



**HAL**  
open science

# Elaboration et évaluation biologique de nouveaux matériaux lignocellulosiques antibactériens

Zineb Khaldi

► **To cite this version:**

Zineb Khaldi. Elaboration et évaluation biologique de nouveaux matériaux lignocellulosiques antibactériens. Autre. Université de Limoges, 2018. Français. NNT : 2018LIMO0090 . tel-02045667

**HAL Id: tel-02045667**

**<https://theses.hal.science/tel-02045667v1>**

Submitted on 22 Feb 2019

**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 de Limoges**

**ED 614- Chimie, Ecologie, Géosciences et Agrosiences (CEGA)**

**PEIRENE**

Thèse pour obtenir le grade de  
**Docteur de l'Université de Limoges**  
Chimie des substances naturelles

Présentée et soutenue par  
**ZINEB KHALDI**

Le 26 octobre 2018

**Elaboration et évaluation biologique de nouveaux matériaux  
lignocellulosiques antibactériens**

Thèse dirigée par **Professeur ZERROUKI Rachida** et **Docteur OUK Tan-Sothea**

**JURY :**

Rapporteurs

Mme Sandrine Bouquillon, Professeur, Université de Reims

M. Philippe Gérardin, Professeur, Université de Lorraine

Examineurs

M. Nicolas Joly, Professeur, Université d'Artois

M. Nouredine Idrissi Kandri, Professeur, Université Sidi Mohamed Ben Abdellah de Fès.

M. Vincent Gloaguen, Professeur, Université de Limoges

M. Tan-Sothéa Ouk, Maître de conférences Université de Limoges

Mme Rachida Zerrouki, Professeur, Université de Limoges



*Rien n'est jamais perdu tant qu'il reste quelque chose à trouver*  
**Pierre Dac**



## Remerciements

*Pour commencer, je veux adresser mes remerciements au Professeur Sandrine BOUQUILLON et au Professeur Philippe GERARDIN pour avoir accepté de juger ce travail en tant que rapporteurs. Je remercie également le Professeur Nicolas JOLY, le professeur Nouredine IDRISSE KANDRI et le professeur Vincent GLOAGUEN d'avoir accepté de faire partie du jury en tant qu'examineurs.*

*Je tiens à exprimer mes remerciements les plus sincères à ma directrice de thèse, le professeur Rachida ZERROUKI. Je vous remercie de m'avoir écouté, conseillé, encouragé et soutenue et cela depuis ma troisième année de Licence et à tout moment. Je vous suis très reconnaissante pour votre grande disponibilité, ainsi que pour vos exceptionnelles qualités pédagogiques et scientifiques. Je vous remercie pour tout ce que vous m'avez apporté, pour votre bonne humeur et pour votre encadrement sans faille. Merci pour tous les bons moments de convivialité, au labo ou en dehors... Difficile de vous remercier en quelques lignes ! Je veux tout simplement vous assurer de mon profond respect, mon admiration et surtout vous dire un **grand merci** pour tout.*

*J'adresse également mes remerciements chaleureux à monsieur Tan-Sothea OUK, pour avoir codirigé cette thèse. Merci de m'avoir formé, et de m'avoir initié à la microbiologie. Grâce à vous, j'ai pu gagner en autonomie.... Je vous remercie pour la confiance que vous m'avez accordée et pour votre gentillesse.*

*Un remerciement tout particulier à madame Sabine LHERNOULD et monsieur Guy COSTA les deux personnes qui ont énormément contribué à l'élaboration de ce manuscrit. Je vous remercie pour les nombreux échanges et vos conseils très enrichissants et pour avoir consacré du temps à la relecture et à la correction de ce manuscrit. J'ai apprécié outre vos compétences scientifiques, vos qualités humaines et votre grande gentillesse.*

*Je remercie monsieur Vincent SOL, directeur du laboratoire, pour m'avoir accueillie au sein de son équipe. Je suis très reconnaissante pour l'aide que vous m'avez apporté depuis ma première année de Master en tant que professeur dans ce parcours, en tant que directeur du laboratoire auquel est adossé ce parcours et en tant que chercheur.*

*Je tiens également à remercier tous mes enseignants de chimie organique, Mr. Vincent CHALEIX, Mr. Nicolas VILLANDIER, Mme Stéphanie LHEZ, Mr. Robert GRANET.... Merci pour*

*votre accueil, votre aide et pour les échanges enrichissants, que ce soit d'un point de vue scientifique ou personnel.*

*J'adresse mes remerciements à tous les membres du laboratoire pour leur accueil, leur amabilité et leur gentillesse. Je me suis bien senti dans ce groupe et très vite intégré. Merci à Dorothée pour ton aide et tes encouragements lors de mes TP en tant qu'étudiante ou enseignante. Merci à Frédérique, Michelle, Cristelle, Evelyne... Je vous remercie pour votre sympathie et pour les échanges que nous avons eus par-ci, par-là. Je tiens à remercier Sylvie LAVAL, notre super secrétaire toujours prête à nous aider avec son grand cœur et son grand caractère... ! Merci à Odile DUVAL pour son aide et sa disponibilité, grâce à toi j'ai vu Berlin.*

*Un grand merci pour toute l'équipe de l'IUT- Génie biologie, pour votre accueil, votre disponibilité et votre convivialité. Je pense à toi Karine, tout particulièrement, tu m'as tout appris, tu m'as formé aux techniques de microbiologie, et ce n'était pas facile étant donné que j'étais novice (je pense à ma première coloration de Gram plutôt pas mal !!). Bien sûr, une pensée pour toi Cornelia, merci pour ton aide, nos petites discussions vont me manquer. Un grand merci les filles. Vous étiez toujours disponible afin que je puisse mener à bien mes tests antibactériens. J'ai passé avec vous des moments d'échanges inoubliables. Je pense également au professeur Philippe BRESSOLIER, je vous remercie pour votre aide et votre bonne humeur.*

*J'adresse également mes remerciements à Mr. Yann LAUNEY pour le temps passé à réaliser les images MEB, pour son expertise et sa gentillesse. Je tiens également à remercier vivement Mr. Etienne LABORDE pour avoir réalisé de nombreuses caractérisations XPS, Mr. Yves CHAMPAVIER pour les caractérisations par RMN, Mr. Cyrille COLAS pour les caractérisations par spectroscopie de masse ainsi que Mr. Patrice FANDANECHÉ pour les analyses élémentaires.*

*Je souhaite également remercier Amel HAJ-BOUAZZA pour son aide et sa grande gentillesse. Merci d'être toujours prête pour m'accueillir au Canada, je ne te remercierai jamais assez pour cela, sans oublier Mr Daniel Montplaisir que je remercie pour sa collaboration, ses discussions passionnantes et sa lettre d'accueil. Je vous souhaite, et à votre petit prince adorable Noah, un futur rempli de bonheur, de santé et de réussite.*

*Aussi, mes sincères remerciements aux professeurs du CNAM à Paris. Mme Najla FOURATI et Mr. Chouki ZERROUKI. Je n'oublierai jamais le court séjour que j'ai passé dans votre laboratoire, je vous remercie pour les discussions très enrichissantes qui m'ont permis de*

*découvrir le monde des biocapteurs. Votre accueil et votre grande gentillesse m'ont beaucoup touché. Je tiens à exprimer ma reconnaissance à Mr. Chouki ZERROUKI, pour avoir pris de son temps et réalisé les tests physiques dont j'avais besoin.*

*Un grand merci à Mr. Romain LUCAS et madame Jessica ROPER pour avoir consacré du temps à la relecture des articles.*

*Je tiens ensuite à remercier mes différents collègues, pour leur humour et les bons moments passés ensemble. A toi Kérim (mon premier encadrant ! je ne t'oublierai jamais !!), Idelette ( je pense à tes macarons et les petites plantes !), Florent, Olivier, Tom, Benjamin, Florian, Mark-Arthur, Guillaume, Jeremy, Veronica (l'adorable italienne !)... A toi Soukaina, notre aventure date du Maroc. Les études nous donnent des camarades et les épreuves des frères et sœurs, tu en es une pour moi, je te dis merci et je te souhaite le meilleur pour la suite. A toi Amaury, un **merci** tout particulier. Un grand merci également à mon adorable Claire BESSE, on a passé des moments inoubliables (je pense à nos journées à l'iut !!). Je te remercie pour ta personnalité pleine de gentillesse et d'attention. Merci d'avoir supporté la chaleur (45° !!) pour être à mes coté. Je te souhaite plein de bonnes choses. A vous tous, je vous souhaite le meilleur au niveau personnel et professionnel. Sans vous, l'aventure n'aurais pas été la même.*

*A mes stagiaires, Marlène Suchareau, Djihad Naanaa, Mehdi Taib, j'ai appris beaucoup de chose avec vous, je vous remercie et je vous souhaite une bonne continuation.*

*Un petit coucou de passage pour Ahmed (Bon courage pour la fin de ta thèse !) et Abdechakour.*

*En fin, je remercie ceux qui ont toujours été là pour moi, je pense évidemment à mes parents et mes frères (Amine et Ismail) qui sans eux, je ne serais pas là aujourd'hui. Comment parler de moi sans parler de vous ! Tout au long de mon cursus, vous m'avez toujours soutenu, encouragé et aidé. Vous m'avez donné toutes les chances pour réussir. J'espère que vous trouvez dans la réalisation de ce travail, l'aboutissement de vos efforts ainsi que l'expression de ma plus affectueuse gratitude.*

*Mention spéciale à mon mari qui m'a toujours encouragé, soutenu et poussé à aller de l'avant.*



## Droits d'auteurs

---

Cette création est mise à disposition selon le Contrat :

« **Attribution-Pas d'Utilisation Commerciale-Pas de modification 3.0 France** »

disponible en ligne : <http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/3.0/fr/>





## Table des matières

<b>Introduction générale</b> .....	1
<b>Chapitre 1: Etat de l'art - Les bactéries, les contaminations bactériennes et les surfaces antibactériennes existantes</b> .....	3
I. Les bactéries, les infections bactériennes et la contamination de surface.....	5
I.1. Les bactéries .....	5
I.1.1. Structure des bactéries.....	5
I.1.1.1. La paroi .....	6
I.1.1.2. Les flagelles et les pili .....	7
I.1.2. Les différents modes de vie des bactéries. ....	7
I.1.3. La croissance bactérienne.....	7
I.2. Les infections bactériennes .....	9
I.3. La contamination des surfaces : Formation de biofilms.....	10
I.3.1. Les facteurs influençant l'adhésion bactérienne .....	12
I.3.1.1. Les facteurs liés à la bactérie.....	12
I.3.1.2. Les facteurs liés à la surface du matériau.....	13
I.3.1.3. Les facteurs liés à l'environnement.....	14
II. Les stratégies de lutte contre les contaminations bactériennes .....	15
II.1. Les surfaces biocides .....	15
II.1.1. L'immobilisation des antibiotiques sur support.....	15
II.1.2. Le revêtement de surfaces par des éléments métalliques.....	18
II.1.3. Le revêtement de surfaces par des polymères biocides .....	19
II.2. Les surfaces photobactéricides .....	20
II.3. Les surfaces anti- adhésives .....	24
II.3.1. Les surfaces super-hydrophobes .....	24
II.3.2. Les surfaces super hydrophiles .....	25
III. Objet du travail.....	28
IV. Les matériaux lignocellulosiques .....	29
IV.1. La cellulose.....	30
IV.2. La lignine.....	31
IV.3. Les hémicelluloses .....	32
IV.4. La pâte à papier à partir du bois .....	34
IV.4.1. Les pâtes mécaniques .....	34

IV.4.2. Les pâtes chimiques.....	34
IV.4.3. Le papier comme supports d'antibactériens.....	35
<b>Chapitre 2: Elaboration de papiers actifs par greffage de biocides naturels Evaluation biologique .....</b>	<b>39</b>
I. Elaboration de matériaux antibactériens par immobilisation de biocides naturels .....	41
I.1. Les biocides naturels .....	41
I.1.1. Les peptides antimicrobiens :.....	41
I.1.2. Les enzymes antimicrobiens .....	45
I.1.3. Les huiles essentielles .....	47
II. Elaboration de nouveaux matériaux bioactifs par greffage de composés d'huiles essentielles sur les fibres de pâte kraft.....	53
II.1. Stratégie de synthèse.....	53
II.2. Mono substitution de la triazine.....	54
II.2.1. Fixation du thymol sur la triazine .....	54
II.2.2. Fixation du carvacrol sur la triazine.....	57
II.3. Fonctionnalisation de la pâte Kraft .....	58
II.3.1. Greffage du thymol-triazine sur les fibres de pâte Kraft .....	59
II.3.2. Greffage du carvacrol-triazine sur la pâte Kraft .....	61
II.4. Evaluation de l'activité microbiologique .....	64
II.4.1. Préparation des échantillons .....	66
II.4.2. Activité antibactérienne des matériaux PK-Triazine-Thymol et PK-Triazine-Carvacrol	66
II.4.3. Activité antibactérienne de mélanges des matériaux PK-Triazine-Thymol et PK-Triazine-Carvacrol. ....	72
II.4.4. Activité antibactérienne sur un mélange de bactéries, <i>E. coli</i> et <i>S. aureus</i> .....	74
II.5. Conclusion .....	75
III. De la pâte Kraft à la pâte thermomécanique.....	76
III.1. Préparation des matériaux PTM-Triazine-Thymol et PTM-Triazine-Carvacrol.....	77
III.2. Evaluation de l'activité antibactérienne des matériaux PTM-Triazine-Thymol et PTM-Triazine-Carvacrol.....	79
III.3. Conclusion .....	83
<b>Chapitre 3: Elaboration de nouveaux matériaux antibactériens portant le motif aryl-1,2,3-triazole .....</b>	<b>85</b>
I. Elaboration de nouveaux matériaux bioactifs portant le motif aryl-1,2,3-triazole .....	87
I.1. Les triazoles.....	87
I.1.1. Les 1,2,4-triazoles .....	88

I.1.2. Les 1,2,3-triazoles .....	89
I.1.2.1. Utilisation du 1,2,3-triazole pour l'optimisation de l'activité antimicrobienne .....	92
I.1.2.2. Utilisation du triazole pour développer de nouvelles molécules antimicrobiennes à partir des substrats inactifs. ....	100
II. Préparation de différents aryltriazoles supportés sur la pâte kraft .....	102
II.1. Stratégie de synthèse .....	102
II.2. Synthèse des dérivés azidés .....	103
II.3. Préparation de la pâte kraft propargylée .....	105
II.4. Réaction de cycloaddition entre la pâte Kraft propargylée et les dérivés azidés .....	106
II.5. Evaluation de l'activité microbiologique des matériaux de pâte Kraft 1,2,3-triazolés .....	109
II.6. Etude de l'activité antibactérienne des matériaux 1,2,3-triazolés en fonction du temps ..	111
II.7. Activité antibactérienne des mélanges des matériaux 1,2,3-triazolés.....	115
II.8. Etude de l'activité antibactérienne des différents mélanges de matériaux 1,2,3-triazolés en fonction du temps .....	118
II.9. Etude de l'activité antibactérienne des matériaux 1,2,3-triazolés sur un mélanges de bactéries, <i>E. coli</i> et <i>S. aureus</i> .....	121
II.10. Conclusion .....	122
III. De la pâte Kraft à la pâte thermomécanique.....	123
III.1. Propargylation des fibres de pâte thermomécanique .....	123
III.2. Réaction de cycloaddition entre les fibres de pâte thermomécanique propargylées et les azido-aryles portant les substituants hydroxyéthyle et éthoxycarbone .....	124
III.3. Evaluation de l'activité antibactérienne des matériaux PTM 1,2,3-triazolés portant les substituants hydroxyéthyle et éthoxycarbone.....	126
III.4. Elaboration et évaluation biologique des matériaux portant les substituants hydroxyméthyle, méthoxyle et acétyle .....	128
III.4.1. Elaboration des matériaux .....	128
III.4.2. Evaluation biologique.....	130
III.5. Conclusion .....	132
<b>Conclusion générale.....</b>	<b>134</b>
<b>Chapitre 4: Partie expérimentale.....</b>	<b>137</b>
I. Matériels.....	139
I.1. Réactifs et solvants.....	139
I.2. Chromatographie.....	140
I.2.1. Chromatographie sur couche mince (CCM) analytique.....	140
I.2.2. Chromatographie sur couche mince préparative .....	140
I.3. Analyses .....	140
I.3.1. Spectroscopie de Résonance Magnétique Nucléaire (RMN) .....	140

