs à utiliser des biofilms bactériennes pour mettre au point des biopiles microbienne PCM. Même si le potentiel de ce concept est immense, il y a certains verrous technologiques à lever : les matériaux d'électrodes et le passage du laboratoire à la réalité industrielle nécessite encore de travaux afin d'accroître les performances.

Les matériaux HDL sont des bons candidats potentiels grâce à leur morphologie plaquettaire permettant des interactions favorables à l'adsorption de la matière organique.

D'autre part, ils vont aussi jouer le rôle de relais d'électrons à la surface d'électrodes. La Figure 5.9 présente les courbes tension-courant  $U = f(i)$  et puissance-courant  $P = f(i)$ , caractéristiques statiques expérimentale d'une PCM, afin d'explorer l'efficacité des matériaux HDL sur des électrodes de feutre carbone en tant que matériaux d'anodes pour une PCM. Comme montré à la Figure 5.9, la variation du potentiel anodique et cathodique affecte clairement la tension de cellule de la PCM et la densité de puissance maximale générée par la PCM a été significativement améliorée par le traitement de l'anode avec les HDL. En effet, le potentiel d'activation était moins élevé pour MgAl/feutre de carbone, car la tension en circuit ouvert était de 0,571, 0,459 et 0,386 V, respectivement, pour ZnAl/feutre de carbone, MgAl/feutre de carbone et feutre de carbone nu. En outre, les densités de puissance les plus élevées ont été obtenues avec la PCM utilisant MgAl HDL ( $38,2 \text{ mW/cm}^2$ ), soit 42% plus élevée que celle obtenue avec le feutre de carbone nu ( $22,1 \text{ mW/cm}^2$ ). Cependant, notre catalyseur ZnAl HDL présente également de bonnes performances car les densités de puissance enregistrent un maximum de  $31,6 \text{ mW/cm}^2$ , 17% moins faible que celle obtenue avec le catalyseur de la MgAl HDL. Ces observations concordent bien avec les précédents résultats de l'étude électrochimique fondamentale, la performance électrochimique de ZnAl LDH étant supérieur que prévu du fait de l'augmentation de la surface de l'anode, qui offre plus de sites de surface pour la croissance bactérienne.

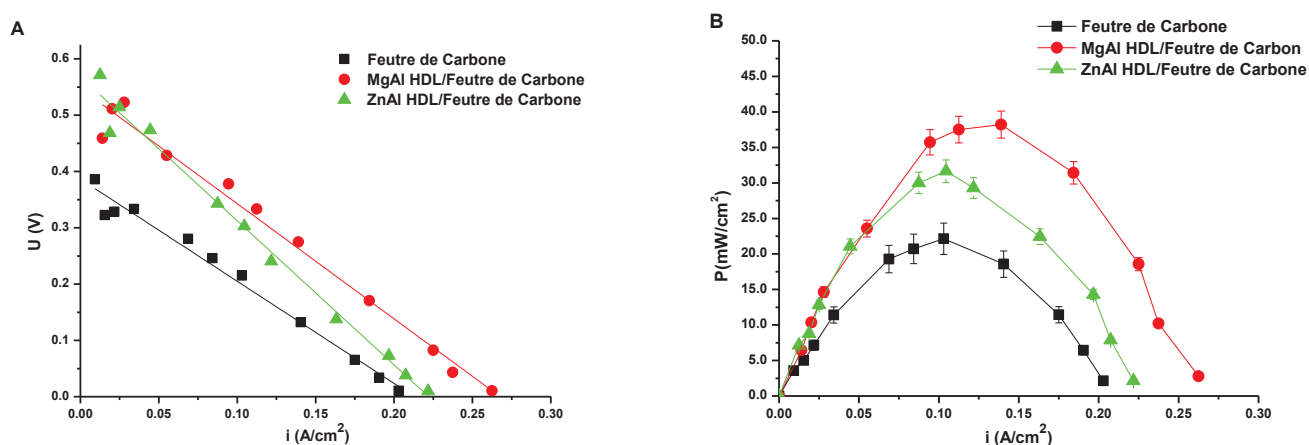


Fig. 5.9. Courbes de polarisation (tension-courant) (A) et puissance-courant (B) d'une PCM utilisé feutre de carbone nu et modifié en tant que matériau d'anode.

## 5.4. Conclusion

Ce chapitre a exploré la synthèse de deux différents hydroxydes doubles lamellaires : MgAl et ZnAl HDL par la méthode de co-précipitation à pH constant en essayant de comprendre plus finement leur composition, structure et morphologie qui contrôlent la réponse électrochimique, afin de déboucher sur de potentielles applications dans le domaine de l'énergie en tant que matériau d'électrodes pour une biopile microbienne. De nombreuses techniques d'analyse ont été utilisées afin de caractériser les matériaux obtenus que ce soit en termes de structure (XRD, IRTF), de microstructure (MEB et TEM) et de propriétés de surface (angle de contact, BET). Les analyses physico-chimiques réalisées montrent que le choix du cation métallique divalent influe sur la cristallinité du matériau donc sur la taille des particules ainsi que sur la surface spécifique. Parallèlement, nous avons décrit la réponse électrochimique des électrodes de carbone (carbone vitreux et feutre de carbone) modifiées par des couches minces des phases HDL MgAl et ZnAl, l'étude a clairement montré une nette augmentation du signal électrochimique, des comportements similaires pour le carbone vitreux avec une différence de conductivité entre les deux phases et des comportements très différents pour le feutre de carbone. Il apparaît que la phase HDL MgAl semble plus conductrice que la phase HDL ZnAl. Considérant les propriétés de transfert élevées des phases HDL étudiées, l'application de ces matériaux en tant que matériaux d'anodes dans une PCM a été envisagée. Nous avons ainsi pu augmenter la densité de puissance du PCM de 22,1 mW/cm<sup>2</sup> avec le feutre de carbone nu jusqu'à 31,6 mW/cm<sup>2</sup> (environ 30%) et 38,2 mW/cm<sup>2</sup> (environ 42%), respectivement avec le feutre de carbone modifié par l'HDL ZnAl et MgAl. Les performances entrevues suggèrent que le développement de ces matériaux pour parvenir à des applications réelles et optimisées est parfaitement envisageable.

### Remerciements

Je tiens à remercier Dr. **Martiane Cabié** du "Centre Pluridisciplinaire de Microscopie Electronique et de Microanalyse (CP2M), Aix Marseille Université, 13013 Marseille, France" pour les analyses microscopiques. Je remercie également Dr. **Soumya Elabed** du "Laboratoire de Biotechnologie Microbienne, Faculté des Sciences et Techniques, 2022 Fès-Saïs, Maroc" pour les mesures de l'angle de contact. Enfin je tiens à adresser une mention toute spéciale à **Aisha Gharsalli** du "LECOM School of Dental Medicine, FL 34211, USA", qui a gracieusement offert l'assistance linguistique nécessaire à la publication de ce travail.

En profitant de leur facilité de synthèse, de leur diversité structurale et de leur stabilité, des matrices minérales à base de HDL de type MgAl e ZnAl sont représentées dans ce travail de thèse dans différentes applications pratiques potentielles: en tant que vecteurs pour stabiliser les biomolécules ou les molécules biofonctionnelles, bien que précurseur de matériaux d'électrodes pour une biopile.

En première étude, les travaux ont porté sur le confinement de la lactate déshydrogénase, enzyme de la famille d'oxydoréductase sur les phases HDL MgAl et ZnAl. Deux procédés d'immobilisation ont été développés. L'échange anionique et/ou l'adsorption a mis en évidence des interactions électrostatiques et des interactions de type hydrogène. Le mécanisme d'échange ou d'adsorption propose un recouvrement des enzymes à la surface de la matrice minérale. Cependant la co-précipitation du matrice HDL dans une solution de la lactate déshydrogénase a permis d'immobiliser une importante quantité d'enzyme. En effet, au fur et à mesure que la quantité de la lactate déshydrogénase retenue est importante, l'empilement des plaquettes HDL devient désordonné et le matériau se disperse dans un réseau organique.

L'immobilisation de la lactate déshydrogénase sur les matrices minérales que se soit le procédé se manifeste à la surface des cristallites HDL. La taille trop volumineuse de l'enzyme empêche son intercalation.

L'étude de l'activité enzymatique de la lactate déshydrogénase diminue lors de son immobilisation. Cette perte est due soit à (i) un blocage des sites actifs engendré par la gêne stérique de l'HDL, (ii) l'accumulation de l'enzyme sur les phases HDL ou bien encore au (iii) changement de la conformation de l'enzyme limitant la diffusion du substrat vers le site actif de l'enzyme. En effet, les tests effectués sur les suspensions d'échange semblent plus approprié pour un usage fonctionnel de l'enzyme. Toutefois, tous ces résultats préliminaires ont révélés les potentialités de l'usage des HDL dans des analyses cliniques comme l'un des supports promoteurs pour immobiliser la lactate déshydrogénase en fournissant un microenvironnement biocompatible par le maintien de leur bioactivité.

La deuxième partie de ce travail a été dédié à l'étude de la mise au point des phases HDL de type MgAl et ZnAl pour la libération contrôlée de principe actif, la chlorure de berbérine de classe pharmaceutique. Le premier volet consiste à la synthèse des matériaux biohybrides HDL-BBR. Deux modes d'immobilisation ont été conçus : les synthèses par échange et/ou adsorption et les synthèses directes par co-précipitation de la matrice HDL en

présence de la biomolécule. Différents paramètres tels que la densité de charge des feuillets, la nature de l'anion interlamellaire intercalé, la morphologie de la matrice, et le rapport BBR/HDL ont été étudiés. Cependant, les phases co-précipitées ont permis l'immobilisation d'une quantité de BBR plus importante.

La caractérisation des matériaux a pris une grande part de cette étude, les techniques classiques utilisées (DRX, IR, UV-Vis, MEB, MET et angle de contact) nous ont permis de contrôler la structure et la composition des matériaux afin de nous renseigner sur le processus d'immobilisation. En fait, il a été montré que le mécanisme d'adsorption est similaire à celui obtenu avec la lactate déshydrogénase.

Le second volet de cette étude est destiné à l'évaluation de la cinétique de libération de la BBR à partir des matériaux biohybrides synthétisés bien qu'à tester les activités antibactériennes sur trois souches pathogènes; *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa* et *Bacillus subtilis*. Les tests réalisés montrent toutefois que la co-précipitation concentre mieux le principe actif (BBR) que la méthode d'échange et que les formulations biohybrides préparées préservent bien le caractère antibactérien de la berbérine. En effet, les avantages thérapeutiques des porteurs de médicaments à base de HDL place ces matériaux en tête de la liste de ses priorités et donne l'espoir d'utiliser ces matériaux dans la libération de haute efficacité in vivo.

Enfin, la dernière partie de cette étude, a révélé les propriétés électrochimiques des phases HDL étudiés : MgAl & ZnAl. Dans ce cadre, nous avons mis au point un prototype de pile à combustible microbienne PCM dont le design a été choisi pour optimiser les fonctionnements d'électrode, confinement réducteur à l'anode et contact de l'air à la cathode et l'activité bactérienne solution d'effluent de la station de traitement des eaux résiduaire de Bizerte. Nous avons ainsi testé les phases HDL MgAl et ZnAl comme précurseur d'anode (feutre de carbone) et suivi les caractéristiques (tension-courant, puissance) de notre biopile. On note que l'utilisation du composé anodique MgAl ou ZnAl/feutre de carbone permet d'atteindre des conditions optimales de fonctionnement, rapidement que pour la PCM utilisant du feutre seul. En augmentant la surface spécifique anodique nous avons pu augmenter la densité de puissance du PCM de 22,1 mW/cm<sup>2</sup> avec le feutre de carbone nu jusqu'à 31,6 mW/cm<sup>2</sup> (environ 30%) et 38,2 mW/cm<sup>2</sup> (environ 42%), respectivement avec le feutre de carbone modifié par l'HDL ZnAl et MgAl. Actuellement, avec les performances entrevues et les améliorations à venir sur les matériaux d'électrodes basés sur les HDL, nous pouvons raisonnablement viser des applications réelles et optimisées, pourraient avoir lieu dans les marchés commerciaux futurs, en particulier la filière de métrologie environnementale.



- Adesokan, A.A., Akanji, M.A., Yakubu, M.T., 2007. Antibacterial potentials of aqueous extract of *Enantiachlorantha* stem bark. *Afr. J. Biotechnol.* 22, 2502–2505.
- Aguilar-Vargas, V., Valente, J., Gonzalez, I., 2013. Electrochemical characterization of carbon paste electrodes modified with MgZnGa and ZnGaAl hydrotalcite-like compounds. *J. Solid State Electrochem.* 17, 3145–3152.
- Aisawa, S., Takahashi, S., Ogasawara, W., Umetsu, Y., Narita, E., 2001. Direct intercalation of amino acids into layered double hydroxides by coprecipitation. *J. Solid State Chem.* 162, 52–62.
- Alexis, F., Pridgen, E.M., Langer, R., Farokhzad, O.C., 2010. Nanoparticle technologies for cancer therapy. *Handb. Exp. Pharmacol.* 197, 55–86.
- Allen, T.M., Cullis, P.R., 2004. Drug delivery systems: entering the mainstream. *Science* 303, 1818–1822.
- Allmann, R., Lohse, H.H., 1966. *N. Jhb. Miner. Mh.* 6, 161.
- Allmann, R., 1968. The crystal structure of pyroaurite. *Acta Cryst. B* 24, 972–977.
- Ambrogio, V., Fardella, G., Grandolini, G., Perioli, L., 2001. Intercalation compounds of hydrotalcite-like anionic clays with antiinflammatory agents—I. Intercalation and in vitro release of ibuprofen. *Int. J. Pharm.* 220, 23–32.
- Artiss, J.D., Karcher, R.E., Cavanagh, K.T., Collins, S.L., Peterson, V.J., Varma, S., Zak, B., 2000. A Liquid-Stable Reagent for Lactic Acid Levels. Application to the Hitachi 911 and Beckman CX7. *Am. J. Clin. Pathol.* 114, 139–143.
- Arico, A.S., Bruce, P., Scrosati, B., Tarascon, J.M., Schalkwijk, W.V., 2005. Nanostructured materials for advanced energy conversion and storage devices. *Nat. Mater.* 4, 366–377.
- Aungst, B.J., 2000. Intestinal permeation enhancers. *J. Pharm. Sci.* 89, 429–442.
- Ay, A.N., Konuk, D., Zumreoglu-Karan, B., 2011. Magnetic nanocomposites with drug-intercalated layered double hydroxide shell supported on commercial magnetite and laboratory-made magnesium ferrite core materials. *Mater. Sci. Eng. C Mater.* 31, 851–857.
- Azeredo, J., Ramos, I., Rodrigues, I., Oliveira, R., Teixeira, J., 1997. Yeast flocculation: a new method for characterizing cell surface interactions. *J. Inst. Brew.* 103, 359–361.
- Ballarin, B., Gazzano, M., Hidalgo-Hidalgo de Cisneros, J.L., Tionelli, D., Seeber, R., 2002. Electrocatalytic activity of cobalt phthalocyanine stabilized by different matrixes. *Anal. Bioanal. Chem.* 374, 891–897.
- Ballarin, B., Gazzano, M., Seeber, R., Tonelli, D., Vaccari, A., 1998. Electrodes coated by hydrotalcite-like clays. Effect of the metals and the intercalated anions on ion accumulation and retention capability. *J. Electroanal. Chem.* 44, 27–37.
- Ballarin, B., Seeber, R., Tonelli, D., Vaccari, A., 1999. Electrocatalytic properties of Nickel(II) hydrotalcite-type anionic clays: application to methanol and ethanol oxidation. *J. Electroanal. Chem.* 463, 123–127.
- Bandyopadhyay, S., Patra, P.H., Mahanti, A., Mondal, D.K., Dandapat, P., Bandyopadhyay, S., Samanta, I., Lodh, C., Bera, A.K., Bhattacharyya, D., Sarkar, M., Baruah, K.K., 2013. Potential antibacterial activity of berberine against multi drug resistant enterovirulent *Escherichia coli* isolated from yaks (*Poephagus grunniens*) with haemorrhagic diarrhea. *Asi. Pac. J. Trop. Med.* 6, 315–319.
- Barahuie, F., Hussein, M.Z., Arulselvan, P., Fakurazi, S., Zainal, Z., 2014. Drug delivery system for an anticancer agent, chlorogenate-Zn/Al-layered double hydroxide nanohybrid synthesised using direct co-precipitation and ion exchange methods. *J. Solid State Chem.* 217, 31–41.
- Bard, A.J., Faulkner, L.R., 2000. *Voltammetry Retrospective*. New York John Wiley & Sons 2nd edn.
- Barsoukov, E., Macdonald, J.R., John Wiley & Sons Inc. 2005. *Impedance Spectroscopy: Theory, Experiment, and Applications*. Hoboken New Jersey.
- Barriga, C., Jones, W., Malet, P., Rives, V., Ulibarri, M.A., 1998. Synthesis and characterization of polyoxovanadate-pillared Zn–Al layered double hydroxides: an X-ray absorption and diffraction study. *Inorg. Chem.* 37, 1812–1820.



- Bellezza, F., Alberani, A., Posati, A., Tarpani, L., Latterini, L., Cipiciani, A., 2012. Protein interactions with nanosized hydrotalcites of different composition. *J. Inorg. Biochem.* 106, 134–142.
- Berber, M.R., Minagawa, K., Katoh, M., Mori, T., Tanaka, M., 2008. Nanocomposites of 2-arylpropionic acid drugs based on Mg–Al layered double hydroxide for dissolution enhancement. *Eur. J. Pharm. Sci.* 35, 354–360.
- Berber, M.R., Hafez, I.H., Minagawa, K., Mon, T., Tanaka, M., 2010. Nanocomposite formulation system of lipid-regulating drugs based on layered double hydroxide: synthesis, characterization and drug release properties. *Pharm. Res.* 27, 2394–2401.
- Bi, X., Hui, Z., Liguang, D., 2014. Layered double hydroxide-based nanocarriers for drug delivery. *Pharmaceutics* 6, 298–332.
- Bish, D.L., 1980. Anion-exchange in takovite: applications to other hydroxide minerals. *Bull. Mineral* 103, 170–175.
- Blandino, A., Macias, M., Cantero, D., 2001. Immobilization of glucose oxidase within calcium alginate gel capsules. *Process Biochem.* 36, 601–606.
- Boehn, H.P., Steinle, J., Vieweger, C., 1977. *Ingew. Chem. Int. Ed. Engl.* 16, 265.
- Braterman, P.S., Xu, Z.P., Yarberr, F., in: Auerbach, S.M., Carrado, K.A., Dutta, P.K. (Eds.), Marcel Dekker, Inc 2004. *Handbook of Layered Materials.* New York 373–474.
- Brindley, G.W., Kikawa, S., 1979. A crystal-chemical study of Mg, Al and Ni, N hydroxy-perchlorates and hydroxy-carbonates. *Am. Miner.* 64, 836.
- Brunauer, S., Emmett, P.H., Teller, E., 1938. Adsorption of gases in multimolecular layers. *J. Am. Chem. Soc.* 60, 309–319.
- Bulmu, V., Ayhan, H., Pipkin E., 1997. Modified PMMA monosize microbeads for glucose oxidase immobilization. *Chem. Eng. J.* 65, 71–76.
- Carpani, I., Berrettoni, M., Giorgetti, M., Tonelli, D., 2006. Intercalation of iron(III) hexacyano complex in a Ni,Al hydrotalcite-like compound. *J. Phys. Chem. B* 110, 7265–7269.
- Carrado, K.A., Kostapapas, A., 1988. Layered double hydroxides (LDHs). *Solid State Ionics* 26, 77–86.
- Carretero, M.I., 2002. Clay minerals and their beneficial effects upon human health. A review. *Appl. Clay Sci.* 21, 155–163.
- Cavani, F., Trifiro, F., Vaccari, A., 1991. Hydrotalcite-type anionic clays: Preparation, properties and applications. *Catal. Today* 11, 173–301
- Cernáková, M., Kostálová, D., 2002. Antimicrobial activity of berberine – a constituent of *Mahonia aquifolium*. *Folia Microbiol. (Praha)* 47, 375–378.
- Chakraborty, J., Roychowdhury, S., Sengupta, S., Gosh, S., 2013. Mg–Al layered double hydroxide–methotrexate nanohybrid drug delivery system: evaluation of efficacy. *Mater. Sci. Eng. C Mater.* 33, 2168–2174
- Chakraborty, M., Dasgupta, S., Soundrapandian, C., Chakraborty, J., Ghosh, S., Mitra, M.K., Basu, D., 2011. Methotrexate intercalated ZnAl-layered double hydroxide. *J. Solid State Chem.* 184, 2439–2445.
- Chaubey, A., Gerard, M., Singh, V.S., Malhotra, B.D., 2001. Immobilization of lactate dehydrogenase on tetraethylorthosilicate-derived sol-gel films for application to lactate biosensor. *Appl. Biochem. Biotechnol.* 96, 303–310.
- Chen, H., Mousty, C., Cosnier, S., Almeida, M.G., Moura, J.J.G., 2007. Highly sensitive nitrite biosensor based on the electrical wiring of nitrite reductase by [ZnCr-AQS] LDH. *Electrochem. Commun.* 9, 2240–2244.
- Chen, W., Miao, Y.Q., Fan, D.J., Yang, S.S., Lin, X., Meng, L.K., Tang, X., 2011. Bioavailability study of berberine and the enhancing effects of TPGS on intestinal absorption in rats. *AAPS Pharm. Sci. Technol.* 12, 705–711.
- Chitrakar, R., Tezuka, S., Sonoda, A., Sakane, K., Hirotsu, T., 2008. A new method for synthesis of Mg-Al, Mg-Fe, and Zn-Al layered double hydroxides and their uptake properties of bromide ion. *Ind. Eng. Chem. Res.* 47, 4905–4908.
- Choi, S.-J., Oh, J.-M., Choy, J.-H., 2008. Anticancer drug-layered hydroxide nanohybrids as potent cancer chemotherapy agents. *J. Phys. Chem. Solids* 69, 1528–1532.
- Choy, J.H., Kwak, S.Y., Park, J.S., Jeong, Y.J., Portier, J., 1999. Intercalative nanohybrids of nucleoside monophosphates and DNA in layered metal hydroxide. *J. Am. Chem. Soc.* 121, 1399–1400.
- Choy, J.H., Kwak, S.Y., Park, J.S., Jeong, Y.J., 2001. Cellular uptake behavior of [ $\gamma$ - $^{32}$ P] labeled ATP-LDH nanohybrids. *J. Mater. Chem* 11, 1671–1674.