I.3.2. Spectroscopie Infrarouge à Transformée de Fourier (FTIR) .....	140
I.3.3. Spectroscopie de Masse .....	140
I.3.4. Spectroscopie Photoélectronique X (XPS) .....	141
I.3.5. Microscopie Electronique à Balayage Environnemental (MEB Environnemental) .....	143
I.3.6. Analyses élémentaires .....	143
II. Tests microbiologiques .....	144
II.1. Souches bactériennes .....	144
II.2. Milieux de culture .....	144
II.3. Méthode d'évaluation de l'activité antibactérienne .....	144
III. Synthèses .....	146
III.1. Elaboration d'un papier bioactif par greffage de biocides naturels .....	146
III.1.1. Monosubstitution de la triazine par le Thymol et le Carvacrol .....	146
III.1.2. Greffage du thymol-triazine et du carvacrol-triazine sur les fibres de pâte à papier....	148
III.2. Elaboration de nouveaux matériaux bioactifs portant un aryltriazole .....	150
III.2.1. Propargylation des fibres de pâte à papier .....	150
III.2.2. Synthèse des dérivés azidoaryles .....	151
III.2.3. Greffage des azido-aryles sur les fibres de pâte à papier propargylées .....	153
<b>PUBLICATIONS SCIENTIFIQUES</b> .....	157

## Table des figures :

Figure 1 : Exemple d'une structure bactérienne .....	5
Figure 2 : Différentes formes des bactéries .....	6
Figure 3 : Structures de la paroi chez les bactéries Gram négatif et Gram positif.....	6
Figure 4 : Courbe de la croissance bactérienne.....	8
Figure 5: Modèle représentant les étapes de la formation d'un biofilm bactérien .....	11
Figure 6: Structure du triclosan.....	16
Figure 7: Schéma de couplage de la tétracycline à une surface de titane .....	16
Figure 8: Structure de deux exemples de polymères biocides.....	19
Figure 9: Structure du chitosan protoné.....	19
Figure 10: Concept des surfaces photobactéricides .....	21
Figure 11: Structure du coton photo bactéricide.....	21
Figure 12: Structure des nanocristaux de cellulose photobactéricides.....	22
Figure 13: Structure des phtalocyanines incorporées dans le polystyrène.....	23
Figure 14: Structure de la phtalocyanine (a) et de la porphyrine (b) incorporées dans le polyuréthane..	23
Figure 15: Goutte d'eau posée sur une surface super hydrophobe (A), hydrophobe (B) et hydrophile (C) .....	24
Figure 16: Gouttes d'eau sur une feuille de lotus .....	24
Figure 17: La surface superhydrophobe élaborée .....	25
Figure 18: Film antibactérien élaboré par incorporation des nanoparticules de silice et de polyéthylémine ramifié.....	26
Figure 19: Propriétés antiadhésives du matériau BPEI/ SiSQ .....	26
Figure 20: Greffage de polyéthylène glycol (PEG) sur une surface de polyuréthane (PU) en utilisant l'hexaméthylène diisocyanate (HDI) comme agent de couplage.....	27
Figure 21: Matériaux développés par greffage de composé d'huiles essentielles sur les fibres de pâte Kraft .....	28
Figure 22: Matériaux élaborés par greffage de molécules aromatiques sur les fibres de pâte Kraft .....	28
Figure 23: Structure tridimensionnelle d'un matériau lignocellulosique.....	29
Figure 24: De la fibre à la cellulose .....	30
Figure 25: Structure de la cellulose.....	30
Figure 26: Liaisons hydrogène intramoléculaires et intermoléculaires au sein de la cellulose .....	31
Figure 27: Structure des trois principaux constituants de la lignine .....	31
Figure 28: Structure d'un fragment de lignine de bois de résineux selon Alder.....	32
Figure 29: Les principaux constituants des hémicelluloses .....	33
Figure 30: Dépôt couche par couche du chitosan et des nanoparticules d'argents sur des fibres de la pâte Kraft.....	35
Figure 31: Greffage de triclosan sur les fibres de pâte Kraft .....	36
Figure 32: Elaboration de papier filtre photobactéricide .....	37
Figure 33: Papier photobactéricide élaboré .....	38
Figure 34: Différents modes d'action des peptides antimicrobiens .....	42
Figure 35: La ponericine incorporé dans un film multicouche et la structure de Poly ( $\beta$ - amino ester), ponericine G1, sulfate de chondroïtine, acide alginique et sulfate de dextrane .....	43
Figure 36: Schéma de l'immobilisation de peptide Tet213 sur le titane.....	44
Figure 37: Schéma de l'immobilisation de la Magainine II sur les fibres de PLGA .....	44
Figure 38: Greffage de la Magainine I sur une surface d'or .....	45
Figure 39: Greffage de la DNase sur une surface de titane .....	46
Figure 40: Structure des composés impliqués dans les activités antibactériennes des huiles essentielles	48

Figure 41: Structure de terpinène-4-ol (a) et de 1,8-cinéole (b) .....	49
Figure 42: Structure du polybutyrate adipate téréphtalate (PBAT) .....	49
Figure 43: Greffage du menthol sur la surface de nanodiamant .....	50
Figure 44: Schéma générale dU greffage de composés d'huiles essentielles sur une surface de silice, A : greffage du carvacrol ; B : greffage de la vanilline.....	51
Figure 45: Greffage d'eugénol sur les fibres de coco .....	52
Figure 46: Schéma de greffage de composés d'huiles essentielles sur les fibres de pâte Kraft.....	54
Figure 47: Réactivité thermo-dépendante du chlorure cyanurique .....	55
Figure 48: Schéma de synthèse du thymol-triazine .....	55
Figure 49: Spectre IR du thymol et du Thymol-Triazine.....	57
Figure 50: Schéma de synthèse du carvacrol-triazine.....	57
Figure 51: Schéma de greffage du thymol-triazine sur les fibres de la pâte kraft.....	59
Figure 52: Spectre IR de la PK greffée par le thymol-triazine .....	60
Figure 53: Spectre XPS de la pâte Kraft greffée par le thymol-triazine .....	60
Figure 54: Greffage du carvacrol-triazine sur la pâte Kraft.....	61
Figure 55: Spectre IR de la pâte Kraft greffée par le carvacrol-triazine .....	62
Figure 56: Spectre XPS de la pâte Kraft greffée par le carvacrol-triazine.....	62
Figure 57: Spectre IR du matériau PK-Triazine-Carvacrol à T.A et à 50 °C .....	63
Figure 58: Greffage du chlorure cyanurique sur la pâte kraft.....	64
Figure 59: Spectre IR de la pâte Kraft greffée par la triazine .....	65
Figure 60: Schéma de la substitution d'un chlore du noyau triazine par l'hydroxyde.....	65
Figure 61: Evaluation de la zone d'inhibition, a: matériaux greffés; b: composés d'huiles essentielles libres déposés sur les fibres de pâte kraft. i: PK; ii: Thymol libre déposé sur la pâte kraft; iii: Carvacrol libre déposé sur la pâte kraft .....	67
Figure 62: Activité antibactérienne des matériaux « PK-Triazine-Composé d'huile essentielle » contre <i>E. coli</i> et <i>S. aureus</i> .....	68
Figure 63: Analyses par MEB environnemental de <i>E. coli</i> après 24h de contact avec la pâte kraft non modifiée et avec le matériau PK-Triazine-Thymol.....	70
Figure 64: Structure de la thymoquinone.....	71
Figure 65: Images MEB de <i>S. aureus</i> non traitée (a), <i>S. aureus</i> exposée à la thymoquinone à une concentration égale à la CMI (b), <i>S. aureus</i> exposée à la thymoquinone à une concentration égale à 2xCMI (c), <i>E. coli</i> non traitée (d), <i>E. coli</i> exposée à la thymoquinone à une concentration égale à la CMI (e), <i>E.coli</i> exposée à la thymoquinone à une concentration égale à 2xCMI (f).....	71
Figure 66: Comparaison de l'activité antibactérienne des matériaux PK-Triazine-Thymol et PK-Triazine-Carvacrol avec les mélanges 1,2 et 3 contre <i>E. coli</i> .....	73
Figure 67: Comparaison de l'activité antibactérienne des matériaux PK-Triazine-Thymol et PK-Triazine-Carvacrol avec les mélanges 1,2 et 3 contre <i>S. aureus</i> .....	73
Figure 68: Activité antibactérienne des différents matériaux sur un mélange de <i>E. coli</i> et <i>S. aureus</i> .....	75
Figure 69: Fibres de pâte thermomécanique non modifiées; .....	77
b: Fibres de pâte thermomécanique greffées avec le Thymol-Triazine .....	77
Figure 70: Spectre IR de la pâte thermomécanique et du matériau PTM-Triazine-Thymol.....	77
Figure 71: Activité antibactérienne des matériaux « PTM-Composé d'huile essentielle » contre <i>E. coli</i> et <i>S. aureus</i> .....	80
Figure 72: Comparaison de l'activité antibactérienne des matériaux à base de PK et ceux à base de PTM contre <i>E. coli</i> et <i>S. aureus</i> .....	81
Figure 73: Activité antibactérienne des mélanges de matériaux PTM-Triazine-Thymol et PTM-Triazine-Carvacrol contre <i>E. coli</i> et <i>S. aureus</i> .....	82

Figure 74: Comparaison de l'activité antibactérienne des différents mélanges à base de PK et ceux à base de PTM contre <i>E. coli</i> et <i>S. aureus</i> .....	83
Figure 75: Structure de 1,2,3-triazole et 1,2,4-triazole .....	87
Figure 76: Structure de fluconazole .....	88
Figure 77: Structure de l'itraconazole.....	88
Figure 78: Structure de la ribavirine et du rizatriptane .....	89
Figure 79: Structure du N-acryloyl glycinamide et de 1-vinyl-1,2,4-triazole.....	89
Figure 80: Exemple de molécules bioactives à base de 1,2,3-triazole.....	90
Figure 81: Réaction de cycloaddition azoture/alcyne de Huisguen conduisant à deux triazoles isomères .....	90
Figure 82: Mécanisme de cycloaddition 1,3-dipolaire azoture/alcyne catalysée par le cuivre.....	91
Figure 83: Structure du tazobactame .....	92
Figure 84: Structure du ciprofloxacine (a), du norfloxacine (b) et de l'acide pipemidique (c) .....	93
Figure 85: Structure de base des quinolones.....	93
Figure 86: Schéma de couplage de différentes molécules azidées aux antibiotiques; 1: couplage des acides aminés; 2: couplage des peptides; 3: couplage d'aryles .....	94
Figure 87: Structure de la chalcone et de la flavone .....	94
Figure 88: Molécules possédant les meilleures activités antibactériennes .....	95
Figure 89: Structure de métronidazole.....	96
Figure 90: Schéma de synthèse des dérivés de métronidazole .....	96
Figure 91: Schéma de synthèse des dérivés 1,2,3-triazolés de l'isoniazide.....	97
Figure 92: Structure de la coumarine .....	98
Figure 93: Schéma de synthèse de dérivés 1,2,3-triazolés de la coumarine; 1: Bis-coumarinyl-triazole; 2: Mono-coumarinyl-triazole .....	98
Figure 94: Dérivés 1,2,3-triazolés de chitosan.....	99
Figure 95: Dérivés de chitosan contenant du triazole substitué par des alcools .....	99
Figure 96: Différents dérivés 1,2,3-triazolés de saccharose .....	100
Figure 97: Différents dérivés 1,2,3-triazolés de D-Glucose .....	101
Figure 98: Différents dérivés 1,2,3-triazolés d'amidon .....	102
Figure 99: Schéma général de synthèse de matériaux 1,2,3-triazolés.....	103
Figure 100: Schéma de synthèse des azido-aryles .....	103
Figure 101: Spectre IR de l'azidobenzène .....	104
Figure 102: Spectre IR de la pâte Kraft non modifiée et la pâte kraft propargylée .....	105
Figure 103: Spectre XPS de la pâte kraft propargylée.....	106
Figure 104: Schéma de greffage des azido-aryles sur la pâte kraft propargylée.....	107
Figure 105: Spectre IR de la pâte Kraft propargylée et du matériau portant le substituant éthoxycarbonyle (R'=COOEt).....	108
Figure 106: Spectre XPS du matériau portant le substituant hydroxyle (R'= OH).....	108
Figure 107: Activité antibactérienne des matériaux élaborés contre <i>E. coli</i> à t <sub>0</sub> et t <sub>24</sub> .....	110
Figure 108: Activité antibactérienne des matériaux élaborés contre <i>S. aureus</i> à t <sub>0</sub> et t <sub>24</sub> .....	110
Figure 109: Croissance bactérienne de <i>E. coli</i> en présence de la pâte kraft, de la pâte kraft propargylée et des différents matériaux élaborés de t=48h à t=7 j .....	112
Figure 110: Croissance bactérienne de <i>S. aureus</i> en présence de la pâte kraft, de la pâte kraft propargylée et des différents matériaux élaborés de t=48h à t=7 j .....	113
Figure 111: Les différents dérivés triazolés synthétisés .....	114
Figure 112: Activité antibactérienne des mélanges contre <i>E. coli</i> .....	116
Figure 113: Résultats détaillés de l'activité des mélanges de matériaux triazolés contre <i>E. coli</i> .....	117
Figure 114: Activité antibactérienne des mélanges contre <i>S. aureus</i> .....	117