- Choy, J.H., Jung, J.S., Oh, J.M., Park, M., Jeong, J.Y., Kang, Y.K., Han, O.J., 2004. Layered double hydroxide as an efficient drug reservoir for folate derivatives. *Biomaterials* 25, 3059–3064.
- Choy, J.H., Choi, S.J., Oh, J.M., Park, T., 2007. Clay minerals and layered double hydroxides for novel biological applications. *Appl. Clay Sci.* 36, 122–132.
- Clearfield, A., Kieke, M., Kwan, J., Colon, J.L., Wang, R.-C., 1991. Intercalation of dodecyl sulfate into layered double hydroxides. Journal of inclusion phenomena and molecular recognition in chemistry 11, 361–378.
- Colombari, M., Ballarin, B., Carpani, I., Guadagnini, L., Mignani, A., Scavetta, E., Tonelli, D., 2007. Glucose biosensors based on electrodes modified with ferrocene derivatives intercalated into Mg/Al layered double hydroxides. *Electroanalysis* 19, 2321–2337.
- Cosnier, S., Mousty, C., Cui, X., Yang, X., Dong, S., 2006. Specific determination of As (V) by an acid phosphatase-polyphenol oxidase biosensor. *Anal. Chem.* 78, 4985–4989.
- Costantino, U., Marmottini, F., Nocchetti, M., Vivani, R., 1998. New synthetic routes to hydrotalcite-like compounds characterisation and properties of the obtained materials. *Eur. J. Inorg. Chem.* 1439–1446.
- Crepaldi, E.L., Valim, J.B., 1998. Layered double hydroxides: structure, synthesis, properties and applications. *Quimica Nova* 21, 300–311.
- Cunha, V.R.R., Guilherme, V.A., de Paula, E., de Araujo, D.R., Silva, R.O., Medeiros, J.V. R., Leite, J.R.S.A., Petersen, P.A.D., Foldvari, M., Petrilli, H.M., Constantino, V.R.L., 2016. Delivery system for mefenamic acid based on the nanocarrier layered double hydroxide: physicochemical characterization and evaluation of antiinflammatory and antinociceptive potential. *Mater. Sci. Eng. C* 58, 629–638.
- D**arder, M., Aranda, P., Ruiz-Hitzky, E., 2007. Bionanocomposites: a new concept of ecological, bioinspired, and functional hybrid materials. *Adv. Mat.* 19, 1309–1319.
- Dash, S., Murthy, P.N., Nath, L., Chowdhury, P., 2010. Kinetic modeling on drug release from controlled drug delivery systems. *Acta Poloniae Pharm. Drug Res.* 67, 217–223
- De, M., Ghosh, P.S., Rotello, V.M., 2008. Applications of nanoparticles in biology. *Adv. Mater.* 20, 4225–4241.
- De Melo, J.V., Cosnier, V., Mousty, C., Martelet, C., Jaffrezic-Renault, N., 2002. Urea biosensors based on immobilization of urease into two oppositely charged clays (Laponite and Zn-Al layered double hydroxides). *Anal. Chem.* 74, 4037–4043.
- De Roy, A., Forano, C., El Malki, K., Besse, J.P., (1992). *Anionic Clays: Trends in Pillaring Chemistry in Occelli, M.L., Robson, H.E., Synthesis of Microporous Materials. 1. ed., New York, Van Nostrand Reinhold 2, cap.7, 108–169.*
- De Roy, A., Forano, C., Besse, J.P., (2001). *Layered Double Hydroxides: Synthesis and Post-Synthesis Modification in Rives, V., Layered Double Hydroxides: Present and Future (Ed.). Nova. Sci. Pub. Inc., New York 1–37.*
- Del Arco, M., Cebadera, E., Gutiérrez, S., Martín, C., Montero, M.J., Rives, V., Rocha, J., Sevilla, M.A., 2004. Mg, Al layered double hydroxides with intercalated indomethacin: synthesis, characterization, and pharmacological study. *J. Pharm. Sci.* 93, 1649–1658.
- Del Arco, M., Carriazo, D., Martín, C., Pérez-Gruezo, A.M., Rives, V., 2006. Characterization of chromate-intercalated layered double hydroxides. *Mat. Sci. Forum* 514–516, 1541–1545.
- Del Arco, M., Fernández, A., Martín, C., Rives, V., 2007. Intercalation of mefenamic and meclofenamic acid anions in hydrotalcite-like matrixes. *Appl. Clay Sci.* 36, 133–140.
- Del Hoyo, C., 2007. Layered double hydroxide and human health: an overview. *Appl. Clay Sci.* 36, 103–121.
- Depège, C., Forano, C., De Roy, A., Besse, J.P., 1994. [Cu-Cr] layered double hydroxides by  $\text{CrO}_4^{2-}$  and  $\text{Cr}_2\text{O}_7^{2-}$  oxometallates. *Mol. Cryst. Liq. Cryst.* 224, 161–166.
- Ding, S.-N., Shan, D., Xue, H.-G., Zhu, D.-B., Cosnier, S., 2009. Glucose oxidase immobilized in alginate/layered double hydroxides hybrid membrane and its biosensing application. *Anal. Sci.* 25, 1421–1425.
- Ding, S.N., Holzinger, M., Mousty, C., Cosnier, S., 2010. Laccase electrodes based on the combination of the single-walled carbon nanotubes and redox layered double hydroxides: towards the development of biocathode for biofuel cells. *J. Power Sources* 195, 4714–4717.
- Ding, S.-N., Shan, D., Zhang, T., Dou, Y.-Z., 2011. Performance-enhanced cholesterol biosensor based on biocomposite system: Layered double

- hydroxides-chitosan. *J. Electroanal. Chem.* 659, 1–5.
- Doménech-Carbo, A., 2010. *Electrochemistry of Porous Materials*. CRC, Boca Raton.
- Dong, L., Li, Y., Hou, W.G., Liu, S.J., 2010. Synthesis and release behavior of composites of camptothecin and layered double hydroxide. *J. Solid State Chem.* 183, 1811–1816.
- Doughari, J.H., Pukuma, M.S., De, N., 2007. Antibacterial effects of *Balanitesaegyptiaca* L. Drel. and *Moringaoleifera* Lam. on *Salmonella typhi*. *Afr. J. Biotechnol.* 19, 2212–2215.
- Duan, X.; Evans, D.G., 2006. *Layered Double Hydroxides Structure and Bonding*. Springer, Berlin, pp. 119.
- E**l Gaini, L., Lakraimi, M., Sebbar, E., Meghea, A., Bakasse, M.J., 2009. Removal of indigocarmine dye from water to Mg-Al-CO<sub>3</sub>-calcined layered double hydroxides. *Hazard. Mater* 161, 627–632.
- El Malki, K., De Roy, A., Besse, J.P., 1993. *Nanostruct. Mater.* 2, 167.
- Erable, B., Duteanu, N.M., Ghangrekar, M.M., Dumas, C., Scott, K., 2010. Application of electro-active biofilms. *Biofouling. Biofouling* 26, 57–71.
- Evans, D.G., Duan, X., 2006. Preparation of layered double hydroxides and their applications as additives in polymers, as precursors to magnetic materials and in biology and medicine. *Chem. Commun.* 42, 485–496.
- F**an, D., Wu, X., Dong, W., Sun, W., Li, J., Tang, X., 2013. Enhancement by sodium caprate and sodium deoxycholate of the gastrointestinal absorption of berberine chloride in rats. *Drug Dev. Ind. Pharm.* 39, 1447–1456.
- Faour, A., Mousty, C., Prevot, V., Devouard, B., De Roy, A., Bordet, P., Elkaim, E., Taviot-Gueho, C., 2012. Correlation among structure, microstructure, and electrochemical properties of NiAl-CO<sub>3</sub> layered double hydroxide thin films. *J. Phys. Chem. C* 16, 15646–15659.
- Feng, J.T., Ma, X., He, Y., Evans, D.G., Li, D.Q., 2012. Synthesis of hydrotalcite-supported shape-controlled Pd nanoparticles by a precipitation-reduction method. *Appl. Catal. A* 413–414, 10–20.
- Feng, Z., Yang, Z., Yang, B., Zhang, Z., Xie, X., 2014. The application of Co-Al-hydrotalcite as a novel additive of positive material for nickel-metal hybrid secondary cells. *J. Power Sources* 266, 22–28.
- Forano, C., Hibino, T., Leroux, F., Taviot-Gueho, C., Layered double hydroxides in *Handbook of Clay Science*, Bergaya, F., Theng, B.K.G., Lagaly, G. (Eds.), 2006. Development in Clay Science, chapter 13.1. Elsevier New York 1021–1095.
- Forano, C., Prevot, V., in: Ruiz-Hitzky, E., Ariga, K., Lvov, Y., (Eds.) 2008. *Bio-inorganic Hybrid Nanomaterials: Strategies, Syntheses, Characterization and Applications*, Wiley-VCH Weinheim, Germany, 443.
- Forano, C., Costantino, U., Prévot, V., Taviot Gueho, C., 2013 in Bergaya, F., Lagaly, G. (Eds.), *Handbook of Clay Science*, 2nd edition. Part A, vol. 5. Elsevier, Amsterdam 745–782.
- Fudala, A., Palinko, I., Kiricsi, I., 1999. Amino acids, precursors for cationic and anionic intercalation synthesis and characterization of amino acid pillared materials. *J. Mol. Struct.* 482–483, 33–37.
- G**ao, X., Chen, L., Xie, J., Yin, Y., Chang, T., Duan, Y., Jiang, N., 2014. In vitro controlled release of vitamin C from Ca/Al layered double hydroxide drug delivery system. *Mater. Sci. Eng. C* 39, 56–60.
- Geraud, E., Prevot, V., Forano, C., Mousty, C., 2008. Spongy gel-like layered double hydroxide-alkaline phosphatase nanohybrid as a biosensing material. *Chem. Commun.* 13, 1554–1556.
- Gereli, G., Seki, Y., Kusoglu, I.M., Yurdakoç, K., 2006. Equilibrium and kinetics for the sorption of promethazine hydrochloride onto K10 montmorillonite. *J. Coll. Interf. Sci.* 299, 155–162.
- Giles, C.H., MacEwan, T.H., Nakhwa, S.N., Smith, D., 1960. Studies in adsorption. *J. Chem. Soc.* 3973–3993.
- Goh, K., Lim, T., Dong, Z., 2008. Applications of layered double hydroxides for removal of oxyanions: a review. *Water Res.* 42, 1343–1368.
- Gordijo, C.R., Barbose, C.A.S., Da Costa Ferreira, A.M., Constantino, V.R.L., De Oliveira Silva, D., 2005. Immobilization of ibuprofen and copper-ibuprofen drugs on layered double hydroxides. *J. Pharm. Sci.* 94, 1135–1148.
- Gu, Z., Thomas, A.C., Xu, Z.P., Campbell, J.H., Lu, G.Q., 2008. In vitro sustained release of LMWH from MgAl-layered double hydroxide nanohybrids. *Chem. Mater.* 20, 3715–3722.
- Guo, X., Zhang, F., Evans, D.D., Duan X., 2010. Layered double hydroxide films: synthesis, properties and applications. *Chem. Commun.* 46, 5197–5210.

- H**alliwell, C.M., Simon, E., Toh, C.-S., Bartlett, P.N., Cass, A.E.G., 2002. Immobilisation of lactate dehydrogenase on poly (aniline)-poly (acrylate) and poly (aniline)-poly (vinyl sulphate) films for use in a lactate biosensor. *Anal. Chim. Acta* 453, 191–200.
- Han, J., Xu, X., Rao, X., Wei, M., Evans, D.G., Duan, X., 2011. Layer-by-layer assembly of layered double hydroxide/cobalt phthalocyanine ultrathin film and its application for sensors. *J. Mater. Chem.* 21, 2126–2130.
- Heatley, N.G., 1944. A method for the assay of penicillin. *Biochem. J.* 38, 61–65.
- He, J., Wei, M., Li, B., Kang, Y., Evans, D.G., Duan, X., 2006 in Duan, X., Evans, D.G. (Eds.), *Layered Double Hydroxides*. Springer, Berlin 89–119.
- He, L., Toh, C.-S., 2006. Recent advances in analytical chemistry—A material approach. *Anal. Chim. Acta* 556, 1–15.
- Houri, B., Legrouri, A., Barroug, A., Forano, C., Besse, J.P., 1998. Use of the ion-exchange properties of layered double hydroxides for water purification. *Czech. Chem. Commun.* 63, 732–740.
- I**nacio, J., Taviot-Gueho, C., Forano, C., Besse, J.P., 2001. Adsorption of MCPA pesticide by MgAl-layered double hydroxides. *Appl. Clay Sci.* 18, 255–264.
- Indira, L., Dixit, M., Kamath, P.V., 1994. Electrosynthesis of layered double hydroxides of nickel with trivalent cations. *J. Power Source* 52, 93–97.
- J**iang, D., Huang, Q., Cai, P., Rong, X., Chen, W., 2007. Adsorption of *Pseudomonas putida* on clay minerals and iron oxide. *Coll. Surf. B Biointerfaces* 54, 217–221.
- Jiang, J., Zhu, J., Ding, R., Li, Y., Wu, F., Liu, J., Huang, X., 2011. Co-Fe layered double hydroxide nanowall array grown from an alloy substrate and its calcined product as a composite anode for lithium-ion batteries. *J. Mater. Chem.* 21, 15969–15974.
- Jin, W., Brennan, J.D., 2002. Properties and applications of proteins encapsulated within sol-gel derived materials. *Anal. Chim. Acta* 461, 1–36.
- Jin, L., Liu, Q., Sun, Z.Y., Ni, X.Y., Wei, M., 2010. Preparation of 5-fluorouracil/ $\beta$ -cyclodextrin complex intercalated in layered double hydroxide and the controlled drug release properties. *Ind. Eng. Chem. Res.* 49, 11176–11181.
- K**amath, P.V., Dixit, M., Indira, L., Shukla, A.K., Kumar, V.G., Munichandraiah, N., 1994. Stabilized  $\alpha$ -Ni(OH)<sub>2</sub> as Electrode Material for Alkaline Secondary Cells. *J. Electrochem. Soc.* 141, 2956–2959.
- Kameshima, Y., Sasaki, H., Isobe, T., Nakajima, A., Okada, K., 2009. Synthesis of composites of sodium oleate/Mg-Al-ascorbic acid-layered double hydroxides for drug delivery applications. *Int. J. Pharm.* 381, 34–39.
- Kanezaki, E., (2004) in Wypych, F., Satyanarayana, K.G. (Eds.), *Clay Surfaces: Fundamentals and Applications*. Elsevier, Amsterdam 345–373.
- Khalfaoui, M., Knani, S., Hachicha, M.A., Lamine, A.B., 2003. New theoretical expressions for the five adsorption type isotherms classified by BET based on statistical physics treatment. *J. Colloid Interface Sci.* 263, 350–356.
- Khan, A.I., Lei, L.X., Norquist, A.J., O'Hare, D., 2001. Intercalation and controlled release of pharmaceutically active compounds from a layered double hydroxide. *Chem. Commun.* 22, 2342–2343.
- Khan, A.I., O'Hare, D., 2002. Intercalation chemistry of layered double hydroxides: recent developments and applications. *J. Mater. Chem.* 12, 3191–3198.
- Kikkawa, M., Koizumi, M., 1982. Ferrocyanide anion bearing Mg, Al hydroxide. *Mater. Res. Bull.* 17, 191–198.
- Kim, S.S., Zhang, W.Z., Pinnavaia, T.J., 1998. Ultrastable mesostructured silica vesicles. *Science* 282, 1302–1305.
- Kim, T.K., Son, Y.A., 2005. Effect of reactive anionic agent on dyeing of cellulosic fibers with a berberine colorant-part 2: anionic agent treatment and antimicrobial activity of a berberine dyeing. *Dyes Pigm.* 64, 85–89.
- Kim, M.H., Park, D.H., Yang, J.H., Choy, Y.B., Choy, J.H., 2013. Drug-inorganic-polymer nanohybrid for transdermal delivery. *Int. J. Pharm.* 444, 120–127.
- Kooli, F., Kosuge, K., Hibino, T., Tsunashima, A., 1993. Synthesis and properties of Mg-Zn-Al-SO<sub>4</sub> hydrotalcite-like compounds. *J. Mater. Sci.* 28, 2769–2773.
- Kuma, K., Paplawsky, W., Gedulin, B., Arrhenius, G., 1989. Mixed-valence hydroxides as bioorganic host minerals. *Origins Life Evol. Biosphere* 19, 573–601.
- Kuthati, Y., Kankala, R.K., Lee, C.H., 2015. Layered double hydroxide nanoparticles for biomedical applications: current status and