Figure 115: Résultats détaillés de l'activité des mélanges de matériaux triazolés contre <i>S. aureus</i> .....	118
Figure 116: Croissance bactérienne de <i>E. coli</i> en présence de différents mélanges de matériaux triazolés de t=48h à t=7j .....	119
Figure 117: Croissance bactérienne de <i>S. aureus</i> en présence de différents mélanges de matériaux triazolés de t=48h à t=7j .....	120
Figure 118: Activité antibactérienne des différents matériaux (A, B, C, D, E et F) sur un mélange de <i>E. coli</i> et <i>S. aureus</i> .....	121
Figure 119: Spectre IR de la pâte thermomécanique non modifiée (PTM) et propargylée (PTM PROP) après 2h, 4h, 6h, 24h et 4j de réaction.....	124
Figure 120: Spectre IR de la pâte thermomécanique propargylée après 24h et les matériaux portant le substituant hydroxyéthyle obtenus par greffage sur la pâte thermomécanique propargylée après 2h, 4h, 6h, 24h et 4j de réaction.....	125
Figure 121: Spectre IR de la pâte thermomécanique propargylée après 24h et les matériaux portant le substituant éthoxycarbonyle obtenus par greffage sur la pâte thermomécanique propargylée après 2h, 4h, 6h, 24h et 4j de réaction.....	126
Figure 122: Activité antibactérienne contre <i>E. coli</i> de la pâte thermomécanique (PTM) et des matériaux portant le substituant hydroxyéthyle obtenus par greffage sur la pâte thermomécanique propargylée pendant 2h, 4h, 6h, 24h et 4j.....	127
Figure 123: Activité antibactérienne contre <i>S. aureus</i> de la pâte thermomécanique (PTM), les matériaux portant le substituant éthoxycarbonyle obtenus par greffage sur la pâte thermomécanique propargylée pendant 2h, 4h, 6h, 24h et 4j.....	128
Figure 124: Spectre IR de la pâte thermomécanique propargylée après 24h et des matériaux portant les substituants méthoxyle, acétyle et hydroxyméthyle .....	129
Figure 125: Activité antibactérienne de la pâte thermomécanique (PTM) et des différents matériaux triazolés contre <i>E. coli</i> .....	131
Figure 126: Activité antibactérienne de la pâte thermomécanique (PTM) et des différents matériaux triazolés contre <i>S. aureus</i> .....	131
Figure 127: Comparaison de l'activité antibactérienne entre les matériaux triazolés portant les substituant hydroxyméthyle et hydroxyéthyle obtenus par greffage sur la pâte Kraft et sur la pâte thermomécanique contre de <i>E.coli</i> .....	128
Figure 128: Comparaison de l'activité antibactérienne entre les matériaux triazolés portant les substituants méthoxyle, acétyle et éthoxycarbonyle obtenus par greffage sur la pâte Kraft et sur la pâte thermomécanique contre de <i>S. aureus</i> .....	133

## Tables des abréviations

<b>AA:</b> acide aminé	<b>PAM:</b> Peptide Antimicrobien
<b>ATP:</b> Adénosine Triphosphate	<b>PBAT:</b> Polybutyrate adipate téréphtalate
<b>CCM:</b> Chromatographie sur Couche Mince	<b>PCL:</b> Polycaprolactone
<b>CHE:</b> Composés d'Huiles Essentielles	<b>PE:</b> Polyéthylène
<b>CMI:</b> Concentration Minimale Inhibitrice	<b>PEG:</b> Polyéthylène Glycol
<b>Coll:</b> Collaborateurs	<b>PEI:</b> Polyéthylénimine
<b>CuAAC:</b> Cu(I)-catalyzed Azide Alkyne Cycoaddition	<b>PK:</b> Pâte Kraft
<b>DIPEA:</b> N,N-Diisopropyléthylamine	<b>PLGA:</b> Poly Lactic- <i>co</i> -Glycolic Acid
<b>DMF:</b> Diméthylformamide	<b>PP:</b> Polypropylène
<b>DMSO:</b> Diméthyl Sulfoxyde	<b>ppm:</b> Partie par million
<b>DS:</b> Degré de Substituant	<b>PTM:</b> Pâte thermomécanique
<b>Eq.:</b> Equivalent	<b>PU:</b> Polyuréthane
<b>eV:</b> électron-Volt	<b>RMN:</b> Résonance Magnétique Nucléaire
<b>HDI:</b> HexaméthylèneDiisocyanate	<b>SARM:</b> <i>Staphylococcus aureus</i> , résistante à la méticilline
<b>HE:</b> Huile Essentielle	<b>SASM:</b> <i>Staphylococcus aureus</i> sensible à la méticilline
<b>InVs:</b> Institut nationale de Veille sanitaire	<b>SERM:</b> <i>Staphylococcus epidermis</i> résistante à la méticilline
<b>IR:</b> Infrarouge	<b>SQ:</b> Silsesquioxane
<b>Mag II:</b> Magainine II	<b>T.A:</b> Température Ambiante
<b>MEB:</b> Microscope Electronique à Balayage	<b>THF:</b> Tétrahydrofurane
<b>MET:</b> Microscope Electronique à Transmittance	<b>TS:</b> Trypticase Soja
<b>NaAsc:</b> Ascorbate de Sodium	<b>UAG:</b> Unité Anhydroglucose
<b>ND:</b> Nanodiamant	<b>UFC:</b> Unité Formant Colonie
<b>PACT:</b> Photodynamic Antimicrobial Chemotherapy	<b>XPS:</b> X-ray Photoelectron Spectroscopy



## INTRODUCTION GENERALE

La peau et les muqueuses respiratoires et digestives sont des barrières naturelles efficaces contre la pénétration des micro-organismes pathogènes dans le corps humain. Dès qu'un agent virulent arrive à franchir ces barrières, il se multiplie et provoque des maladies infectieuses. Ces maladies sont un problème majeur de santé publique et la lutte contre celles-ci est l'une des grandes aventures scientifiques et sociales depuis la révolution Pasteurienne en 1870.

Le 20<sup>ème</sup> siècle a été marqué par la découverte des médicaments capables d'éliminer les microorganismes responsables de dizaines de milliers de morts chaque année. En revanche, la diminution de la sensibilité de la plupart des agents infectieux aux antimicrobiens ne cesse de se développer et touche notamment les bactéries. Capables de se multiplier rapidement, les bactéries sont très abondantes dans l'environnement, dans les aliments et sur les êtres vivants.

Le risque d'être contaminé augmente, lorsque les concentrations de certaines espèces bactériennes deviennent anormalement élevées, en particulier dans des lieux soumis à des règles sanitaires strictes comme le milieu hospitalier, l'industrie agroalimentaire ou les stations de traitement des eaux. Cette contamination consiste en l'adhésion de bactéries pathogènes ou opportunistes sur une surface menant à la formation de biofilms. Ces derniers contribuent à l'émergence de résistances de certaines souches bactériennes aux traitements antimicrobiens conventionnels.

Afin de répondre au mieux à cette problématique, l'élaboration de surfaces antibactériennes s'avère être une stratégie efficace, pour empêcher l'adhésion des bactéries ou inhiber leur croissance.

L'utilisation de fibres lignocellulosiques de la pâte à papier comme support pour le dépôt ou le greffage de composés antibactériens, est au centre de plusieurs travaux de recherche. Ces fibres sont très abondantes, faciles à modifier chimiquement et adaptées à plusieurs utilisations dans différents domaines, comme l'impression, l'emballage, la peinture, le textile, l'hygiène, etc.... A ces avantages, s'ajoute la demande des industries papetières pour trouver de nouveaux débouchés à leur production, car elles souffrent depuis quelques années d'une crise importante due au développement des réseaux de communication, d'internet, de l'électronique et du numérique.

C'est dans cette optique de valorisation des fibres de pâte à papier, et de développement de supports antibactériens que s'inscrivent les travaux de recherche de la présente thèse réalisée

à l'Université de Limoges. L'objectif de ces travaux est le développement de nouveaux matériaux antibactériens à base de fibres de pâte à papier. Pour ce faire, nous avons développé deux types de matériaux, l'un en fixant sur les fibres de pâte à papier, des composés d'huiles essentielles, connus pour leur activité antibactérienne (le thymol et le carvacrol) et l'autre en fixant des molécules aromatiques, qui n'acquièrent leur potentiel antimicrobien qu'une fois le greffage covalent réalisé et un lien triazole formé.

# **Chapitre 1**

## **Etat de l'art**

### **Les bactéries, les contaminations bactériennes et les surfaces antibactériennes existantes**



# I. Les bactéries, les infections bactériennes et la contamination de surface

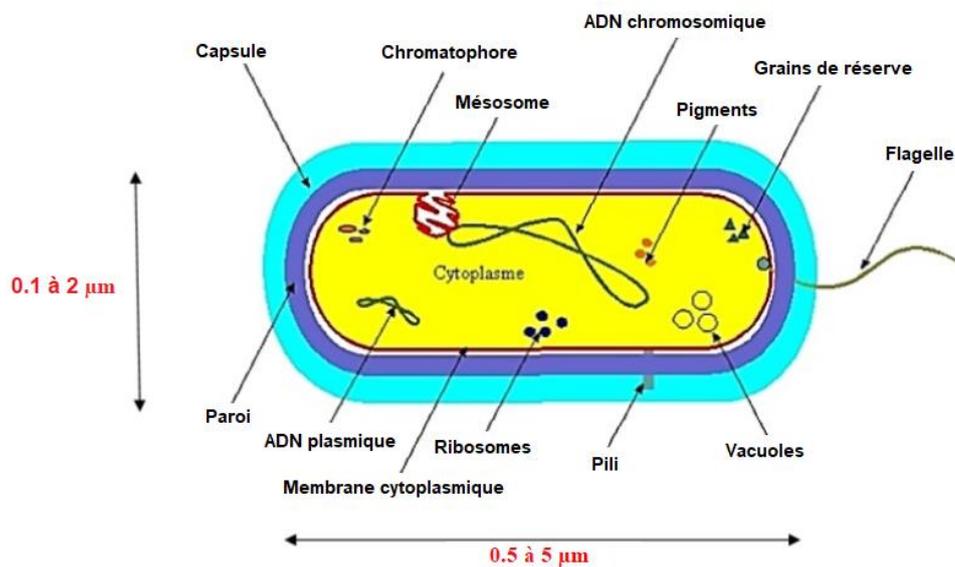
Comme nous l'avons précisé dans l'introduction générale, pour faire face aux problèmes de biocontamination des surfaces et aux résistances bactériennes, l'élaboration de matériaux antibactériens s'est révélée être une stratégie intéressante.

Avant de voir l'état de l'art de la conception de ces matériaux et les travaux réalisés au cours de cette thèse, une présentation est dédiée aux généralités sur les bactéries, les maladies infectieuses, et la contamination des surfaces.

## I.1. Les bactéries

### I.1.1. Structure des bactéries

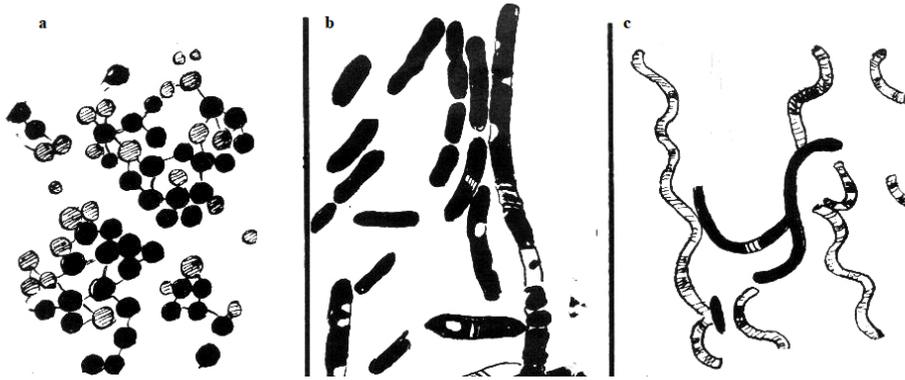
Les bactéries sont parmi les plus anciens et les plus abondants êtres vivants sur terre. Ce sont des micro-organismes unicellulaires procaryotes. Les cellules bactériennes sont entourées par une membrane plasmique doublée d'une paroi. A l'intérieur de la cellule, se trouve le matériel génétique, composé d'un chromosome bactérien circulaire (**Figure 1**).



**Figure 1 : Exemple d'une structure bactérienne [1]**

La plupart des bactéries sont soit sphérique (en forme de coque, **Figure 2.a**), comme *Staphylococcus aureus*, soit allongée (en forme de bacille, **Figure 2.b**), comme *Escherichia coli*. Il existe également des bactéries spiralées du genre tréponème (**Figure 2.c**).

[1] <http://www.microbiologie-medicale.fr/microbiologie-generale/structure-bacterienne.html>

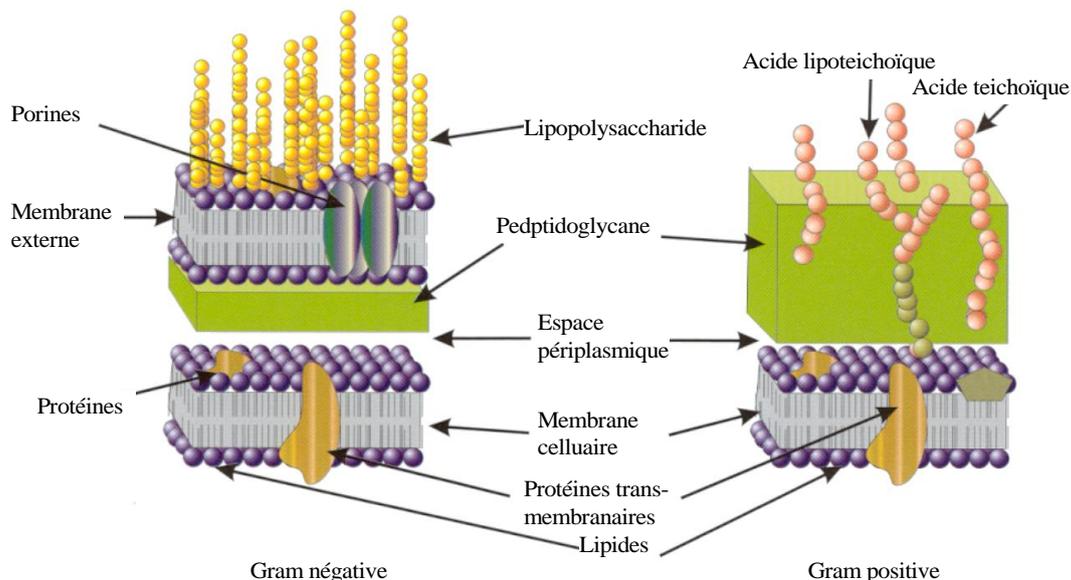


**Figure 2 : Différentes formes des bactéries**

### I.1.1.1. La paroi

Un élément important de la structure des bactéries est leur paroi cellulaire. C'est une structure rigide qui est à l'origine de la forme de la cellule bactérienne et la protège des variations de pression osmotique. La coloration de Gram permet de les diviser en deux groupes bactériens, en se basant sur la différence de la structure et de la composition chimique de cette paroi. On distingue (**Figure 3**) :

- Les bactéries Gram négatif (**Gram -**) : Leur paroi possède un peptidoglycane fin localisé en-dessous d'une bicouche phospholipidique. (Exemple : *Escherichia coli*).
- Les bactéries Gram positif (**Gram +**) : Leur paroi est composée essentiellement d'un peptidoglycane ou muréine épais. (Exemple : *Staphylococcus aureus*)



**Figure 3 : Structures de la paroi chez les bactéries Gram négatif et Gram positif [2]**

[2] R. M. Maier, I. I. Pepper, I. L. Pepper, et al . Environmental Microbiology. 2<sup>nd</sup> edition chapter Academic Press, 1999.

Il existe des bactéries telles que les mycobactéries qui répondent très mal à la coloration de Gram, leur paroi est riche en lipides (environ 23% pour 2% chez les autres bactéries), elle forme une véritable enveloppe protectrice rendant difficile la pénétration des colorants [3].

#### **I.1.1.2. Les flagelles et les pili**

Certaines bactéries sont mobiles grâce à un ou plusieurs flagelles. Leur longueur est variable et peut atteindre jusqu'à dix fois le diamètre de la cellule bactérienne. Elles permettent à la bactérie de se déplacer vers des milieux où les conditions de croissance sont plus favorables.