- recent prospects. *Appl. Clay Sci.* 112–113, 100–116.
- Labuda, J., Hudakova, M., 1997. Hexacyanoferrate anion-exchanger modified carbon paste electrodes. *Electroanalysis* 9, 239–242.
- Le Floch, F., Thuair, A., Bidan, G., Simonato, J.P., 2009. The electrochemical signature of functionalized single-walled carbon nanotubes bearing electroactive groups
- Leroux, F., Besse, J.P., 2004. Édifices lamellaires inorganiques/polymère : une valeur ajoutée mutuelle: le cas des hydroxydes doubles lamellaires. *Actua. Chem.* 274, 23–27.
- Leroux, F., Taviot-Gueho, C., 2005. Fine tuning between organic and inorganic host structure: new trends in layered double hydroxide hybrid assemblies. *J. Mater. Chem.* 15, 3628–3642.
- Li, Z.F., Kang, E.T., Neoh, K.G., Tan, K.L., 1998. Covalent immobilization of glucose oxidase on the surface of polyaniline films graft copolymerized with acrylic acid. *Biomaterials* 19, 45–53.
- Li, C.-I., Lin, Y.-H., Shih, C.-L., Tsaur, J.-P., Chau, L.-K., 2002. Sol-gel encapsulation of lactate dehydrogenase for optical sensing of L-lactate. *Biosens. Bioelectron.* 17, 323–330.
- Li, B.X., He, J., Evans, D.G., Duan, X., 2004a. Inorganic layered double hydroxides as a drug delivery system—intercalation and in vitro release of fenbufen. *Appl. Clay Sci.* 27, 199–207.
- Li, B.X., He, J., Evans, D.G., Duan, X., 2004b. Enteric-coated layered double hydroxides as a controlled release drug delivery system. *Int. J. Pharm.* 287, 89–95.
- Li, F., Duan, X., 2006. Applications of layered double hydroxides. *Struct Bond* 119, 193–223.
- Li, X.D., Yang, W.S., Li, F., Evans, D.G., Duan, X., 2006. Stoichiometric synthesis of pure NiFe<sub>2</sub>O<sub>4</sub> spinel from layered double hydroxide precursors for use as the anode material in lithium-ion batteries. *J. Phys. Chem. Solids* 67, 1286–1290.
- Li, N., Xu, L., 2010. Thermal analysis of  $\beta$ -cyclodextrin/berberine chloride inclusion compounds. *Thermochim. Acta* 499, 166–170.
- Li, B., Wu, P., Ruan, B., Liu, P., Zhu, N., 2014. Study on the adsorption of DNA on the layered double hydroxides (LDHs). *Spectrochim. Acta Part A: Mol. Biomol. Spectrosc.* 121, 387–393.
- Lin, Y., Wang, J., Evans, D.G., Li, D., 2006. Layered and intercalated hydrotalcite-like materials as thermal stabilizers in PVC resin. *J. Phys. Chem. of Solids* 67, 998–1001.
- Lin, Y., Singh, A., Ebenso, E.E., Quraishi, M.A., Zhou, Y., Huang, Y., 2015. Use of HPHT autoclave to determine corrosion inhibition by berberine extract on carbon steels in 3.5% NaCl solution saturated with CO<sub>2</sub>. *Int. J. Electrochem. Sci.* 10, 194–208.
- Logan, B.E., Hamelers, B., Rozendal, R.A., Schröder, U., Keller, J., Freguia, S., Aelterman, P., Verstraete, W., Rabaey, K., 2006. Microbial fuel cell: methodology and technology. *Environ. Sci. Technol.* 40, 5181–5192.
- Lovric, M., Scholz, F., 1997. A model for the propagation of a redox reaction through microcrystals. *J. Solid State Electrochem.* 1, 108–113.
- Lovric, M., Hermes, M., Scholz, F., 1998. The effect of electrolyte concentration in the solution on the voltammetric response of insertion electrode. *J. Solid State Electrochem.* 2, 401–404.
- Liu, J., Li, Y., Huang, X., Li, G., Li, Z., 2008. Layered Double Hydroxide Nano- and Microstructures Grown Directly on Metal Substrates and Their Calcined Products for Application as Li-Ion Battery Electrodes. *Adv. Funct. Mater.* 18, 1448–1458.
- Liu, Y., Harnisch, F., Fricke, K., Schröder, U., Climent, V., Feliu, J.M., 2010. The study of electrochemically active microbial biofilms on different carbon-based materials in microbial fuel cells. *Biosens. Bioelectron.* 25, 2167–2171.
- Liu, Q., Jiang, H., Liu, Z., Wang, Y., Zhao, M., Hao, C., Feng, S., Guo, H., Xu, B., Yang, Q., Gong, Y., Shao, C., 2011. Berberine radiosensitizes human esophageal cancer cells by downregulating homologous recombination repair protein RAD51. *PLoS One* 6, 1–12.
- Liu, F.G., Zhao, L.Z., An, N., Tong, D.S., Yu, W.H., Zhou, C.H., 2015. Modification of inorganic porous materials as gene vectors: an overview. *J. Porous Mater.* 22, 927–937.
- Liu, C.S., Zheng, Y.-R., Zhang, Y.-F., Long, X.-Y., 2016. Research progress on berberine with a special focus on its oral bioavailability. *Fitoterapia* 109, 274–282.
- Maeng, H.J., Yoo, H.J., Kim, I.W., Song, I.S., Chung, S.G., Shim, C.K., 2002. P-glycoprotein-mediated transport of berberine across Caco-2 cell monolayers. *J. Pharm. Sci.* 91, 2614–2621.
- Malak-Polaczyk, A., Vix-Guterl, C., Frackowiak, E., 2014. Carbon/Layered Double Hydroxide

- (LDH) Composites for supercapacitor application. *Energy & Fuels* 24, 3346–3351.
- Mannasse, E., 1915. Rocce eritree e di aden della collezine issel. *Atti. Soc. Toscana Sc. Nat., Proc. Verb.* 24, 92.
- Mansouri, H., Forano, C., Prevot, V., Jaffrezic-Renault, N., Ben Haj Amara, A., 2009. Layered double hydroxides/trypsin based conductometric biosensors. *Sens. Lett.* 7, 888–895.
- Meng, N., Zhou, N.-L., Zhang, S.-Q., Shen, J., 2009. Controlled release and antibacterial activity chlorhexidine acetate (CA) intercalated in montmorillonite. *Int. J. Pharm.* 382, 45–49.
- Meng, Z., Li, X., Lv, F., Zhang, Q., Chu, P.K., Zhang, Y., 2015. Structure molecular simulation, and release of aspirin from intercalated Zn–Al-layered double hydroxides. *Coll. Surf. B Biointerfaces* 135, 339–345.
- Min, B., Logan, B.E., 2004. Continuous electricity generation from domestic wastewater and organic substrates in a flat plate microbial fuel cell. *Environ. Sci. Technol.* 38, 5809–5814.
- Miyata, S., Kumura, T., 1973. Synthesis of new hydrotalcite-like compounds and their physico-chemical properties. *Chem. Lett.* 843–848.
- Miyata, S., 1975. The syntheses of hydrotalcite-like compounds and their structures and physico-chemical properties I: The systems  $Mg^{2+}$ - $Al^{3+}$ - $NO_3^-$ ,  $Mg^{2+}$ - $Al^{3+}$ - $Cl^-$ ,  $Mg^{2+}$ - $Al^{3+}$ - $ClO_4^-$ ,  $Ni^{2+}$ - $Al^{3+}$ - $Cl^-$  and  $Zn^{2+}$ - $Al^{3+}$ - $Cl^-$ . *Clays Clay Miner.* 23, 369–375.
- Miyata, S., 1977. Industrial use of hydrotalcite-like compounds. *Kagaku Gijyutsushi Mol.* 15, 32–37.
- Miyata, S., 1983. Anion-exchange properties of hydrotalcite-like compounds. *Clays Clay Miner.* 31, 305–311.
- Mohanambe, L., Vasudevan, S., 2005. Anionic clays containing anti-inflammatory drug molecules: Comparison of molecular dynamics simulation and measurements. *J. Phys. Chem. B* 109, 15651–15658.
- Mondal, D., Villemure, G., 2012. Improved reversibility of color changes in electrochromic Ni–Al LDH layered double hydroxide films in presence of electroactive anions. *J. Electroanal. Chem.* 687, 85–63.
- Morpurgo, S., Jacono, M.L., Porta, P., 1994. Pillared hydroxycarbonates and mixed oxides. Part I. Copper–zinc–cobalt–aluminium system. *J. Mater. Chem.* 4, 197.
- Mousty, C., Therias, S., Forano, C., Besse, J.P., 1994. Anion-exchanging clay-modified electrodes: synthetic layered double hydroxides intercalated with electroactive organic anions. *J. Electroanal. Chem.* 374, 63–69.
- Mousty, C., 2004. Sensors and biosensors based on clay-modified electrodes—new trends. *Appl. Clay Sci.* 27, 159–177.
- Mousty, C., Vieille, L., Cosnier, S., 2007. Laccase immobilization in redox active layered double hydroxides: a reagentless amperometric biosensor. *Biosens. Bioelectron.* 22, 1733–1738.
- Mousty, C., Kaftan, O., Prevot, V., Forano, C., 2008. Alkaline phosphatase biosensors based on layered double hydroxides matrices: Role of LDH composition. *Sens. Actuators B* 133, 442–448.
- Mousty, C., Forano, C., Fleutot, S., Dupin, J.C., 2009. Electrochemical study of anionic ferrocene derivatives intercalated in layered double hydroxides: application to glucose amperometric biosensors. *Electroanalysis* 21, 399–408.
- Mousty, C., 2010. Biosensing applications of clay-modified electrodes: a review. *Anal. Bioanal. Chem.* 396, 315–325.
- Mousty, C., Leroux, F., 2012. LDHs as electrode materials for electrochemical detection and energy storage: supercapacitor, battery and (bio)-sensor. *Recent Pat. Nanotechnol.* 6, 174–192.
- Mousty, C., Prévot, V., 2013. Hybrid and biohybrid layered double hydroxides for electrochemical analysis. *Anal. Bioanal. Chem.*, 405, 3513–3523.
- Mousty, C., Walcarius, A., 2015. Electrochemically-assisted deposition by local pH tuning: a versatile tool to generate ordered mesoporous silica thin films and layered double hydroxide materials. *J. Solid State Electrochem.* 19, 1905–1961.
- Narashimhan, B., Mallapragada, S.K., Peppas, N.A., 1999. Release kinetics, data interpretation. In: Mathiowitz, E.E. (Ed.), *Encyclopedia of Controlled Drug Delivery*. John Wiley and Sons, Inc, New York.
- Nejati, K., Asadpour-Zeynali, K., 2014. Electrochemical synthesis of nickel-iron layered double hydroxide: application as a novel modified electrode in electrocatalytic reduction of metronidazole. *Mater. Sci. Eng. C* 35, 179–184.
- Obayashi, C., Ishizaka, M., Konishi, T., Yamada, H., Katakura, K., 2012. Preparation of the electrochemically precipitated Mn–Al LDHs

- and their electrochemical behaviors. *Electrochemistry* 11, 879–882.
- Oh, M.-J., Biswick, T.T., Choy, J.-H., 2009. Layered nanomaterials for green materials. *J. Mater. Chem.* 19, 2553–2563.
- Ogawa, M., Kuroda, K., 1995. Photofunctions of intercalation compounds. *Chem. Rev.* 95, 399–438.
- Olfs, H.W., Torres-Dorante, L.O., Eckelt, R., Kosslick, H., 2009. Comparison of different synthesis routes for Mg–Al layered double hydroxides (LDH): characterization of the structural phases and anion exchange properties. *Appl. Clay Sci.* 43, 459–464.
- OpenStax College, 2013. Structure of Prokaryotes. retrieved from <http://cnx.org/content/m44605/1.9/>.
- P**an, G.Y., Wang, G.J., Sun, J.G., Huang, Z.J., Zhao, X.C., Gu, Y., Liu, X.D., 2003. Inhibitory action of berberine on glucose absorption. *Yao XueXueBao* 38, 911–914.
- Pan, D.K., Zhang, H., Zhang, T., Duan, X., 2010. A novel organic–inorganic microhybrids containing anticancer agent doxifluridine and layered double hydroxides: structure and controlled release properties. *Chem. Eng. Sci.* 65, 3762–3771.
- Panda, H.S., Srivastava, R., Bahadur, D., 2009. In-vitro release kinetics and stability of anticardiovascular drugs-intercalated layered double hydroxide nanohybrids. *J. Phys. Chem. B* 113, 15090–15100.
- Parker, L.M., Milestone, N.B., Newman, R.H., 1995. The use of hydrotalcite as an anion absorbent. *Ind. Eng. Chem. Res.* 34, 1196–1202.
- Park, D.H., Choi, G., Choy, J.H., 2015. Bio-layered double hydroxides nanohybrids for theranostics applications. *Photofunct. Layered Mater.* 166, 137–175.
- Patel, N.G., Erlenkotter, A., Cammann, K., Chemnitz, G.-C., 2000. Fabrication and characterization of disposable type lactate oxidase sensors for dairy products and clinical analysis. *Sens. Actuators B* 67, 134–141.
- Pereira, A.C., Aguiar, M.R., Kisner, A., Macedoa, D.V., Kubota, L.T., 2007. Amperometric biosensor for lactate based on lactate dehydrogenase and Meldola Blue coimmobilized on multi-wall carbon-nanotube. *Sens. Actuators B* 124, 269–276.
- Perioli, L., Ambrogi, V., Nauta, L., Nocchetti, M., Rossi, C., 2011. Effects of hydrotalcite-like nanostructured compounds on biopharmaceutical properties and release of BCS class II drugs: The case of flurbiprofen. *Appl. Clay Sci.* 51, 407–413.
- Perez-Ramírez, J., Mul, G., Kapteijn, F., Moulijn, J.A., 2001. In situ investigation of the thermal decomposition of Co–Al hydrotalcite in different atmospheres. *J. Mater. Chem.* 11, 821–830.
- Playle, A.C., Gunning, S.R., Llewellyn, A.F., 1974. The in vitro antacid and anti-pepsin activity of hydrotalcite. *Pharmaceutica Acta Helvetiae* 49, 298–302.
- Preeti, S., Prabhat, U., Shardendu, M., Ananya, S., Suresh, P., 2015. Berberine a potent substance for researcher: a review. *World J. Pharm. Pharm. Sci.* 4, 547–573.
- Q**iu, J., Villemure, G., 1997. Anionic clay modified electrodes: electron transfer mediated by electroactive nickel cobalt or manganese sites in layered double hydroxide films. *J. Electroanal. Chem.* 428, 165–172.
- Qtaitat, M., 2004. Study of the interaction of trimethoprim–montmorillonite by infrared spectroscopy. *Spectrochim. Acta Part A* 60, 673–678.
- R**adoslovich, E.W., 1963. The cell dimensions and symmetry of layer lattice silicates. IV. Interatomic forces. *Am. Miner.* 48, 76–99.
- Ralla, K., Sohling, U., Suck, K., Sander, F., Kasper, C., Ruf, F., Scheper, T., 2011. Adsorption and separation of proteins by a synthetic hydrotalcite. *Colloids Surf. B Biointerfaces* 87, 217–225.
- Randles, J., 1947. *Discuss Faraday Soc.* 1, 11.
- Rouessac, F., Rouessac, A., 1998. *Cours et Exercices Résolus Dunod, Paris.*
- Reichle, W.T., 1986. Synthesis of anionic clay minerals (mixed metal hydroxides, hydrotalcite). *Solid State Ionics* 22, 135–141.
- Riaz, U., Ashraf, S.M., 2013. Double layered hydroxides as potential anti-cancer drug delivery agents. *Mini Rev. Med. Chem.* 13, 522–529.
- Rives, V., Angeles Ulibarri, M., 1999. Layered double hydroxides (LDH) intercalated with metal coordination compounds and oxometalates. *Coord. Chem. Reviews* 181, 61–120.
- Rives, V., 2001. *Layered Double Hydroxides: Present and Future.* Nova Science Publishers, Inc, New York.
- Rives, V., Del Arco, M., Martín C., 2013. Layered double hydroxides as drug carriers and for



- controlled release of non-steroidal antiinflammatory drugs (NSAIDs): a review. *J. Control. Release* 169, 28–39.
- Rives, V., Del Arco, M., Martín C., 2014. Intercalation of drugs in layered double hydroxides and their controlled release: A review. *Appl. Clay Sci.* 88–89, 239–269.
- Robertson, R.H.S., 1996. Cadavers, chlorerases and clays. *Br. Miner. Soc. Bull.* 113, 3–7.
- Rojas, R., Linck, Y.G., Cuffini, S.L., Monti, G.A., Giacomelli, C.E., 2015. Structural and physicochemical aspects of drug release from layered double hydroxides and layered hydroxide salts. *Appl. Clay Sci.* 109–110, 119–126.
- Rong, X., Huang, Q., He, X., Chen, H., Cai, P., Liang, W., 2008. Interaction of *Pseudomonas putida* with kaolinite and montmorillonite: a combination study by equilibrium adsorption ITC, SEM, and FTIR. *Coll. Surf. B Biointerfaces* 64, 49–55.
- Rozendal, R.A., Hamelers, H.V.M., Rabaey, K., Keller, J., Buisman, C.J.N., 2008. Towards practical implementation of bioelectrochemical wastewater treatment. *Trends Biotechnol.* 26, 450–459.
- Rytwo, G., Mendelovits, A., Eliyahu, D., Pitcovski, J., Aizenshtein, E., 2010. Adsorption of two vaccine-related proteins to montmorillonite and organomontmorillonite. *Appl. Clay Sci.* 50, 569–575.
- S**ahoo, P.K., Panda, H.S., Bahadur, D., 2013. Studies on the stability and kinetics of drug release of dexamethasone phosphate intercalated layered double hydroxides nanohybrids. *Mater. Chem. Phys.* 142, 106–112.
- Saengdee, P., Chaisriratanakul, W., Bunjongpru, W., Sripumkhai, W., Srisuwan, A., Jeamsaksiri, W., Hruanun, C., Poyai, A., Promptmas, C., 2015. Surface modification of silicon dioxide, siliconnitride and titaniumoxynitride for lactate dehydrogenase immobilization. *Biosens. Bioelectron.* 67, 134–138.
- San Román, M.S., Holgado, M.J., Salinas, B., Rives, V., 2012. Characterisation of Diclofenac, Ketoprofen or Chloramphenicol Succinate encapsulated in layered double hydroxides with the hydrotalcite-type structure. *Appl. Clay Sci.* 55, 158–163.
- San Román, M.S., Holgado, M.J., Salinas, B., Rives, V., 2013. Drug release from layered double hydroxides and from their polylactic acid (PLA) nanocomposites. *Appl. Clay Sci.* 71, 1–7.
- Sanchez-Paniagua Lopez, M., Charmantray, F., Helaine, V., Hecquet, L., Mousty, C., 2010. Electrochemical detection of transketolase activity using a tyrosinase biosensor. *Biosens. Bioelectron.* 26, 139–143.
- Sass, C., Briand, M., Benslimane, S., Renaud, M., Briand, Y., 1989. Characterization of rabbit lactate dehydrogenase-M and lactate dehydrogenase-H cDNAs. Control of lactate dehydrogenase expression in rabbit muscle. *Biol. Chem.* 264, 4076–4081.
- Sarkar, A.K., Appidi, S., Ranganath, A.S., 2011. Evaluation of berberine chloride as a new antibacterial agent against gram-positive bacteria for medical textiles. *Fibres Text. East. Eur.* 19, 131–134.
- Scavetta, E., Berrettoni, M., Giorgetti, M., Tonelli, D., 2002. Electrochemical characterisation of Ni/Al-X hydrotalcites and their electrocatalytic behaviour. *Electrochemi. Acta* 47, 2451–2461.
- Scavetta, E., Tonelli, D., Giorgetti, M., Nobili, F., Marassi, R., Berrettoni, M., 2003. AC impedance study of a synthetic hydrotalcite-like compound modified electrode in aqueous solution. *Electrochim. Acta* 48, 1347–1355.
- Scavetta, E., Berrettoni, M., Nobili, F., Tonelli, D., 2005. Electrochemical characterization of electrodes modified with a Co/Al hydrotalcite-like compound. *Electrochim. Acta* 50, 3305–3311.
- Scavetta, E., Ballarini, B., Berrettoni, M., Carpani, I., Giorgetti, M., Tonelli, D., 2006. Electrochemical sensors based on electrodes modified with synthetic hydrotalcites. *Electrochim. Acta* 51, 2129–2134.
- Scavetta, E., Mignani, A., Prandstraller, D., Tonelli, D., 2007. Electrosynthesis of thin films of Ni, Al hydrotalcite like compounds. *Chem. of Mater.* 19, 4523–4529.
- Schröder, U., Oldham, K.B., Myland, J.C., Mahon, P.J., Scholz, F., 2000. Modeling of solid-state voltammetry of immobilized microcrystals assuming an initiation of the electrochemical reaction at a three-phase junction. *J. Solid State Electrochem.* 4, 314–324.
- Senapati, S., Thakur, R., Verma, S.P., Duggal, S., Mishra, D.P., Das, P., Shripathi, T., Kumar, M., Rana, D., Maiti, P., 2016. Layered double hydroxide as effective carrier for anticancer drugs and tailoring of release rate through interlayer anions. *J. Control. Release* 224, 186–198.
- Shan, D., Cosnier, S., Mousty, C., 2003a. HRP wiring by redox active layered double