Les pili sont des excroissances de la membrane de certains genres de bactéries, comme *P. aeruginosa*, *Neisseria gonorrhoeae* et certaines souches d'*E. coli*, qui leur permettent de se mouvoir et d'adhérer à un substrat [4]. Il existe également des pili dont le rôle est le transfert d'information génétique au cours de la conjugaison.

#### **I.1.2. Les différents modes de vie des bactéries.**

Selon les conditions environnementales, les bactéries peuvent être présentes dans deux états, soit à l'état végétatif, durant lequel la bactérie peut se multiplier, ou à l'état de repos, caractérisé par un minimum d'échanges avec le milieu extérieur assurant la survie bactérienne, sans multiplication.

#### **I.1.3. La croissance bactérienne**

La croissance chez les bactéries peut se traduire par une augmentation du volume de la cellule bactérienne, mais elle conduit le plus souvent à une multiplication de cellules.

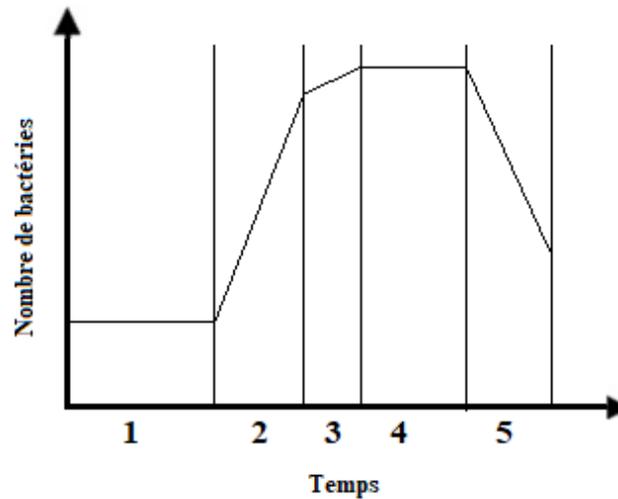
Les bactéries se multiplient par fusion binaire d'une cellule en phase de croissance active, avec partage équivalent du matériel génétique. Ce qui donne naissance à deux cellules filles identiques à la cellule mère. Au cours de la croissance, il se produit, d'une part, un appauvrissement du milieu de culture en nutriments et, d'autre part, un enrichissement en sous-produits du métabolisme. Il existe cinq phases dont l'ensemble constitue la courbe de croissance [5] (**Figure 4**).

---

[3] <https://www.biomnis.com/referentiel/liendoc/precis/MYCOBACTERIES.pdf>

[4] T. Proft and E. N. Baker. Pili in Gram-negative and Gram-positive bacteria-structure, assembly and their role in disease. *Cell. Mol. Life Sci.* 66, **2009**, 613-35.

[5] Université Médicale Virtuelle Francophone, Croissance des bactéries, Collégiale des enseignants de bactériologie-virologie-hygiène. **2014**. <http://campus.cerimes.fr/microbiologie/poly-microbiologie.pdf>.



**Figure 4 : Courbe de la croissance bactérienne [5]**

- **La Phase de latence (1) :** La durée de cette phase dépend de l'âge des bactéries et de la composition du milieu. C'est le temps nécessaire à la bactérie pour s'adapter au nouveau substrat. Durant cette phase, le taux de croissance correspondant au nombre de division par unité de temps, est nul.

- **La Phase exponentielle de croissance (2) :** Cette phase dure tant que la vitesse de croissance est constante. Le taux de croissance atteint son maximum.

- **Le début de la phase stationnaire (3) :** Elle correspond au début de l'épuisement des nutriments du milieu et de l'accumulation des déchets. La vitesse de croissance diminue.

- **La Phase stationnaire (4) :** Les bactéries qui se multiplient compensent celles qui meurent, et synthétisent des protéines de manque qui rendent la cellule plus résistante aux dommages. Le taux de croissance devient nul.

- **La Phase de déclin (5) :** Les ressources nutritives sont épuisées, les métabolites toxiques s'accumulent et le nombre d'organismes viables diminue. Le taux de croissance est négatif.

En situation de stress ou de carence, les bactéries peuvent adopter deux types de stratégie, soit elles passent à une forme de résistance métaboliquement inactive. C'est le cas des bactéries du genre *Bacillus* qui forme des spores, soit elles développent des systèmes de régulation en adaptant leur métabolisme pour faire un maximum d'économie. C'est le cas d'*E. coli*.

## I.2. Les infections bactériennes

Chez l'Homme, les cellules bactériennes sont dix fois plus nombreuses que les cellules humaines [6]. La majorité d'entre elles sont inoffensives, voire même bénéfiques pour le corps humain, comme certaines bactéries, appelées commensales, qui sont présentes en grande quantité dans le tube digestif et qui aident à la digestion [7]. D'autres bactéries dites probiotiques peuvent stimuler le système immunitaire ou aider à l'absorption de certains oligo-éléments comme le fer. On retrouve les bactéries probiotiques dans des produits alimentaires comme les yaourts [8].

Cependant, il existe des espèces pathogènes à l'origine de nombreuses maladies infectieuses. Elles sont soit opportunistes : habituellement inoffensives, elles deviennent pathogènes chez les personnes aux défenses immunitaires altérées (Exemple: *Pseudomonas aeruginosa* [9]), soit pathogènes stricts, quel que soit la personne infectée, comme *Salmonella typhimurium* [10].

Un très grand nombre d'infections bactériennes peuvent affecter l'être humain. En fonction du type de bactérie, telle ou telle partie de l'organisme sera infectée, par exemple la gorge (angine bactérienne), la vessie (cystite) ou encore le cœur (endocardite bactérienne). Si certaines infections sont bénignes, d'autres au contraire peuvent être mortelles.

Les risques d'être contaminé et de contracter une infection augmentent, lorsque les bactéries sont introduites dans des sites qui doivent être normalement aseptiques, comme par exemple le milieu hospitalier, à l'origine des infections nosocomiales [11].

Une infection nosocomiale fait partie des infections associées aux soins, contractée au cours d'une hospitalisation. D'après une étude de l'institut de veille sanitaire (InVs) datant de 2015, un patient hospitalisé sur dix contracte une infection dans l'établissement où il est soigné.

---

[6] P. Lepage. Le microbiote intestinal humain : interactions avec l'hôte et dysfonctions. *NUTRITION, Microbiote intestinal humain*. Feuillet de Biologie/N° 323 – **2015**.

[7] H. J. Flint, K. P. Scott, S. H. Duncan, et al. Microbial degradation of complex carbohydrates in the gut. *Gut. Microbes*. 3, **2012**, 289-306.

[8] W. Smoragiewicz, M. Bielecka, A. Babuchawowski, et al. Les probiotiques. *Can. J. Microbiol.* 39, **1993**, 1089-1095.

[9] N. Floret, X. Bertrand, M. Thouverez, et al. Nosocomial infections caused by *Pseudomonas aeruginosa*: Exogenous or endogenous origin of this bacterium? *Pathol. Biol (Paris)*. 57, **2009**, 9-12.

[10] C. Poppe, N. Smart, R. Khakhria, et al. Salmonella typhimurium DT104: A virulent and drug-resistant pathogen. *Can. Vet. J.* 39, **1998**, 559–565.

[11] C. B. Buisso and E. Girou. Les infections nosocomiales : bilan et perspectives. *Med. Sci.* 16, **2000**, 892-9.

Trois bactéries représentent la moitié des germes isolés dans le cadre d'infections nosocomiales [12] :

- *Escherichia coli* (26%), qui vit naturellement dans le tractus intestinal
- *Staphylococcus aureus* (16%), présent dans la muqueuse du nez et de la gorge
- *Pseudomonas aeruginosa* (8,4%), qui se développe dans les sols et en milieu humide (robinets, tuyauteries...)

Les contaminations bactériennes de surface présentent également un problème majeur dans les stations de traitement des eaux, les industries agroalimentaires ou pharmaceutique [13, 14]. Les industriels doivent mettre en place des procédures d'hygiène fréquentes, polluantes, très consommatrices d'eau et de détergents, et qui entraîne des périodes d'interruption de la production. Dans le cas d'industrie électronique, la présence des bactéries sur un circuit peut entraîner sa coupure ou relier des éléments qui ne devraient pas l'être.

### **I.3. La contamination des surfaces : Formation de biofilms**

Les bactéries ont le pouvoir d'adhérer et de se multiplier sur divers supports inertes (sol, métal, plastique, tissus...). L'adhésion bactérienne sur une surface solide représente la première étape de la formation d'un biofilm. En effet, lorsque les conditions environnementales sont propices, les bactéries attachées à une surface sont organisées en communautés structurées et enrobés dans une matrice d'exopolymères. Cette forme de vie est appelée biofilm [15].

Lorsqu'un matériau est placé dans un environnement humide non stérile, après un temps relativement court, la surface sera contaminée par des composés organiques ou minéraux environnants. Ce mélange organo-minéral, déposé en surface, va former un film primaire ou film conditionnant. Les microorganismes, se déplaçant à proximité de la surface vont alors adhérer à ce film primaire [16]. On parle d'adhésion réversible (**Figure 5:1**). Dans une deuxième étape, les micro-organismes adhérents se multiplient et forment les premières micro-colonies. Ces dernières produisent des substances exopolymériques, essentiellement constituées de polysaccharides et

---

[12] <https://www.inserm.fr/thematiques/immunologie-inflammation-infectiologie-etmicrobiologie/dossiers-dinformation/infections-nosocomiales>.

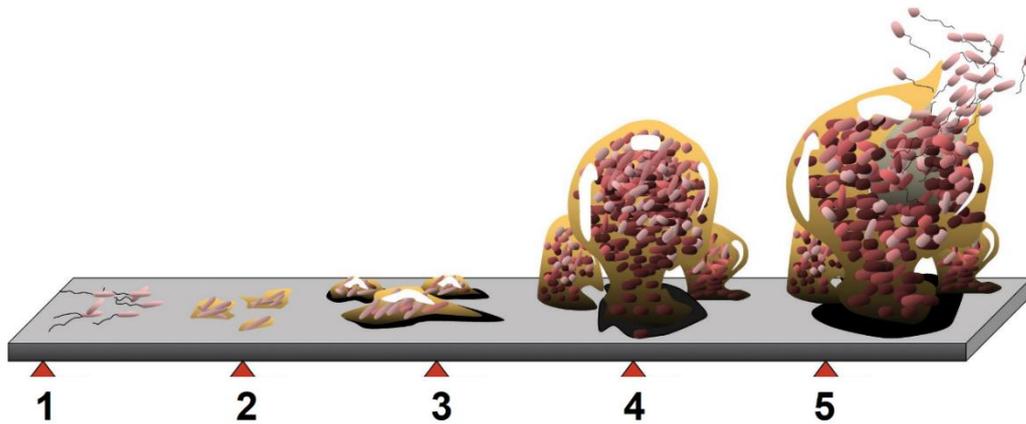
[13] Y. Levi. Inquiétudes sur la présence d'antibiotiques et de bactéries antibiorésistantes dans les eaux. *Environnement, Risques & Santé*. 5, 2006, n°4.

[14] J. C. Panisset, E. Dewailly, H. oucet-Leduc. Contamination alimentaire In : Environnement et santé publique-Fondements et pratiques, pp. 369-395. 2003.

[15] G. O. Toole, H. B. Kaplan, R. Kolter. Biofilm formation as microbial development. *Annu. Rev. Microbiol.* 54, 2000, 49-79.

[16] T. R. Bott. Aspects of biofilm formation and destruction. *Corros. Rev.* 11, 1993,1-24.

de protéines. Ces substances seront les constituants essentiels de la matrice protectrice, il s'agit d'une adhésion irréversible (**Figure 5:2**). L'étape suivante concerne le développement et la maturation du biofilm, il s'accroît jusqu'à devenir macroscopique (**Figure 5:3 et 4**) [17]. La dernière étape est celle de la dispersion. En effet, sous l'effet du vieillissement du biofilm ou de certains stress, les microorganismes peuvent se séparer du biofilm et coloniser d'autres surfaces (**Figure 5:5**).



**Figure 5: Modèle représentant les étapes de la formation d'un biofilm bactérien [18]**

Les biofilms ont suscité un intérêt tout particulier lorsqu'il a été démontré qu'ils étaient impliqués dans près de 60% des infections bactériennes [19]. Ils représentent des réservoirs importants de microorganismes, qui peuvent être véhiculés d'un point à un autre après dissémination. De plus, les bactéries incluses dans les biofilms sont dix à mille fois moins sensibles à la plupart des antibiotiques et autres biocides [20, 21]. Il s'avère donc important de développer de nouvelles stratégies aidant à diminuer la contamination bactérienne et la formation de biofilms. Plusieurs recherches axées sur l'élaboration de surfaces antibactériennes se sont révélées efficaces.

Avant de présenter les différents types de surfaces antibactériennes existantes, nous nous intéressons à l'étude des facteurs influençant l'adhésion des bactéries aux surfaces. En effet, la compréhension des paramètres d'adhésion est essentielle pour envisager des stratégies de lutte antibactérienne.

[17] F. J. P. Elortondo, J. Salmerón, M. Albisu, et al. Biofilms in the food industry. *Food Sci. Technol. Int.* 5, **1999**, 25-30.

[18] D. Monroe. Looking for Chinks in the Armor of Bacterial Biofilms. DOI: 10.1371/journal.pbio.0050307.g001.

[19] K. Lewis. Riddle of Biofilm Resistance. *Antimicrob. Agents Chemother.* 45, **2001**, 999–1007.

[20] P. S. Stewart and J. W. Costerton. Antibiotic resistance of bacteria in biofilms. *Lancet.* 358, **2001**, 135-138.

[21] K. Myszka and K. C. Poznań. Mechanisms Determining Bacterial Biofilm Resistance to Antimicrobial Factors in: *Antimicrobial agents*. Chapitre 10, **2012**. DOI: 10.5772/33048.

### I.3.1. Les facteurs influençant l'adhésion bactérienne

Le processus d'adhésion est un processus très complexe qui résulte de nombreux facteurs, comme les propriétés de surface bactérienne ou certaines caractéristiques de surface du matériau cible. L'environnement influence également cette adhésion [22].

#### I.3.1.1. Les facteurs liés à la bactérie

L'adhésion de bactéries sur une surface dépend de leur composition biochimique ainsi que des propriétés physico-chimiques de leur paroi. L'hydrophobie de surface de la bactérie joue un rôle important dans le processus d'adhésion sur une surface. En général, les bactéries hydrophobes préfèrent les surfaces hydrophobes et les bactéries hydrophiles, les surfaces hydrophiles [23]. Grivet et coll. [24] ont par exemple étudié, l'adhésion de quatre souches du genre *Streptococcus* (*S. mitis*, *S. mutans*, *S. oralis* et *S. sanguinis*), sur des alliages dentaires hydrophobes. La souche la plus hydrophile, *S. mitis*, a présenté le plus faible taux d'adhésion.

Un autre facteur qui peut influencer l'adhésion de la bactérie sur un matériau est la charge de la surface bactérienne. Les bactéries en solution aqueuse sont souvent chargées négativement, en raison de la présence de l'acide téichoïque (ou lipotéichoïque lorsqu'il est présent) riche en groupements phosphates chez les bactéries Gram positif, et de la présence des lipopolysaccharides chez les bactéries Gram négatif. Cette charge varie en fonction des espèces et est influencée par le pH du milieu de culture [25]. Une bactérie avec une charge élevée est hydrophile.

La phase de croissance des bactéries est également un facteur qui peut influencer l'adhésion bactérienne. Walker et coll. [26] ont étudié l'influence de la phase de croissance sur l'adhésion de *E. coli*, sur une surface en quartz. Une adhésion plus élevée a été observée pendant la phase de croissance stationnaire. En effet, les cellules en phase exponentielle ont une distribution de

---

[22] G. Pavon-Djavid, G. Hélyary, V. Mignonney. Biomaterials inhibiting bacterial adhesion and proliferation: a challenge to prevent infection of prosthetic materials. *IRBM*. 26, **2005**, 183-191

[23] M. Katsikogianni and Y. F. Missirlis. Concise review of mechanisms of bacterial adhesion to biomaterials and of techniques used in estimating bacteria-material interactions. *Eur. Cell. Mater.* 7, **2004**, 37-57.

[24] M. Grivet, J. J. Morrier, G. Benay, et al. Effect of hydrophobicity on in vitro streptococcal adhesion to dental alloys. *J. Mater. Sci. Mater. Med.* 11, **2000**, 637-42.

[25] A. T. Poortinga, R. RolfBos, W. Norde, et al. Electric double layer interactions in bacterial adhesion to surface. *Surf. Sci. Rep.* 47, **2002**, 1-32

[26] S. L. Walker, J. E. Hill, J. A. Redman, et al. Influence of Growth Phase on Adhesion Kinetics of *Escherichia coli* D21g. *Appl. Environ. Microbiol.* 71, **2005**, 3093-3099.

charge négative plus uniforme sur la membrane externe, dû à la présence de protéine et de lipopolysaccharides, ce qui entraîne une plus grande répulsion électrostatique et, par conséquent, une faible adhésion au quartz.

### **I.3.1.2. Les facteurs liés à la surface du matériau**

Pour étudier l'adhésion bactérienne sur un matériau, il est important de prendre en compte sa nature chimique, sa géométrie, son hydrophobie, ainsi que la rugosité et la charge de sa surface.

#### **➤ La nature chimique du matériau**

Dans la littérature, des comportements bactériens différents ont été établis selon la nature chimique du matériau et donc de sa surface [27]. Almaguer-Flores et coll. [28] ont étudié l'adhésion de *S. aureus* et *E. coli* sur des surfaces à base de dioxyde de zirconium ( $ZrO_2$ ) et de dioxyde de titane ( $TiO_2$ ). L'adhésion de ces bactéries sur le  $ZrO_2$  a été faible par rapport à l'adhésion sur le  $TiO_2$ . La plus grande quantité de bactéries adhérentes aux surfaces de  $TiO_2$  s'explique par la nature de cette surface. Cette dernière possède des sites de charge positive qui pourraient interagir avec la charge négative de la bactérie.

#### **➤ La géométrie du matériau**

La géométrie du matériau détermine la localisation de l'adhésion bactérienne. Des études ont montré que les bactéries se mettaient préférentiellement dans les régions difficiles d'accès. Mencucci et coll. [29] ont étudié l'adhésion d'une bactérie, *P. aeruginosa*, sur des lentilles intraoculaires acryliques pliées et non pliées. Les résultats de l'étude ont montré que les bactéries adhèrent préférentiellement aux zones irrégulières et aux zones des rayures provoquées par le pliage.

---

[27] G. Speranza, G. Gottardi, C. Pederzoli, et al. Role of chemical interactions in bacterial adhesion to polymer surfaces. *Biomaterials*. 25, **2004**, 2029-37.

[28] A. Almaguer-Flores, P. Silva-Bermudez, R. Galicia, et al. Bacterial adhesion on amorphous and crystalline metal oxide coatings. *Mat. Sci. Eng: C*, 57, **2015**, 88-99.

[29] R. Mencucci, R. Dei, D. Danielli, et al. Folding procedure for acrylic intraocular lenses. *J. Cataract. Refract. Surg.* 30, **2004**, 457-63.

### ➤ **La rugosité de la surface du matériau**

Des études réalisées par Wilson-Nieuwenhuis et coll. [30] sur le polychlorure de vinyle (PVC) ont montré que, plus la surface est rugueuse plus l'adhésion bactérienne est favorisée. En effet, une surface rugueuse augmente la surface de contact entre le matériau et les cellules bactériennes. De plus, les irrégularités du matériau constituent des sites d'implantation bactérienne plus favorables, car moins soumis aux facteurs exogènes tels que les courants de surface (courant d'air, d'eau...) [31].

### **I.3.1.3. Les facteurs liés à l'environnement**

La température et la composition du milieu sont également des facteurs influençant l'adhésion bactérienne [32].

#### ➤ **La température**

L'augmentation de la température influence l'adhésion et la multiplication bactérienne. Fletcher et coll. [33] ont étudié l'effet de la température sur l'adhésion sur le polystyrène, de quatre souches bactériennes, *Pseudomonas fluorescens*, *Enterobacter cloacae*, *Chromobacterium sp* et *Flexibacter sp*. L'adhésion de *P. fluorescens*, *E. cloacae* et *Chromobacterium sp* était maximale entre 20°C et 30°C, tandis que, l'adhésion de *Flexibacter sp* était maximale à 20°C et diminue progressivement avec l'augmentation de la température. Cette augmentation affecte l'efficacité des exopolymères adhésives, sécrétés par les bactéries pour adhérer aux surfaces, en diminuant leur viscosité.

#### ➤ **La composition du milieu**

La présence de molécules organiques comme les protéines, adsorbées au préalable sur une surface, influence l'adhésion des microorganismes. Ils peuvent favoriser ou non cette

---

[30] J. S. T. Wilson-Nieuwenhuis, N. D. Hibbert, C. M. Liauw, et al. Surface modification of platelet concentrate bags to reduce biofilm formation and transfusion sepsis. *Colloids Surf. B Biointerfaces*. 160, **2017**, 126-135.

[31] S. Baillif, D. Hartmann, J. Freney, et al. Intraocular lens and bacterial adhesion: Influence of the environmental factors, the characteristics of the bacteria, and the target material surface. *J. Fr. Ophtalmol.* 33, **2010**, 210-21

[32] V. Roger, G. Fonty, S. Komisarczuk, et al. Effet de quelques facteurs physico-chimiques sur l'adhésion à la cellulose de deux espèces bactériennes cellulolytiques du rumen. *Reprod. Nutr. Dev.* 28, **1988**, 77-78.

[33] S. McEldowney and M. Fletcher. Effect of pH, temperature, and growth conditions on the adhesion of a gliding bacterium and three nongliding bacteria to polystyrene. *Microb. Ecol.* 16, **1988**, 183-195.

adhésion [34]. En effet, ces protéines peuvent servir de nutriments ou de récepteurs pour les bactéries, elles peuvent également limiter l'interaction entre la surface et les cellules bactériennes [35]. Elles peuvent modifier la charge, la rugosité ainsi que l'hydrophobie de la surface.

En conclusion, l'adhésion bactérienne sur une surface est multifactorielle et les mécanismes mis en jeu sont complexes. La compréhension des différents paramètres permet de mettre en place des stratégies pour résoudre les problèmes d'adhésion et de croissance bactérienne.

## **II. Les stratégies de lutte contre les contaminations bactériennes**

Malgré la fixation de consignes sanitaires et de règles d'hygiène dans les milieux publics (désinfection et stérilisation), les matériaux sont sujets à des contaminations conduisant à la formation de biofilms. De nombreux traitements existent déjà, mais l'apparition de résistances bactériennes à certains traitements, a orienté les travaux de recherche vers le développement de matériaux bioactifs comme traitement préventif. Dans cette optique, de nombreux chercheurs ont mis au point des supports antibactériens. L'objectif est de limiter l'adhésion ou la croissance microbienne par modification chimique ou physique des surfaces, grâce au dépôt ou au greffage de molécules biocides. Nous allons décrire quelques surfaces antibactériennes existantes.

### **II.1. Les surfaces biocides**

#### **II.1.1. L'immobilisation des antibiotiques sur support**

Le terme « antibiotique » est utilisé pour parler des médicaments permettant le traitement des infections bactériennes. Un antibiotique est une substance chimique, produite par des microorganismes ou obtenue par synthèse chimique, qui inhibe ou bloque la croissance des bactéries. Dans le premier cas, on parle d'antibiotique bactéricide et dans le second cas d'antibiotique bactériostatique. Un même antibiotique peut être bactériostatique à faible dose et bactéricide à dose plus élevée. L'imprégnation du matériau par des antibiotiques a été la principale stratégie de lutte contre les phénomènes d'infection. Wang et coll. [36] par exemple, ont incorporé dans des particules mésoporeuses de silicium, du Triclosan (5-chloro-2-(2,4-

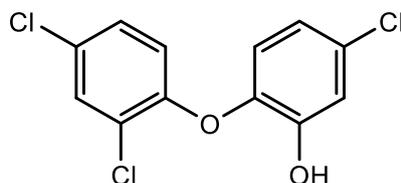
---

[34] H. Tang, A. Wang, X. Liang, et al. Effect of surface proteins on *Staphylococcus Epidermidis* adhesion and colonization on silicone. *Colloids Surf. B : Biointerfaces*. 51, **2006**, 16-24.

[35] Thèse Emilie Bulard, L'adhésion bactérienne sondée à l'échelle moléculaire, Université e paris sud soutenue le 19/10/2012.

[36] M. Wang, J. L. Coffey, K. Dorraj, et al. Sustained Antibacterial Activity from Triclosan-Loaded Nanostructured Mesoporous Silicon. *Mol. Pharm.* 7, **2010**, 2232-2239.

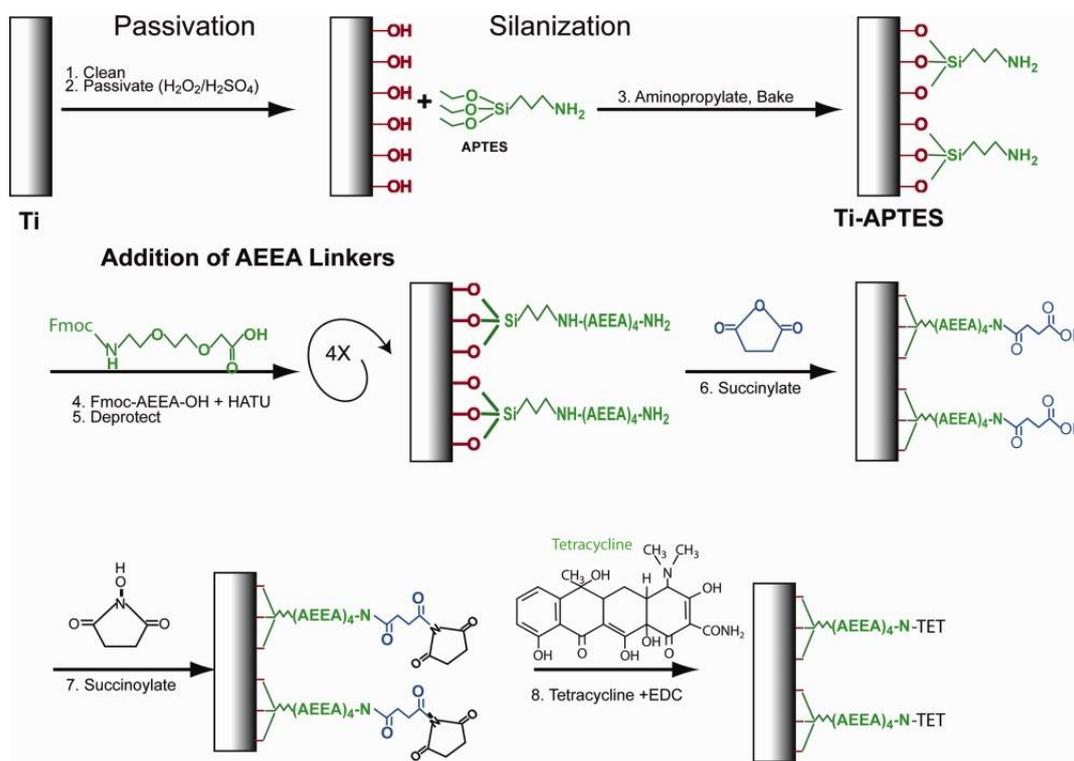
dichlorophenoxy) phénol), agent antimicrobien avec un large spectre d'activité, utilisé dans divers produits de consommation (**Figure 6**).



**Figure 6: Structure du triclosan**

Les résultats des tests antibactériens ont montré que ces particules de silicium constituent un support efficace pour la libération prolongée d'agents antimicrobiens. Les particules mésoporeuses élaborées ont une activité inhibitrice maintenue durant 15 jours contre *S. aureus*.

Par ailleurs, Davidson et coll. [37] ont fixé par liaison covalente sur une surface de titane, la tétracycline, un antibiotique à large spectre d'activité contre des pathogènes à Gram négatif et certains à Gram positif, afin d'empêcher la prolifération bactérienne et la formation de biofilms sur les implants (**Figure 7**).



**Figure 7: Schéma de couplage de la tétracycline à une surface de titane [37]**

[37] H. Davidson, M. Poon, R. Saunders, et al. Tetracycline tethered to titanium inhibits colonization by Gram-negative bacteria. *J. Biomed. Mater. Res. B Appl. Biomater.* 103, 2015, 1381-9.

Le matériau élaboré présentait une activité inhibitrice contre *E. coli*, en empêchant la colonisation de sa surface par les cellules bactériennes.

Cependant, l'efficacité des antibiotiques peut évoluer avec le temps, en fonction de l'apparition de phénomènes de résistance dû à l'utilisation massive et répétée des antibiotiques. Certaines souches bactériennes sont multirésistantes, d'autres sont même résistantes à tous les antibiotiques disponibles, on parle de bactéries toto-résistantes. Ces résistances peuvent s'exprimer au travers de plusieurs mécanismes [38].

- Inactivation enzymatique de l'antibiotique: De nombreuses souches bactériennes peuvent fabriquer un enzyme qui modifie ou clive la molécule d'antibiotique, empêchant la fixation de l'antimicrobien sur sa cible et provoquant une perte d'activité. C'est le principal mécanisme de résistance de certaines bactéries aux bêta-lactames, aux aminoglycosides et aux phénicolés.
- La mutation de la cible de l'antibiotique: chaque antibiotique agit en se fixant sur une cible bactérienne précise. La présence d'une modification de la cible consécutive à une mutation modifie le site de fixation et empêche ainsi la liaison de l'antibiotique. C'est un mécanisme décrit pour les résistances aux pénicillines et aux glycopeptides des bactéries Gram positif.
- La réduction de la perméabilité membranaire: La bactérie ferme les pores par lesquels l'antibiotique pénètre dans la cellule. Cela est dû à des mutations au niveau des gènes codants les porines et qui conduisent à leur perte, ou à la réduction de leur taille ou encore à une diminution de leur expression. C'est le mécanisme décrit pour la résistance aux quinolones, aux bêta-lactames, aux tétracyclines et au chloramphénicol de *E. coli*.
- L'efflux des antibiotiques: Les bactéries sont capables d'éliminer les antibiotiques par efflux hors de la cellule. La résistance provient de la réduction de concentration en antimicrobien dans le cytoplasme de la bactérie, ce qui prévient et limite l'accès de l'antibiotique à sa cible. C'est l'un des principaux mécanismes de résistance de *S. aureus*,
- Piégeage de l'antibiotique: Les bactéries peuvent piéger un antibiotique en augmentant la production de sa cible ou en produisant une autre molécule possédant une affinité pour ce dernier. Il en résulte une diminution de l'antibiotique à l'état libre au niveau de la cible. Ce mécanisme est impliqué dans la résistance aux glycopeptides de certaines souches de *S. aureus*, et à la résistance à la tobramycine de *E. coli*.