- hydroxides: application to the mediated H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> detection. *Anal. Lett.* 36, 909–922.
- Shan, D., Cosnier, S., Mousty, C., 2003b. Layered double hydroxides: an attractive material for electrochemical biosensor design. *Anal. Chem.* 75, 3872–3879.
- Shan, D., Mousty, C., Cosnier, S., 2004a. Subnanomolar cyanide detection at polyphenol oxidase/clay biosensors. *Anal. Chem.* 76, 178–183.
- Shan, D., Cosnier, S., Mousty, C., 2004b. HRP/[Zn–Cr–ABTS] redox clay-based biosensor: design and optimization for cyanide detection. *Biosens. Bioelectron.* 20, 390–396.
- Shao, M., Han, J., Shi, W., Wei, M., Duan, X., 2010. Layer-by-layer assembly of porphyrin/layered double hydroxide ultrathin film and its electrocatalytic behavior for H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. *Electrochem. Commun.* 12, 1077–1080.
- Shao, M.F., Xu, X.G., Han, J.B., Zhao, J.W., Shi, W.Y., Kong, X.G., Wei, M., Evans, D.G., Duan, X., 2011. Magnetic-field-assisted assembly of layered double hydroxide/metal porphyrin ultrathin films and their application for glucose sensors. *Langmuir* 27, 8233–8240.
- Sheng, G., Boyd, S.A., 1998. Relation of water and neutral organic compounds in the interlayers of mixed Ca/trimethylphenylammonium smectites. *Clays Clays Min.* 46, 10–17.
- Shi, X.X., Feng, Y.J., Wang, X., Lee, H., Liu, J., Qu, Y.P., He, W.H., Kumard, S.M.S., Ren, N.Q., 2012. Application of nitrogen-doped carbon powders as low-cost and durable cathodic catalyst to air–cathode microbial fuel cells. *Bioresour. Technol.* 108, 89–93.
- Silvina, A., Bravo, M., Lamas, C., Claudio, J., 2002. In-vitro studies of diclofenac sodium controlled-release from biopolymeric hydrophilic matrices. *J. Pharm. Pharm. Sci.* 5, 213–219.
- Skoog, D., Crouch, S., Holler, J., 2007. Characterization of Potassium Permanganate By Using The (UV-VIS) Spectrophotometer. *Ultraviolet-visible spectroscopy.* 6, 69–173.
- Sohn, O.-J., Kim, C.-K., Rhee, J. II, 2008. Immobilization of glucose oxidase and lactate dehydrogenase onto magnetic nanoparticles for bioprocess monitoring system. *Biotechnol. Bioprocess Eng.* 13, 716–723.
- Stanimirova, T., Kirov, G., 2003. Cation composition during recrystallization of layered double hydroxides from mixed (Mg, Al) oxides. *Appl. Clay Sci.*, 22, 295–301.
- Stimpfling, T., Leroux, F., 2010. Carbon composites and replicas from intercalated layered double hydroxides. *Appl. Clay Sci.* 50, 367–375.
- Taylor, H.F.W., 1969. Segregation and cation-ordering in sjogrenite and pyroaurite. *Miner. Mag.* 37, 338–342.
- Taylor, H.F.W., 1973. Crystal structures of some double hydroxide minerals. *Miner. Mag.* 39, 377–389.
- Taylor, R.M., 1984. The rapid formation of crystalline double hydroxy salts and other compounds by controlled hydrolysis. *Clay Minerals* 19, 591–603.
- Tan, W., Li, Y., Chen, M., Wang, Y., 2011. Berberine hydrochloride: anticancer activity and nanoparticulate delivery system. *Intern. J. Nanomed.* 6, 1773–1777.
- Tan, J.M., Foo, J.B., Fakurazi, S., Hussein, M.Z., 2015. Release behaviour and toxicity evaluation of levodopa from carboxylated single-walled carbon nanotubes. *Beil. J. Nanotechnol.* 6, 243–253.
- Tang, W., Eisenbrand, G., 1992. *Chinese Drugs of Plant Origin: Chemistry, Pharmacology and Use in Traditional and Modern Medicine.* Springer, Berlin.
- Teixeira, P., Azeredo, J., Oliveira, R., Chibowski, E., 1998. Interfacial interactions between nitrifying bacteria and mineral carriers in aqueous media determined by contact angle measurements and thin layer wicking. *Colloids Surf. B* 12, 69–75.
- Theng, K.G., 1974. *The Chemistry of Clay-Organic Reactions.* Adam Hilger, London, UK.
- Therias, S., Mousty, C., Forano, C., Besse, J.P. 1996. Electrochemical transfer at anionic clay modified electrodes. Case of 2, 2'-azinobis (3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonate). *Langmuir* 12, 4914–4920.
- Tingry, S., Cretin, M., Innocent, C., 2013. Les biopiles enzymatiques pour produire de l'électricité. *Actualité Chimique*, 373, 18–25.
- Tonelli, D., Scavetta, E., Giorgetti, M., 2013. Layered double hydroxide modified electrodes: electroanalytical applications. *Anal. Bioanal. Chem.* 405, 603–614.
- Trikeriotis, M., Ghanotakis, D.F., 2007. Intercalation of hydrophilic and hydrophobic antibiotics in layered double hydroxides. *Int. J. Pharm.* 332, 176–184.
- Tronto, J., Bordonal, A.C., Naal, Z., Valim, J.B., 2013. Conducting polymers/layered double hydroxides intercalated nanocomposites. *Materials Science - Advanced Topics* 3–30.

- Tyner, K.M., Schiffman, S.R., Giannelis, E.P., 2004. Nanobiohybrids as delivery vehicles for camptothecin. *J. Control. Release* 95, 501–514.
- Vaccari, A., 1998. Preparation and catalytic properties of cationic and anionic clays. *Catal. Today* 41, 53–71.
- Varcoe, J.R., Slade, R.C.T., Wright, G.L., Chen Y., 2006. Steady-state dc and impedance investigations of H<sub>2</sub>/O<sub>2</sub> alkaline membrane fuel cells with commercial Pt/C, Ag/C, and Au/C cathodes. *J. Phys. Chem. B* 110, 21041–21049.
- Valente, J.S., Figueras, F., Gravelle, M., Kumbhar, P., Lopez, J., Besse, J.P., 2009. Basic properties of the mixed oxides obtained by thermal decomposition of hydrotalcites containing different metallic compositions. *J. Catal.* 189, 370–381.
- Valente, J.S., Sanchez-Cantu, M., Lopez Salinas, E., 2010. US Pat 7 740 828 B2, to Instituto Mexicano del Petróleo.
- Valente, J.S., Tzompantzi, F., Prince, J., 2011. Highly efficient photocatalytic elimination of phenol chlorinated phenols by CeO<sub>2</sub>/MgAl layered double hydroxides. *Appl. Catal. B: Environ.* 102, 276–285.
- Veniale, F., Barberis, E., Carcangiu, G., Morandi, N., Setti, M., Tamanini, M., Tessier, D., 2004. Formulation of muds for pelotherapy: effects of “maturation” by different mineral waters. *Appl. Clay Sci.* 25, 135–148.
- Vialat, P., Leroux, F., Taviot-Gueho, C., Villemure, G., Mousty, C., 2013. Insights into the electrochemistry of (Co<sub>x</sub>Ni<sub>(1-x)</sub>)<sub>2</sub>Al-NO<sub>3</sub> layered double hydroxides. *Electrochem. Acta* 107, 599–610.
- Vialat, P., Leroux, F., Mousty, C., 2015. Electrochemical properties of layered double hydroxides containing 3d metal cations. *J. Sol. State Electrochem.* 19, 1975–1983.
- Vial S., Forano C., Shan D., Mousty C., Barhoumi H., Martelet C., Jaffrezic N., 2006. Nanohybrid-layered double hydroxides/urease materials: Synthesis and application to urea biosensors. *Mater. Sci. Eng. C* 26, 387–393.
- Vial, S., Forano, C., Shan, D., Mousty, C., Barhoumi, H., Martelet, C., Jaffrezic, N., 2006. Nanohybrid-layered double hydroxides/urease materials: synthesis and application to urea biosensors. *Mater. Sci. Eng. C* 26, 387–393.
- Vuddanda, P.R., Chakraborty, S., Singh, S., 2010. Berberine: a potential phytochemical with multispectrum therapeutic activities. *Expert Opin. Investig. Drugs* 19, 1297–1307.
- Wai, K.N., Dekany, H.G., Banker, G.S., 1966. Applications of the montmorillonites in tablet making. *J. Pharm. Sci.* 55, 1244–1248.
- Wang, Z.L., 2003. New developments in transmission electron microscopy for nanotechnology. *Adv. Mater.*, 15, 1497.
- Wang, J., Kalinichev, A.G., Kirkpatrick, R.J., 2004. Molecular modeling of water structure in nanopores between brucite (001) surfaces. *Geochimica et Cosmochimica Acta* 68, 3351–3365.
- Wang, Z.L., Wang, E., Gao, L., Xu, L., 2005a. Synthesis and properties of Mg<sub>2</sub>Al layered double hydroxides containing 5-fluorouracil. *J. Solid State Chem.* 178, 736–741.
- Wang, Z.L., Wang, E.B., Tian, S.Y., Xiao, D.R., Gao, L., Wang, L., et al., 2005b. Intercalation of PM-19 into and *in vitro* release of anti-tumor drug from layered double hydroxide. *Chem. Res. Chin. Univ.* 21, 492–495.
- Wang, Y., Chen, S., Ni, F., Gao, F., Li, M., 2009. Peroxidase-Like Layered Double Hydroxide Nanoflakes for Electrocatalytic Reduction of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. *Electroanalysis* 21, 2125–2132.
- Wang, D.D., Chen, X., Evans, D.G., yang, W.S., 2013. Well-dispersed Co<sub>3</sub>O<sub>4</sub>/Co<sub>2</sub>MnO<sub>4</sub> nanocomposites as a synergistic bifunctional catalyst for oxygen reduction and oxygen evolution reactions. *Nanoscale* 5, 5312–5315.
- Wang, C., Perumalla, S.R., Lu, R., Fang, J., Sun, C.C., 2016. Sweet berberine. *Cryst. Growth Des.* 16, 933–939.
- Wei, M., Shi, S.X., Wang, J., Li, Y., Duan, X., 2004. Studies on the intercalation of naproxen into layered double hydroxide and its thermal decomposition by in situ FT-IR and in situ HT-XRD. *J. Solid State Chem.* 177, 2534–2541.
- Wei, J., Liang, P., Huang, X., 2011. Recent progress in electrodes for microbial fuel cells. *Bioresour. Technol.* 102, 9335–9344.
- Wilton, N.T., Vickers, P.J., Mann, S., 1997. Bioinorganic clays: synthesis and characterization of amino and polyamino acid intercalated layered double hydroxides. *J. Mat. Chem.* 7, 1623–1629.
- Wojtyczka, R.D., Dziedzic, A., Kepa, M., Kubina, R., Kabala-Dzik, A., Mularz, T., Idzik, D., 2014. Berberine enhances the antibacterial activity of selected antibiotics against coagulase-negative Staphylococcus strains in vitro. *Molecules* 19, 6583–6596.
- Xie, L., Hu, Z., Lv, C., Sun, G., Wang, J., Li, Y., He, H., Wang, J., Li, K., 2012. Co<sub>x</sub>Ni<sub>1-x</sub> doublehydroxide nanoparticles with ultrahigh