---

[38] A. Muylaert and J. G. Mainil. Résistances bactériennes aux antibiotiques les mécanismes et leur «contagiosité». *Ann. Méd. Vét.* 156, 2012, 109- 123.

Certaines bactéries sont naturellement résistantes à des antibiotiques. On parle de résistance naturelle. Leur patrimoine génétique les rend insensible à un certain nombre d'agents actifs. C'est par exemple le cas de *E. coli* vis-à-vis de la vancomycine ou encore de *P. aeruginosa* face à l'ampicilline. Le phénomène de résistance acquise est plus préoccupant que la résistance naturelle. En effet, quand les bactéries sont soumises à des traitements antibiotiques, elles finissent par s'adapter et développer des résistances contre les médicaments auxquelles elles étaient auparavant sensibles. Comme par exemple le cas de *E. coli* qui a développé une résistance acquise aux pénicillines, par la production d'un enzyme, la pénicillinase, qui hydrolysent les antibiotiques appartenant à cette famille [39].

Il existe également des bactéries persistantes qui peuvent survivre sans se diviser, les antibiotiques ciblant en général une étape du métabolisme, ont alors peu d'effet.

Afin d'éviter ces phénomènes de résistance aux antibiotiques, d'autres surfaces antibactériennes ont été développées en utilisant d'autres types d'agents actifs.

### **II.1.2. Le revêtement de surfaces par des éléments métalliques**

Depuis l'Antiquité, certains métaux sont connus pour leurs propriétés antibactériennes. Aujourd'hui, plusieurs matériaux à base de métaux sont mis en place, et leur activité antibactérienne est très élevée sur un large spectre de bactéries. En effet, des matériaux bactéricides par dépôt de nanoparticules d'argent sur le nylon ont été développés par Shi et coll. [40]. Le polymère obtenu permet une inhibition de 99,9 % de *E. coli* et de plus de 99.99% de *B. cereus* sachant que le nylon non modifié ne présente aucune activité antibactérienne.

Par ailleurs, Turalija et coll. [41] ont déposé des particules d'oxyde de cuivre sur du tissu à 90% de polyester et 10% de polyamide, pour apporter des propriétés antibactériennes au textile. Le matériau élaboré inhibe 100% de *S. aureus* et 84% de *K. pneumoniae*.

Un autre matériau a été élaboré par Shaheen et coll. [42] par dépôt de nanoparticules d'oxyde de zinc sur du coton. Le tissu élaboré permet une inhibition de 94% d'*E. coli* et 92% de *S. aureus*.

---

[39] L.G. Burman, K. Nordstrom, H. G. Boman. Resistance of Escherichia coli to Penicillins. *J. bacteriol.* 96, **1968**, 438-446.

[40] Q. Shi, N. Vitichuli, J. Nowak et al. One-step synthesis of silver nanoparticle-filled nylon 6 nanofibers and their antibacterial properties. *J. Mater. Chem.* 21, **2011**, 10330- 10335.

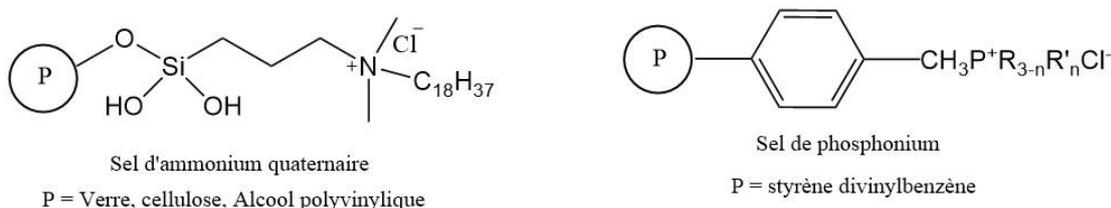
[41] M. Turalija, P. Merschak, B. Redl, et al. Copper (I) oxide microparticles – synthesis and antimicrobial finishing of textiles. *J. Mater. Chem. B*, 3, **2015**, 5886-5892.

[42] T. I. Shaheen, M. E. El-Naggar, A. M. Abdelgawad, et al. Durable antibacterial and UV protections of in situ synthesized zinc oxide nanoparticles onto cotton fabrics. *Int. J. Biol. Macromol.* 83, **2016**, 426-32.

Cependant, la toxicité des métaux qui présentent des propriétés bactéricides comme le cuivre, le zinc ou l'argent limite leur utilisation pour l'élaboration de supports antibactériens [43]. Certains métaux sont également très peu utilisés malgré leur effet bactéricide, comme l'or et le platine en raison de leur coût.

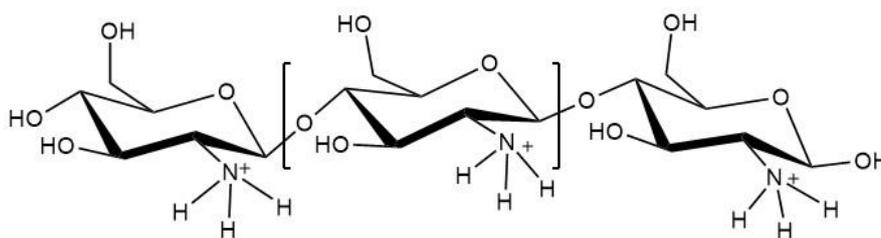
### II.1.3. Le revêtement de surfaces par des polymères biocides

Les polymères biocides sont des polymères ayant des propriétés antibactériennes. Actuellement plusieurs polymères porteurs de groupements biocides tels que les sels d'ammonium [44], ou de phosphonium [45], sont décrits dans la littérature (**Figure 8**).



**Figure 8: Structure de deux exemples de polymères biocides**

Le chitosan qui provient de la désacétylation de la chitine est un polymère à large spectre d'activité antibactérienne. L'immobilisation de ce dernier sur de la gaze pour l'élaboration de filtre à eau actifs, a été décrite par Ferrero et coll. [46]. L'effet bactéricide du chitosan est optimal à pH=6. En effet, la charge positive à la surface du support augmente grâce à la protonation des fonctions amine du chitosan (**Figure 9**). Cela induit un renforcement des interactions électrostatiques entre le chitosan et les bactéries.



**Figure 9: Structure du chitosan protoné**

[43] L. Alessio. Les métaux: propriétés chimique et toxique. Chapitre 63.

[44] E. Poverenov, M. Shemesh, A. Gulino, et al. Durable contact active antimicrobial materials formed by a one-step covalent modification of polyvinyl alcohol, cellulose and glass surfaces. *Colloids Surf. B : Biointerfaces*. 112, 2013, 356–361.

[45] A. Popa, C. M. Davidescu, R. Trif, et al. Study of quaternary 'onium' salts grafted on polymers: antibacterial activity of quaternary phosphonium salts grafted on 'gel-type' styrene–divinylbenzene copolymers. *React. Funct. Polym.* 55, 2003, 151-158.

[46] F. Ferrero, M. Periolatto, C. Vineis, et al. Chitosan coated cotton gauze for antibacterial water filtration. *Carbohydr. Polym.* 103, 2014, 207–212.

Le matériau élaboré élimine 100% de *S. aureus* et 80% de *E. coli*, alors qu'à pH plus élevé, sans protonation de l'amine, son activité est bactériostatique.

Par ailleurs, Cooper et coll. [47] ont développé des membranes nanofibreuses à base de polycaprolactone (PCL) et de chitosan afin de les utiliser en tant que filtre pour le traitement des eaux. Le matériau chitosan-PCL contenant 25 % de chitosan présente une activité antibactérienne élevée contre *S. aureus*.

Costa et coll. [48] ont élaboré des nanoparticules de chitosan. Leur activité antibactérienne a été testée contre trois souches bactériennes, deux souches de *S. aureus*, une première résistante à la méticilline (SARM), et une seconde sensible à la méticilline (SASM), et une souche de *S. epidermis* résistante à la méticilline (SERM). Les nanoparticules produites ont montré une activité élevée contre les trois souches étudiées avec une concentration minimale inhibitrice de 1,25 mg/mL.

## II.2. Les surfaces photobactéricides

Les molécules photobactéricides sont des molécules qui présentent une activité antibactérienne après irradiation lumineuse en présence d'oxygène. Le greffage de ces molécules sur des matériaux permet de développer de nouveaux supports actifs prometteurs.

Au début du 21<sup>ème</sup> siècle, les agents antibactériens photodynamiques ont attiré l'attention des chercheurs. On parle de la photo-chimiothérapie antibactériennes (PACT) [49, 50]. La PACT utilise une source lumineuse pour exciter un photosensibilisateur qui produit des espèces réactives dérivées de l'oxygène: ce sont des radicaux libres RO• et de l'oxygène singulet <sup>1</sup>O<sub>2</sub>. Ces espèces oxygénées sont très toxiques pour toutes les cellules vivantes. Leur mécanisme d'action est basé sur la mise en place d'un stress oxydatif menant à la mort cellulaire. L'oxygène singulet, réagit avec différents substrats (protéines, lipides, acides nucléiques...) et endommage ou détruit les cellules et les microorganismes. En effet, si un photosensibilisateur est incorporé à

---

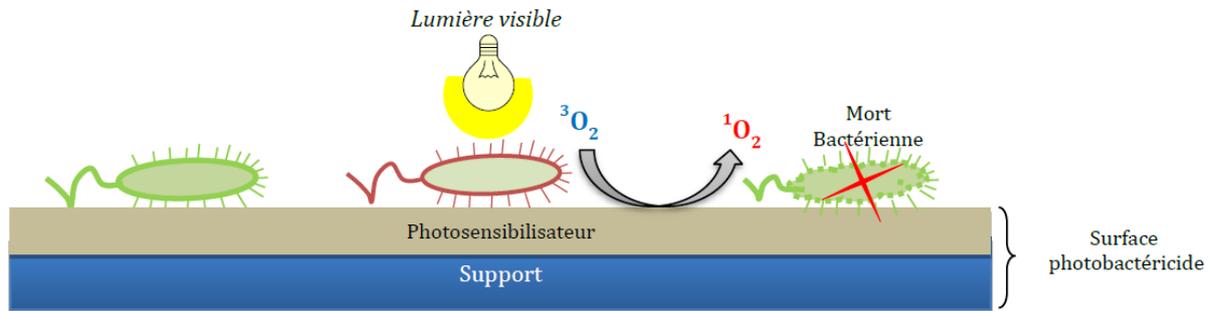
[47] A. Cooper, R. Oldinski, H. Ma, et al. Chitosan-based nanofibrous membranes for antibacterial filter applications. *Carbohydr. Polym.* 92, **2013**, 254–259.

[48] E. M. Costa, S. Silva, S. Vicente, et al. Chitosan nanoparticles as alternative anti-staphylococci agents: Bactericidal, antibiofilm and antiadhesive effects. *Mat. Sci. Eng. C.* 79, **2017**, 221–226.

[49] M. Wainwright. Photodynamic antimicrobial chemotherapy (PACT). *J. Antimicrob. Chemother.* 42, **1998**, 13–28.

[50] Y. Zhang, K. Zheng, Z. Chen, et al. Rapid killing of bacteria by a new type of photosensitizer. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 101, **2017**, 4691–4700.

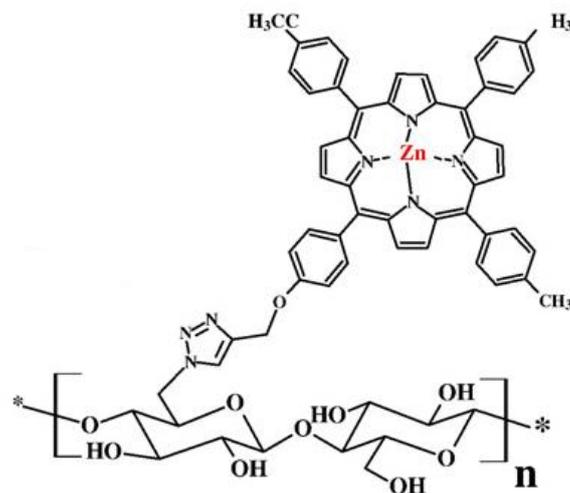
une surface solide, de l'oxygène singulet devrait être généré à sa surface en présence de lumière, entraînant une activité antibactérienne (**Figure 10**).



**Figure 10: Concept des surfaces photobactéricides [51]**

Les porphyrines par exemple, font partie de la famille des photosensibilisateurs, connus pour leurs propriétés antibactériennes. Ce sont des macrocycles fortement conjugués, constitués de quatre unités pyrroliques liées entre elle par des ponts méthines

Ringot et coll. [52] ont élaboré un matériau photobactéricide par greffage d'une porphyrine propargylée sur un tissu en coton azidé par réaction de cycloaddition de Huisguen catalysée par le cuivre I (**Figure 11**).



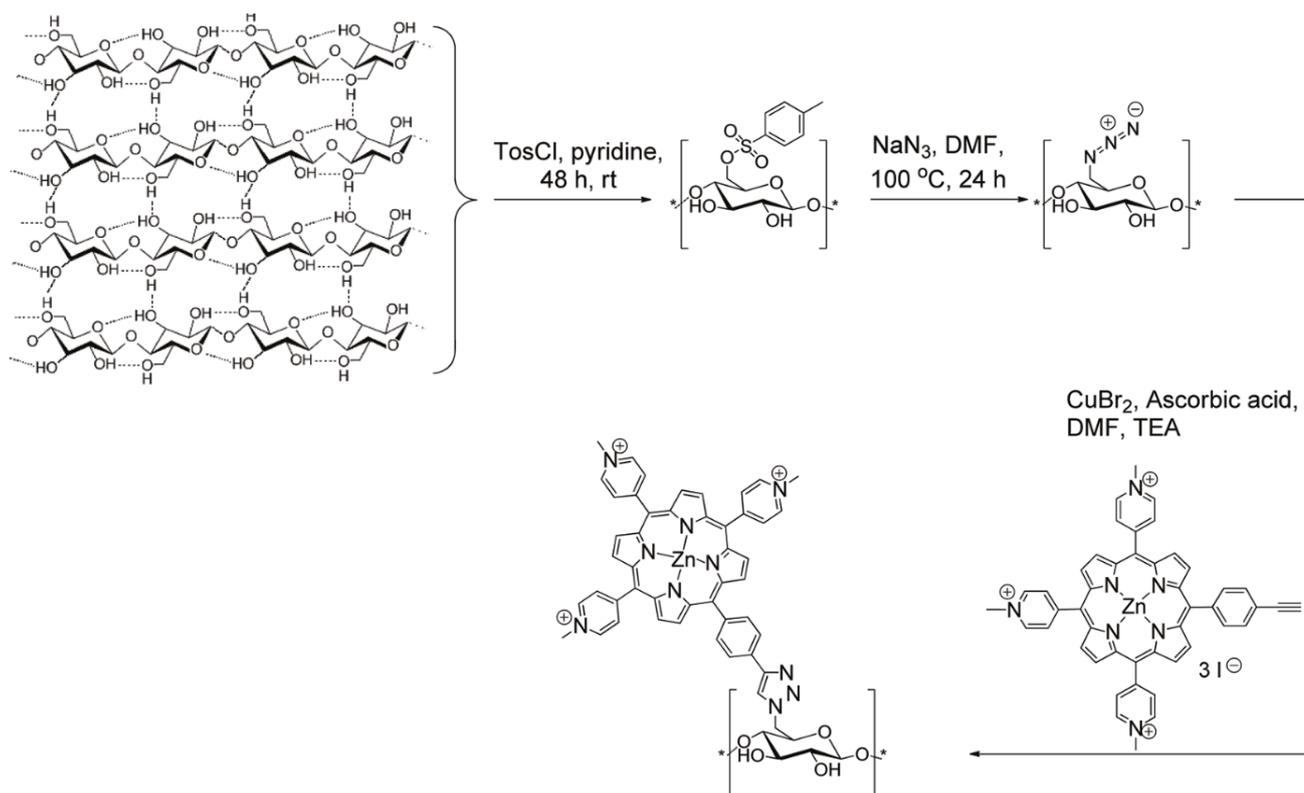
**Figure 11: Structure du coton photo bactéricide [52]**

[51] Thèse J.-K. Nzambé Takeki. Elaboration de matériaux bioactifs à partir de fibres lignocellulosiques. Université de Limoges, le 21/12/2015.

[52] C. Ringot, V. Sol, R. Granet, et al. Porphyrin-grafted cellulose fabric: New photobactericidal material obtained by "Click-Chemistry" reaction. *Material Letter*. 63, **2009**, 1889-1891.

En présence de la lumière, le matériau élaboré présente une activité photobactéricide avec un taux d'inhibition de la croissance bactérienne de 80% vis-à-vis de deux bactéries, *E. coli* et *S. aureus*.

Dans la même approche, Feese et coll. [53] ont greffé une porphyrine cationique sur des nanocristaux de cellulose azidés, toujours par réaction de cycloaddition de Huisgen catalysée par le cuivre (Figure 12).



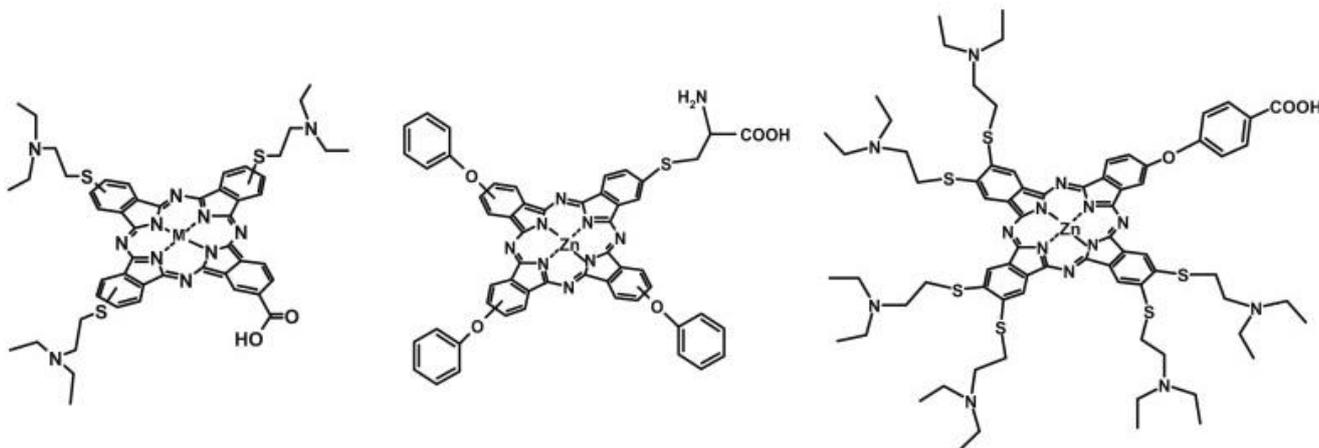
**Figure 12: Structure des nanocristaux de cellulose photobactéricides [53]**

Le matériau élaboré présente une activité photobactéricide, avec une inhibition totale de la croissance de deux bactéries, *E. coli* et *S. aureus*, et d'une mycobactérie, *Mycobacterium smegmatis*.

Il existe d'autres molécules photosensibilisatrices comme les phthalocyanines qui sont des molécules macrocycliques composées de quatre unités isoindole liées par des atomes d'azote. Elles ont suscité un intérêt significatif dans la chimiothérapie antibactérienne photo-dynamique.

[53] E. Feese, H. Sadeghifar, H. S. Gracz, et al. Photobactericidal porphyrin-cellulose nanocrystals: synthesis, characterization, and antimicrobial properties. *Biomacromolecules*. 12, 2011, 3528-3539.

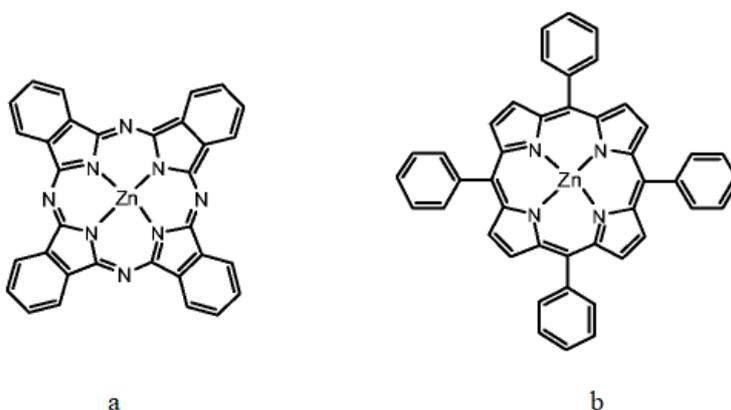
Masilela et coll. [54] ont incorporé trois phthalocyanines dans un polymère de polystyrène (**Figure 13**).



**Figure 13: Structure des phthalocyanines incorporées dans le polystyrène [54]**

Les différents matériaux présentent une activité photobactéricide vis-à-vis de *S. aureus* avec une inhibition totale de la croissance bactérienne après illumination.

Mosinger et coll. [55] quant à eux, ont développé des matériaux photobactéricide par incorporation d'une phthalocyanine (**Figure 14:a**) et d'une porphyrine (**Figure 14:b**) dans un polymère polyuréthane.



**Figure 14: Structure de la phthalocyanine (a) et de la porphyrine (b) incorporées dans le polyuréthane [55]**

Les matériaux élaborés présentent une activité photobactéricide vis-à-vis de *E. coli* avec une inhibition totale de la croissance bactérienne.

[54] N. Masilela, P. Kleyi, Z. Tshentu, et al. Photodynamic inactivation of *Staphylococcus aureus* using low symmetrically substituted phthalocyanines supported on a polystyrene polymer fiber. *Dyes Pigm.* 96, **2013**, 500-508.

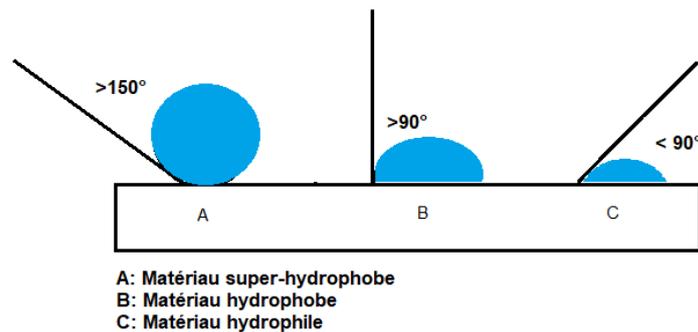
[55] J. Mosinger, K. Lang, P. K. Courrier, et al. Photofunctional Polyurethane Nanofabrics Doped by Zinc Tetraphenylporphyrin and Zinc Phthalocyanine Photosensitizers. *J. Fluoresc.* 19, **2009**, 705-713.

## II.3. Les surfaces anti- adhésives

Le concept d'anti-adhésion a pour objectif de limiter la colonisation bactérienne sur des surfaces. Pour cela, différentes méthodes ont été étudiées, parmi lesquels figurent les surfaces super-hydrophobes ou super-hydrophiles.

### II.3.1. Les surfaces super-hydrophobes

L'hydrophobie de surface d'un matériau est caractérisée par la valeur de l'angle de contact d'une goutte d'eau avec la surface (**Figure 15**).



**Figure 15: Goutte d'eau posée sur une surface super hydrophobe (A), hydrophobe (B) et hydrophile (C)**  
[56]

Si l'angle de contact est inférieur à  $90^\circ$ , il s'agit d'une surface hydrophile, tandis que si cet angle est supérieur à  $90^\circ$ , il s'agit d'une surface hydrophobe. Dans le cas de surface super-hydrophobes, l'angle de contact est supérieur à  $150^\circ$ . Ce sont des surfaces caractérisées par une rugosité élevée avec une mouillabilité très faible. On parle alors d'effet « lotus ». Son nom provient du lotus (**Figure 16**), dont les feuilles présentent une rugosité élevée les rendant super-hydrophobes.



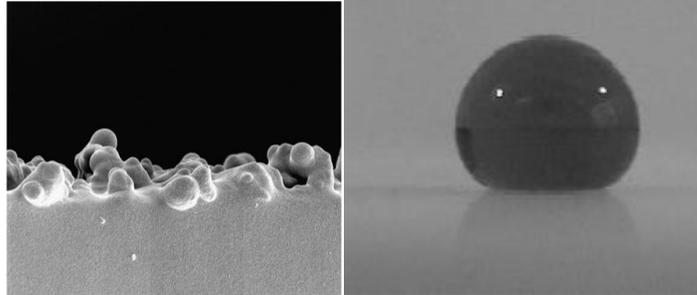
**Figure 16: Gouttes d'eau sur une feuille de lotus**

Cet effet de lotus a été mimé pour élaborer des surfaces antibactériennes qui empêchent tout contact entre la bactérie et le matériau, limitant ainsi la contamination de ce dernier.

---

[56] <https://tpeladepérance.wordpress.com/2016/02/20/hydrophobie>.

Dans cette optique, Crick et coll. [57] ont modifié par dépôt chimique en phase vapeur, la microstructure d'un film élastomère de silicone (angle de contact  $95^\circ$ ) obtenant un film superhydrophobe avec un angle de contact de  $165^\circ$  (**Figure 17**).



**Figure 17: La surface superhydrophobe élaborée [57]**

L'adhésion de deux bactéries, *E. coli* et *S. aureus*, à cette surface a été testée. Les surfaces en élastomère super-hydrophobes réduisent l'adhésion des bactéries testées de 79% pour *E. coli* et de 58% pour *S. aureus*, par rapport aux surfaces de verre brut et des films élastomères plats.

### **II.3.2. Les surfaces super hydrophiles**

Les surfaces super-hydrophiles peuvent également empêcher la fixation initiale des bactéries, via la formation d'une couche d'hydratation appelée « film lubrifiant liquide », qui réduit les interactions électrostatiques attractives entre les cellules bactériennes et la surface solide [58, 59]. Dans cette optique, Hwangbo et coll. [60] ont développé un film antibactérien super-hydrophile pour le revêtement des dispositifs biomédicales, par incorporation des nanoparticules de silice (Si) dans une matrice de silsesquioxane (SQ), suivie d'introduction de polyéthylénimine (PEI) ramifié (**Figure 18**).

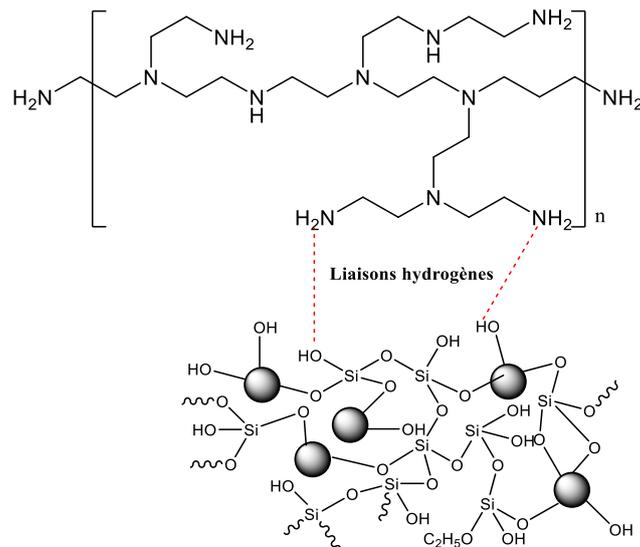
---

[57] C. R. Crick, S. Ismail, J. Pratten, et al. An investigation into bacterial attachment to an elastomeric superhydrophobic surface prepared via aerosol assisted deposition. *Thin. Solid. Film.* 519, **2011**, 3722 – 3727.

[58] S. H. Yoon, N. Rungraeng, W. Song, et al. Superhydrophobic and superhydrophilic nanocomposite coatings for preventing *Escherichia coli* K-12 adhesion on food contact surface. *J. Food Eng.* 131, **2014**, 135-141.

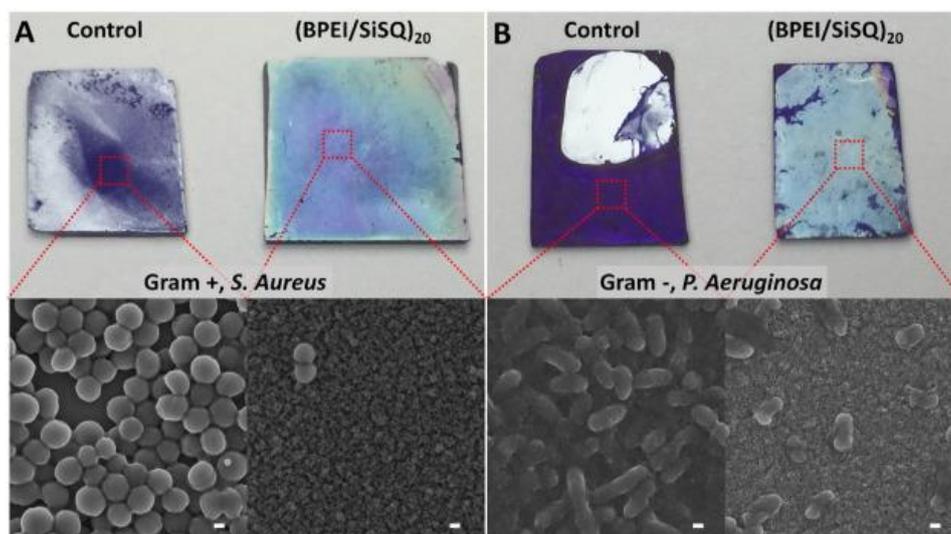
[59] Y. Yuan, P. M. Hays, P. R. Hardwidge, et al. Surface characteristics influencing bacterial adhesion to polymeric substrates. *RSC Adv.* 7, **2017**, 14254-14261.

[60] S. Hwangbo, H. Jeong, J. Heo, et al. Antibacterial nanofilm coatings based on organosilicate and nanoparticles. *React. Funct. Polym.* 102, **2016**, 27-32.