- specific capacitance as supercapacitorelectrode materials. *Electrochim. Acta* 78, 205–211.
- Xu, Z.P., Saha, S.K., Braterman, P.S., D'Souza, N., 2006. The effect of Zn, Al layered double hydroxide on thermal decomposition of poly (vinyl chloride). *Polymer Degradation and Stability* 91, 3237–3244.
- Xu, Z.P., Zhang, J., Adebajo, M.O., Zhang, H., Zhou, C., 2011. Catalytic applications of layered double hydroxides and derivatives. *Appl. Clay Sci.* 53, 139–150.
- Yarger, M.S., Steinmiller, E.M.P., Choi, K.S., 2008. Electrochemical synthesis of Zn-Al layered double hydroxide (LDH) films. *Inorg. Chem.*, 47, 5859–5865.
- Yin, J., Xing, H., Ye, J., 2008. Efficacy of berberine in patients with type 2 diabetes mellitus. *Metab. Clin. Exp.* 57, 712–717.
- Yin, H., Zhou, Y., Cui, L., Liu, X., Ai, S., Zhu, L., 2011. Electrochemical oxidation behavior of bisphenol A at surfactant/layered double hydroxide modified glassy carbon electrode and its determination. *J Solid State Electron.* 15, 167–173.
- Zebda, A., Tingry, S., Innocent, C., Cosnier, S., Forano, C., Mousty, C., 2011. Hybridlayered double hydroxides-polypyrrole composites for construction of glucose/O<sub>2</sub>biofuel cell. *Electrochim Acta* 56, 10378–10384.
- Zhang, H., Zou, K., Guo, S.H., Duan, X., 2006. Nanostructural drug-inorganic clay composites: structure, thermal property and in vitro release of captopril-intercalated Mg–Al-layered double hydroxides. *J. Solid State Chem.* 179, 1791–1800.
- Zhang, Q., Xiao, X., Feng, K., Wang, T., Li, W., Yuan, T., Sun, X., Sun, Q., Xiang, H., Wang, H., 2011. Berberine moderates glucose and lipid metabolism through multipathway mechanism. *Evidence Based Complement. Altern. Med.* 2011, 1–10.
- Zhao, F., Wu, X.E., Wang, M.K., Liu, Y., Gao, L.X., Dong, S.J., 2004. Electrochemical and bioelectrochemistry properties of room temperature ionic liquids and carbon composite materials. *Anal. Chem.* 76, 4960–4967.
- Zhao, Y., Yan, D., Wang, J., Zhang, P., Xiao, X., 2010. Anti-fungal effect of berberine on *Candida albicans* by microcalorimetry with correspondence analysis. *J. Therm. Anal. Calorim.* 102, 49–55.
- Zhao, M.Q., Zhang, Q., Zhang, W., Huang, J.Q., Zhang, Y.H., Su, D.S., Wei, F., 2010. Embedded high density metal nanoparticles with extraordinary thermal stability derived from guest-host mediated layered double hydroxides. *J. Am. Chem. Soc.* 132, 14739–14741.
- Zhao, W., Liu, X., Huang, Q., Walker, S.L., Cai, P., 2011. Interactions of pathogens *Escherichia coli* and *Streptococcus suis* with clay minerals. *Appl. Clay Sci.* 69, 37–42.
- Zhou, H., Li, D., Hibino, M., Honma, I., 2005. A self-ordered, crystalline–glass, mesoporous nanocomposite for use as a lithium-based storage device with both high power and high energy densities. *Angew. Chem. Int. Ed.* 44, 797–802.
- Zhou, M., Chi, M., Luo, J., He, H., Jin, T., 2011. An overview of electrodes materials in microbial fuel cells. *J. Power Sources* 169, 4427–4435.
- Zhou, E., El Hajbi, A., 1999. Preparation and characterization of a new lamellar double hydroxide [CdCrCl]. *Ann. Chim. Sci. Mat.* 24, 57–62.
- Zhu, J., Tang, D., Feng, L., Zheng, Z., Wang, R., Wu, A., et al., 2013. Development of selfmicroemulsifying drug delivery system for oral bioavailability enhancement of berberine hydrochloride. *Drug Dev. Ind. Pharm.* 39, 499–506.
- Zou, K., Zhang, H., Duan, X., 2007. Studies on the formation of 5-aminosalicylate intercalated Zn–Al layered double hydroxides as a function of Zn/Al molar ratios and synthesis routes. *Chem. Eng. Sci.* 62, 2022–2031.

ARTICLE 1 : NOVEL BIOHYBRIDS OF LAYERED DOUBLE HYDROXIDE AND LACTATE DEHYDROGENASE ENZYME: SYNTHESIS, CHARACTERIZATION AND CATALYTIC ACTIVITY STUDIES

*Mohamed Amine Djebbi, Mohamed Braiek, Slah Hidouri, Philippe Namour, Nicole Jaffrezic-Renault, et Abdesslem Ben Haj Amara, J. Mol. Struc.1105 (2016) 381–388*

ARTICLE 2 : PREPARATION AND OPTIMIZATION OF A DRUG DELIVERY SYSTEM BASED ON BERBERINE CHLORIDE-IMMOBILIZED MAGNESIUM-ALUMINUM HYDROTALCITE

*Mohamed Amine Djebbi, Zaineb Bouaziz, Alae Elabed, Moulay Sadiki, Soumya Elabed, Philippe Namour, Nicole Jaffrezic-Renault et Abdesslem Ben Haj Amara, Int. J. Pharm. 506 (2016) 438–448*

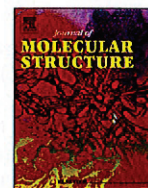
ARTICLE 3 : DELIVERY SYSTEM FOR BERBERINE CHLORIDE BASED ON THE NANOCARRIER ZINC-ALUMINUM LAYERED DOUBLE HYDROXIDE: PHYSICOCHEMICAL CHARACTERIZATION, RELEASE BEHAVIOR AND EVALUATION OF ANTI-BACTERIAL POTENTIAL

*Mohamed Amine Djebbi, Alae Elabed, Zaineb Bouaziz, Moulay Sadiki, Soumya Elabed, Philippe Namour, Nicole Jaffrezic-Renault et Abdesslem Ben Haj Amara, Int. J. Pharm. 515 (2016) 422–430*

ARTICLE 4 : LAYERED DOUBLE HYDROXIDE MATERIALS COATED CARBON ELECTRODE: NEW CHALLENGE TO FUTURE ELECTROCHEMICAL POWER DEVICES

*Mohamed Amine Djebbi, Mohamed Braiek, Philippe Namour, Abdesslem Ben Haj Amara, et Nicole Jaffrezic-Renault, App. Surf. Sci. 386 (2016) 352–363*





## Novel biohybrids of layered double hydroxide and lactate dehydrogenase enzyme: Synthesis, characterization and catalytic activity studies

Mohamed Amine Djebbi<sup>a, b, \*</sup>, Mohamed Braiek<sup>b</sup>, Slah Hidouri<sup>a</sup>, Philippe Namour<sup>b, c</sup>, Nicole Jaffrezic-Renault<sup>b</sup>, Abdesslem Ben Haj Amara<sup>a</sup>

<sup>a</sup> Laboratoire de Physique des Matériaux Lamellaires et Nano-Matériaux Hybrides (PMLNMH), Faculté des Sciences de Bizerte, Université de Carthage, Zarzouna, 7021, Tunisia

<sup>b</sup> Institut des Sciences Analytiques UMR CNRS 5280, Université Claude Bernard-Lyon 1, 5 Rue de la Doua, 69100, Villeurbanne, France

<sup>c</sup> Irstea, MALY, 5 Rue de la Doua, 69100, Villeurbanne, France

### ARTICLE INFO

#### Article history:

Received 27 April 2015

Received in revised form

30 September 2015

Accepted 19 October 2015

Available online 26 October 2015

#### Keywords:

Bioinorganic system

Layered double hydroxide (LDH)

Lactate dehydrogenase (Lac Deh)

Enzyme immobilization

Catalytic activity

### ABSTRACT

The present work introduces new biohybrid materials involving layered double hydroxides (LDH) and biomolecule such as enzyme to produce bioinorganic system. Lactate dehydrogenase (Lac Deh) has been chosen as a model enzyme, being immobilized onto MgAl and ZnAl LDH materials via direct ion-exchange (adsorption) and co-precipitation methods. The immobilization efficiency was largely dependent upon the immobilization methods. A comparative study shows that the co-precipitation method favors the immobilization of great and tunable amount of enzyme. The structural behavior, chemical bonding composition and morphology of the resulting biohybrids were determined by X-ray diffraction (XRD) study, Fourier transform infrared (FTIR) spectroscopy and transmission electron microscopy (TEM), respectively. The free and immobilized enzyme activity and kinetic parameters were also reported using UV–Visible spectroscopy. However, the modified LDH materials showed a decrease in crystallinity as compared to the unmodified LDH. The change in activity of the immobilized lactate dehydrogenase was considered to be due, to the reduced accessibility of substrate molecules to the active sites of the enzyme and the partial conformational change of the Lac Deh molecules as a result of the immobilization way. Finally, it was proven that there is a correlation between structure/microstructure and enzyme activity dependent on the immobilization process.

© 2015 Elsevier B.V. All rights reserved.

### 1. Introduction

Bioinorganic systems are nanostructured biohybrid materials in which a biomolecule is assembled to nanosized inorganic solid [1]. They constitute a new generation of materials, at the interface of biology and materials science [2]. These materials have been subjected to intense research not only as ecological materials, but also for other applications including biotechnology such as in biosensor systems [3,4]. Therefore, immobilization of biomolecules, such as DNA, ATP, nucleosides and enzyme with isoelectric point varying in

a large pH domain has been extensively studied [5,6]. Bioinorganic research on biohybrids can protect the biomolecules from decomposition or denaturation, which made it useful in safe and targeted.

2D-Layered mineral materials, such as layered double hydroxide (LDH), so called anionic clays or hydrotalcites (HTs), has attracted considerable attention as host structures due to its technological importance in catalysis, separation technology, optics, nanocomposites materials engineering, and medical science [7]. More recently these inorganic materials have been also applied in immobilization of enzyme for biosensor development [8,9]. LDH are synthetic lamellar solids with positively charged brucite-like layers of mixed metal hydroxides separated by interlamellar domains occupied by anions and water molecules, defined by the general formula  $[M^{2+}_{1-x}M^{3+}_x(OH)_2]^{x+}[(A_{x/n})^{n-}yH_2O]$  (abbreviated as  $M^{2+}M^{3+}-A$ , where  $M^{2+}$  is a bivalent cation (such as  $Mg^{2+}$ ,  $Ni^{2+}$ ,  $Ca^{2+}$ ,  $Mn^{2+}$ ,  $Co^{2+}$  or  $Zn^{2+}$ ),  $M^{3+}$  is a trivalent cation (such as  $Al^{3+}$ ,

\* Corresponding author. Laboratoire de Physique des Matériaux Lamellaires et Nano-Matériaux Hybrides (PMLNMH), Faculté des Sciences de Bizerte, Université de Carthage, Zarzouna, 7021, Tunisia.

E-mail addresses: [mohamed.djebbi@etu.univ-lyon1.fr](mailto:mohamed.djebbi@etu.univ-lyon1.fr), [med-djebbi@hotmail.fr](mailto:med-djebbi@hotmail.fr) (M.A. Djebbi).





ELSEVIER

Contents lists available at ScienceDirect

## International Journal of Pharmaceutics

journal homepage: [www.elsevier.com/locate/ijpharm](http://www.elsevier.com/locate/ijpharm)

## Preparation and optimization of a drug delivery system based on berberine chloride-immobilized MgAl hydrotalcite

Mohamed Amine Djebbi<sup>a,b,\*</sup>, Zaineb Bouaziz<sup>a</sup>, Alae Elabed<sup>c</sup>, Moulay Sadiki<sup>c</sup>, Soumya Elabed<sup>c</sup>, Philippe Namour<sup>b,d</sup>, Nicole Jaffrezic-Renault<sup>b</sup>, Abdesslem Ben Haj Amara<sup>a</sup><sup>a</sup> Laboratoire de Physique des Matériaux Lamellaires et Nano-Matériaux Hybrides, Faculté des Sciences de Bizerte, Université de Carthage, 7021 Bizerte, Tunisia<sup>b</sup> Institut des Sciences Analytiques UMR CNRS 5280, Université Claude Bernard-Lyon 1, 5 Rue de la Doua, 69100 Villeurbanne, France<sup>c</sup> Laboratoire de Biotechnologie Microbienne, Faculté des Sciences et Techniques de Fès, Université Sidi Mohamed Ben Abdellah, 1213 Fès-Saïs, Morocco<sup>d</sup> Irstea, 5 Rue de la Doua, 69100, Villeurbanne, France

## ARTICLE INFO

## Article history:

Received 1 March 2016

Received in revised form 7 April 2016

Accepted 12 April 2016

Available online 21 April 2016

## Chemical compounds studied in this article:

Aluminum chloride hexahydrate (PubChem CID: 24564)

Aluminum nitrate nanohydrate (PubChem CID: 24567)

Berberine Chloride (PubChem CID: 12456)

Magnesium chloride hexahydrate

(PubChem CID: 24644)

Magnesium nitrate hexahydrate (PubChem

CID: 202877)

Phosphate-buffered saline (PubChem CID:

24978514)

Sodium hydroxide (PubChem CID: 14798)

Urea (PubChem CID: 1176)

## Keywords:

Layered double hydroxide (LDH)

Berberine chloride (BBC)

Immobilization

Drug controlled release

Anti-bacterial activity

## ABSTRACT

Hydrotalcite (HT), also known as a layered double hydroxide (LDH) compound, has been widely used in past years in the formulation of drugs due to its specific properties including good biocompatibility, null toxicity, high chemical stability and pH-dependent solubility which aid in drug controlled release. In this work, berberine chloride (BBC) class antibacterial agent was immobilized into magnesium-aluminum LDH in order to improve the drug efficiency as well as to achieve the controlled release property. BBC molecules were immobilized into MgAl LDH through a conventional ion exchange reaction and co-precipitation method. The ion-exchange experiments of BBC on MgAl LDH were investigated with particular attention paid to the influence of the layer charge, the nature of the intercalated anion and the morphology. The immobilization efficiency was dependent upon the LDH properties and the immobilization process. Characterization by powder x-ray diffraction, Fourier transform infrared spectroscopy, scanning electron microscopy and contact angle measurements revealed that the interaction of BBC with MgAl LDH occurs by adsorption rather than intercalation of BBC within LDH layers. In vitro anti-bacterial tests were carried out using disc diffusion assay to prove the effectiveness of these novel biohybrid beads as a controlled drug delivery method. Consequently, the BBC-LDH co-precipitated formulation revealed an enhanced anti-bacterial activity compared to the ion-exchanged formulation not only due to an improvement of chemical stability and retained amount of BBC molecules but also due to the release property.

© 2016 Elsevier B.V. All rights reserved.

## 1. Introduction

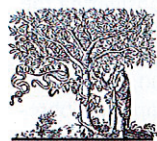
Special attention has been paid to inorganic/inorganic, organic/inorganic and bio/inorganic systems in the past decades due to their diverse technical applications and promising advantages incorporated with desired functionality (Choy et al., 1998; Choy

et al., 2002; Choy et al., 1999; Ryu et al., 2010; Quin et al., 2015; Dening et al., 2016; Nuruzzaman et al., 2016; Senapati et al., 2016; Wang et al., 2016). Particularly, bio/inorganic systems have been subjected to intense research not only as ecological materials but also for their roles as both reservoirs and delivery carriers of functional biomolecules (Choy et al., 2000; Kwak et al., 2004; Del Hoyo, 2007; Seftel et al., 2013; Cunha et al., 2016). The inorganic partner may contribute to novel functionalities by a synergic effect at the nanoscale level of its own specific properties with that of the biomolecules. Therefore, immobilization of biomolecules, such as amino acids (Aisawa et al., 2001; Iyi et al., 2013), DNA (Choy et al.,

\* Corresponding author.

E-mail addresses: [mohamed.djebbi@etu.univ-lyon1.fr](mailto:mohamed.djebbi@etu.univ-lyon1.fr), [med-djebbi@hotmail.fr](mailto:med-djebbi@hotmail.fr) (M.A. Djebbi).

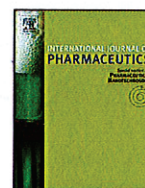




ELSEVIER

Contents lists available at ScienceDirect

## International Journal of Pharmaceutics

journal homepage: [www.elsevier.com/locate/ijpharm](http://www.elsevier.com/locate/ijpharm)

## Delivery system for berberine chloride based on the nanocarrier ZnAl-layered double hydroxide: Physicochemical characterization, release behavior and evaluation of anti-bacterial potential



Mohamed Amine Djebbi<sup>a,b,\*</sup>, Alae Elabed<sup>c</sup>, Zaineb Bouaziz<sup>a</sup>, Moulay Sadiki<sup>c</sup>,  
Soumya Elabed<sup>c</sup>, Philippe Namour<sup>b,d</sup>, Nicole Jaffrezic-Renault<sup>b</sup>,  
Abdesslem Ben Haj Amara<sup>a</sup>

<sup>a</sup> Laboratoire de Physique des Matériaux Lamellaires et Nano-Matériaux Hybrides, Faculté des Sciences de Bizerte, Université de Carthage, 7021 Bizerte, Tunisia

<sup>b</sup> Institut des Sciences Analytiques UMR CNRS 5280, Université Claude Bernard-Lyon 1, 5 Rue de la Doua, 69100 Villeurbanne, France

<sup>c</sup> Laboratoire de Biotechnologie Microbienne, Faculté des Sciences et Techniques de Fès, Université Sidi Mohamed Ben Abdellah, 1213 Fès-Saïs, Morocco

<sup>d</sup> Irstea, 5 rue de la Doua, 69100, Villeurbanne, France

## ARTICLE INFO

## Article history:

Received 28 June 2016

Received in revised form 26 September 2016

Accepted 28 September 2016

Available online 19 October 2016

## Chemical compounds studied in this article:

Aluminum chloride hexahydrate (PubChem

CID: 24564)

Berberine chloride (PubChem CID: 12456)

Phosphate-buffered saline (PubChem CID:

24978514)

Sodium hydroxide (PubChem CID: 14798)

Zinc chloride (PubChem CID: 5727)

## Keywords:

Layered double hydroxide (LDH)

Berberine chloride (BBC)

Co-precipitation

Drug delivery system (DDS)

Anti-bacterial activity

## ABSTRACT

Layered double hydroxide (LDH) has attracted major interest as one of the most versatile drug delivery systems especially for adsorption capacity and/or controlled delivery property of bioactive agents owing to their combining features of biohybrid. ZnAl synthesized layered double hydroxide can offer a platform to immobilize various types of bioactive compounds, particularly berberine chloride (BBC). However, the immobilization reaction of berberine chloride into ZnAl-LDH was performed by direct co-precipitation method at different ratios of BBC/LDH. BBC-ZnAl-LDH biohybrids were characterized in terms of structure, surface morphology, in vitro drug release profile and antibacterial assay against various bacterial cells. The BBC biomolecules were attached by coordinate bond. Structural and microstructural characterization confirms that interaction of BBC with ZnAl-LDH occurs by adsorption rather than intercalation of BBC within LDH layers. The BBC release profiles from BBC-ZnAl-LDH had a longer release duration compared to the physical mixture, and the drug release seemed faster with the low ratio of BBC/LDH. BBC-ZnAl-LDH can be internalized into bacterial cells. In vitro experiments in PBS medium showed that BBC-ZnAl-LDH biohybrid had higher cytotoxicity and inhibitory effects against three pathogenic bacteria; *Staphylococcus aureus* CIP 543154, *Pseudomonas aeruginosa* A22 and *Bacillus subtilis* ILP 1428B upon the drug release profiles and its destructive potential depends on the loading BBC on the LDH layers. Nonetheless these results prove that the prepared BBC-ZnAl-LDH biohybrids retain the anti-bacterial character of the BBC molecules and are therefore potential modified drug delivery system (DDS).

© 2016 Elsevier B.V. All rights reserved.

## 1. Introduction

Over the past few years, the revolutionary development of nanomedicine has emerged as one of the most prominent research areas in biomedical science. This interdisciplinary technology is a combination of both traditional medical technology and nanotechnology, with the exploitation of nanosized materials (Tan et al.,

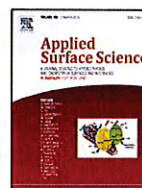
2015). Particularly, clay minerals have been subjected to intense research not only as ecological materials but also for their roles as delivery carriers of drugs in pharmaceutical formulations (Gereli et al., 2006). The mineral partner may contribute to the effect of the drug activity by increase or decrease of the bioavailability of drug after administration (Wai et al., 1966; Qtaitat, 2004; Gereli et al., 2006).

Berberine chloride (BBC), a pharmaceutical agent whose structure is shown in Scheme 1 is an alkaloid extracted from the Berberidaceae family as *Berberis vulgaris* or Ranunculaceae such as *Coptis chinensis* and *Hydrastis canadensis* herbs, was used historically in Asian pharmacopoeia (Ayurveda and Traditional Chinese Medicine). It is known to be a popular constituent in most

\* Corresponding author at: Laboratoire de Physique des Matériaux Lamellaires et Nano-Matériaux Hybrides, Faculté des Sciences de Bizerte, Université de Carthage, 7021 Bizerte, Tunisia.

E-mail addresses: [mohamed.djebbi@etu.univ-lyon1.fr](mailto:mohamed.djebbi@etu.univ-lyon1.fr), [med-djebbi@hotmail.fr](mailto:med-djebbi@hotmail.fr) (M.A. Djebbi).





# Layered double hydroxide materials coated carbon electrode: New challenge to future electrochemical power devices



Mohamed Amine Djebbi<sup>a,b,\*</sup>, Mohamed Braiek<sup>a</sup>, Philippe Namour<sup>a,c</sup>,  
Abdesslem Ben Haj Amara<sup>b</sup>, Nicole Jaffrezic-Renault<sup>a</sup>

<sup>a</sup> Institut des Sciences Analytiques UMR CNRS 5280, Université Claude Bernard-Lyon 1, 5 rue de la Doua, 69100 Villeurbanne, France

<sup>b</sup> Laboratoire de Physique des Matériaux Lamellaires et Nano-Matériaux Hybrides, Faculté des Sciences de Bizerte, Université de Carthage, 7021 Bizerte, Tunisia

<sup>c</sup> Irstea, 5 rue de la Doua, 69100 Villeurbanne, France

## ARTICLE INFO

### Article history:

Received 22 December 2015

Received in revised form 14 May 2016

Accepted 6 June 2016

### Keywords:

Layered double hydroxide (LDH)

Microbial fuel cell (MFC)

Co-precipitation

Modified electrode

Electrochemical performance

## ABSTRACT

Layered double hydroxides (LDHs) have been widely used in the past years due to their unique physico-chemical properties and promising applications in electroanalytical chemistry. The present paper is going to focus exclusively on magnesium-aluminum and zinc-aluminum layered double hydroxides (MgAl & ZnAl LDHs) in order to investigate the property and structure of active cation sites located within the layer structure. The MgAl and ZnAl LDH nanosheets were prepared by the constant pH co-precipitation method and uniformly supported on carbon-based electrode materials to fabricate an LDH electrode. Characterization by powder x-ray diffraction, Fourier transform infrared spectroscopy, scanning electron microscopy and transmission electron microscopy revealed the LDH form and well-crystallized materials. Wetting surface properties (hydrophilicity and hydrophobicity) of both prepared LDHs were recorded by contact angle measurement show hydrophilic character and basic property. The electrochemical performance of these hybrid materials was investigated by mainly cyclic voltammetry, electrochemical impedance spectroscopy and chronoamperometry techniques to identify the oxidation/reduction processes at the electrode/electrolyte interface and the effect of the divalent metal cations in total reactivity. The hierarchy of the modified electrode proves that the electronic conductivity of the bulk material is considerably dependent on the divalent cation and affects the limiting parameter of the overall redox process. However, MgAl LDH shows better performance than ZnAl LDH, due to the presence of magnesium cations in the layers. Following the structural, morphological and electrochemical behavior studies of both synthesized LDHs, the prepared LDH modified electrodes were tested through microbial fuel cell configuration, revealing a remarkable, potential new pathway for high-performance and cost-effective electrode use in electrochemical power devices.

© 2016 Elsevier B.V. All rights reserved.

## 1. Introduction

Microbial fuel cells (MFCs) are novel bioelectrochemical systems that exploit electrogenic bacterial to generate electrical power while degrading organic pollutants in wastewater [1,2]. However, improving anode performance in MFCs remains one of the deciding factors for their applications, because the biological reactions mainly occur over its surface. During anodic bioelectrocatalysis, microorganisms oxidize organic matter and released electrons are

transferred to the solid electrode material. Hence, the development of new and simple strategies to fabricate efficient anode materials to increase the bacterial loading capacity and improve substrate transport is of great interest and importance.

Nowadays, a major challenge for microbial fuel cells (MFCs) is to develop new anode materials for practical applications in bio-electroremediation devices. Commercial graphite-based materials such as carbon felt, carbon cloth, glassy carbon, carbon paper and graphite rods have been widely used as convenient materials for anode MFCs [3–6]. Thus, improving anode performance is important for increasing power production. Previous research has shown that electrode performance can be improved through chemical modification of the anodes.

\* Corresponding author at: Institut des Sciences Analytiques UMR CNRS 5280, Université Claude Bernard-Lyon 1, 5 rue de la Doua, 69100 Villeurbanne, France.

E-mail addresses: [mohamed.djebbi@etu.univ-lyon1.fr](mailto:mohamed.djebbi@etu.univ-lyon1.fr), [med-djebbi@hotmail.fr](mailto:med-djebbi@hotmail.fr) (M.A. Djebbi).