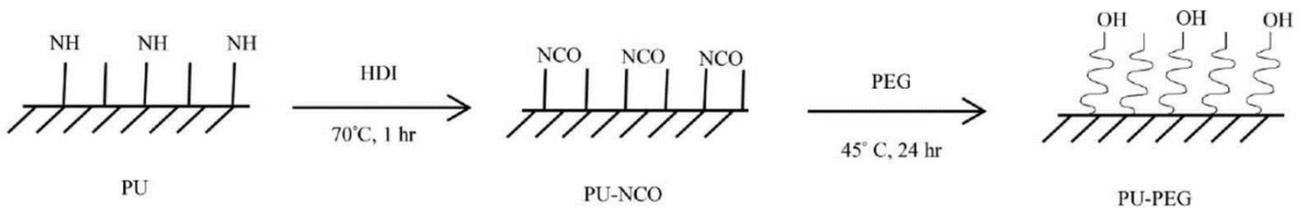
**Figure 18: Film antibactérien élaboré par incorporation des nanoparticules de silice et de polyéthyléimine ramifié [60]**

Le matériau obtenu (BPEI/ SiSQ) empêche l'adhésion de *S. aureus* (Figure 19:A) et *P. aeruginosa* (Figure 19:B) à sa surface. Comme le montre la figure 19, les surfaces des échantillons témoins (oxyde de silicium) étaient beaucoup plus contaminées par des films bactériens colorés en violet par le violet cristal, en comparaison avec la surface des matériaux BPEI/ SiSQ. Les images de MEB montrent une concentration importante de cellules bactériennes à la surface du polyéthylèneimine tandis que peu de bactéries sont trouvées sur les surfaces des films BPEI / SiSQ.



**Figure 19: Propriétés antiadhésives du matériau BPEI/ SiSQ [60]**

Noorisafa et coll. [61] quant à eux, ont développé une surface super-hydrophile, par greffage de polyéthylène glycol (PEG) sur une surface de polyuréthane (PU) en utilisant l'hexaméthylène diisocyanate comme agent de couplage (**Figure 20**), puis piégeage de nanoparticules de dioxyde de titane (TiO<sub>2</sub>).



**Figure 20: Greffage de polyéthylène glycol (PEG) sur une surface de polyuréthane (PU) en utilisant l'hexaméthylène diisocyanate (HDI) comme agent de couplage [61]**

L'adhésion de trois souches bactériennes, *Streptococcus pneumoniae*, *Staphylococcus epidermidis* et *Staphylococcus aureus*, sur la surface modifiée a été évaluée. Les résultats ont montré que lorsque la surface de PU devenait super-hydrophile, l'adhésion bactérienne devenait indépendante du type de bactérie. L'obtention d'une surface super-hydrophile a entraîné une réduction de l'adhésion bactérienne de 71%.

D'autres surfaces antiadhésives peuvent être développées par greffage de polymère à propriété antiadhésive. Ces derniers sont des polymères qui, une fois immobilisés sur la surface du biomatériau, modifient l'état physico-chimique de surface de manière à empêcher l'adhésion des bactéries. Les polymères porteurs de groupements anioniques tels que les carboxylates et les sulfonates sont réputés pour leurs propriétés d'anti-adhésion. En effet, leurs groupements anioniques induisent une répulsion électrostatique des bactéries. [62].

Le développement de nouveaux matériaux antibactériens est donc un sujet de recherche contemporain comme le montrent les exemples précédents. C'est dans cette optique que nous avons travaillé à l'élaboration et l'évaluation biologique de nouveaux matériaux antibactériens.

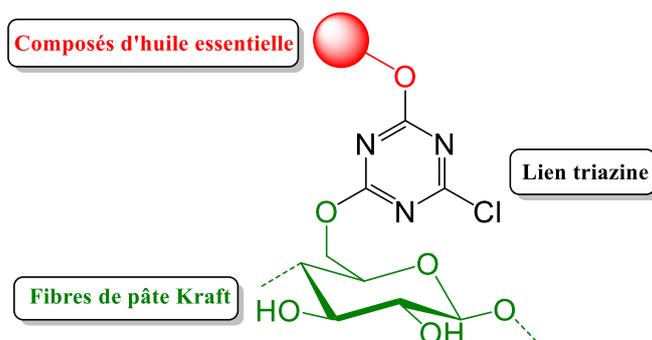
[61] F. Noorisafa, A. Razmjou, N. Emami, et al. Surface modification of polyurethane via creating a biocompatible superhydrophilic nanostructured layer: role of surface chemistry and structure. *J. Experim. Nanoscience*. 11, 2016,1087-1109.

[62] B. Gottenbos, H. C. Van Der Mei, H. J. Busscher, et al. Initial adhesion and surface growth of *Pseudomonas aeruginosa* on negatively and positively charged poly (methacrylates). *J. Mater. Sci. Mater. Med.* 10, 1999, 853-5.

### III. Objet du travail

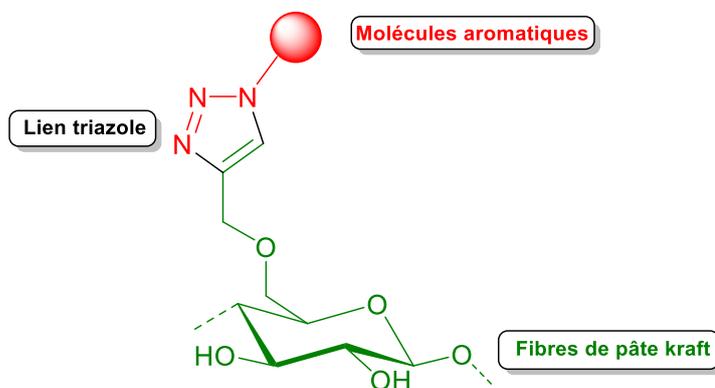
Dans le présent projet de thèse, l'objectif est le développement de nouvelles surfaces antibactériennes à base de fibres de pâte à papier (pâtes issues des procédés Kraft et thermomécanique).

Pour ce faire, nous nous sommes intéressés, dans une première partie, à l'élaboration d'un papier antibactérien par greffage de biocides naturels. Deux composés d'huiles essentielles ont été choisis, le thymol et le carvacrol. Ce choix est basé sur leurs activités antibactériennes élevées contre un grand nombre de bactéries. Le greffage de ces deux composés a été réalisé, *via* un lien triazine, sur les fibres de pâte kraft (**Figure 21**) puis transféré sur les fibres de pâte thermomécanique.



**Figure 21: Matériaux développés par greffage de composé d'huiles essentielles sur les fibres de pâte Kraft**

Dans une deuxième partie, notre étude s'est focalisée sur l'élaboration de nouveau papier antibactérien par greffage de molécules aromatiques qui n'acquièrent leurs potentiels antibactériens, qu'après fixation sur les fibres de pâte à papier, par l'intermédiaire du 1,2,3-triazole (**Figure 22**). Le greffage de ces molécules est réalisé par une réaction de « Click Chemistry », la cycloaddition de Huisgen catalysée par le cuivre I. Les différents greffages sont par la suite, transférés sur la pâte thermomécanique.



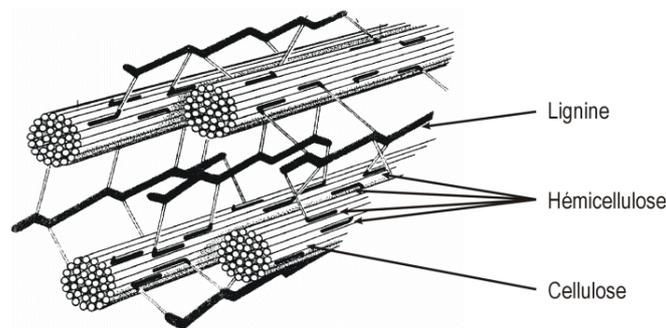
**Figure 22: Matériaux élaborés par greffage de molécules aromatiques sur les fibres de pâte Kraft**

Les stratégies de mise en œuvre ainsi utilisées sont simples. Le choix de pâte à papier comme support, est basé sur son abondance, ainsi que la présence de groupements hydroxyles sur les fibres lignocellulosiques qui facilite leur modification chimique. Elle est également adaptée à plusieurs utilisations. Le papier antibactérien ainsi synthétisé pourrait être utilisé pour la fabrication de papier journal, des textiles à usage unique ou des meubles en carton pour meubler les endroits soumis à des règles d'hygiène strictes comme les hôpitaux.

Avant de présenter la conception de ces nouveaux matériaux, une présentation est dédiée aux matériaux lignocellulosiques et leur utilisation comme supports antibactériens.

#### IV. Les matériaux lignocellulosiques

La matière lignocellulosique est le constituant principal de la paroi cellulaire des plantes. Elle est la source de carbone renouvelable la plus abondante de la planète. Elle est constituée de trois éléments majeurs qui sont la cellulose, l'hémicellulose et la lignine. Des pectines, des pigments et des extractibles peuvent également s'y trouver en plus faible quantité. Les trois macromolécules majeures, s'entremêlent et forment une structure tridimensionnelle complexe et très résistante, maintenue par des liaisons hydrogène et des liaisons covalentes (**Figure 23**).



**Figure 23: Structure tridimensionnelle d'un matériau lignocellulosique**

La proportion et la nature de chacune des macromolécules sont fonction de l'origine botanique de la matière (**Tableau 1**). La cellulose est le constituant majoritaire du bois à côté des hémicelluloses et des lignines.

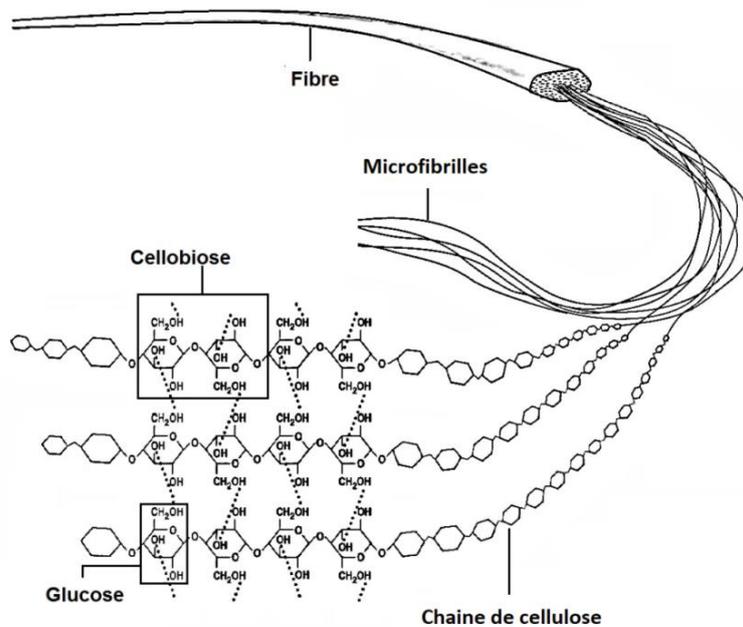
**Tableau 1: Composition en cellulose, hémicellulose et lignine de certaines matières lignocellulosiques**

	Cellulose	Hémicellulose	Lignine
<b>Bois dur</b>	40-55%	24-40%	18-25%
<b>Bois tendre</b>	45-50%	25-35%	25-35%
<b>Herbacées</b>	25-40%	35-50%	10-30%

Le bois dur désigne généralement le bois de feuillus, alors que le bois tendre provient souvent des résineux.

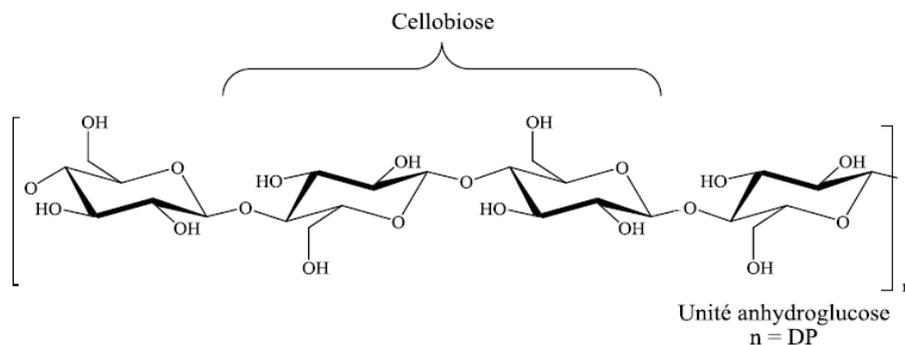
#### IV.1. La cellulose

La cellulose fait partie d'un édifice architectural complexe qui varie en fonction de l'organisme considéré. Cette hiérarchie à laquelle elle participe est illustrée dans la **figure 24**.



**Figure 24: De la fibre à la cellulose**

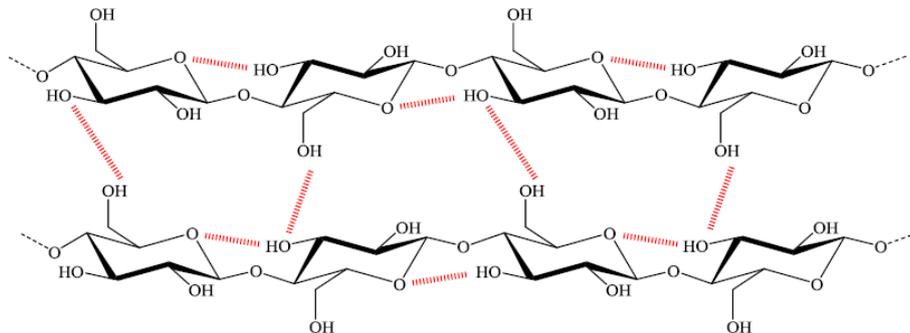
La cellulose est un homopolymère linéaire, composé uniquement de D-glucopyranose reliés par des liaisons  $\beta$ -1,4. L'unité répétitive, composée de deux résidus de glucoses, est appelée cellobiose (**Figure 25**).



**Figure 25: Structure de la cellulose**

Les nombreux groupements hydroxyles sont responsables du comportement physico-chimique de la cellulose. Ils sont capables de former deux types de liaisons hydrogène selon leur position

dans l'unité de glucose (**Figure 26**). Ces liaisons hydrogène existent entre deux fonctions hydroxyles adjacentes présentes dans la même chaîne de cellulose (liaisons intramoléculaires) et entre celles issues de deux chaînes adjacentes (liaisons intermoléculaires).

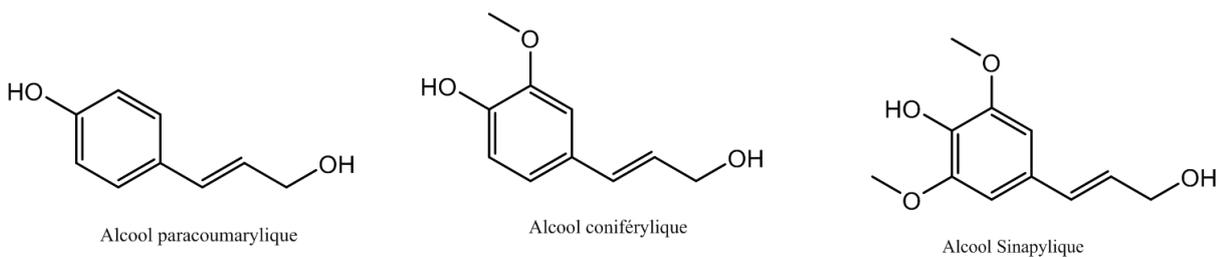


**Figure 26: Liaisons hydrogène intramoléculaires et intermoléculaires au sein de la cellulose**

La cellulose peut être considérée comme un polyol dont bon nombre de groupements hydroxyles sont engagés dans des liaisons hydrogènes.

## IV.2. La lignine

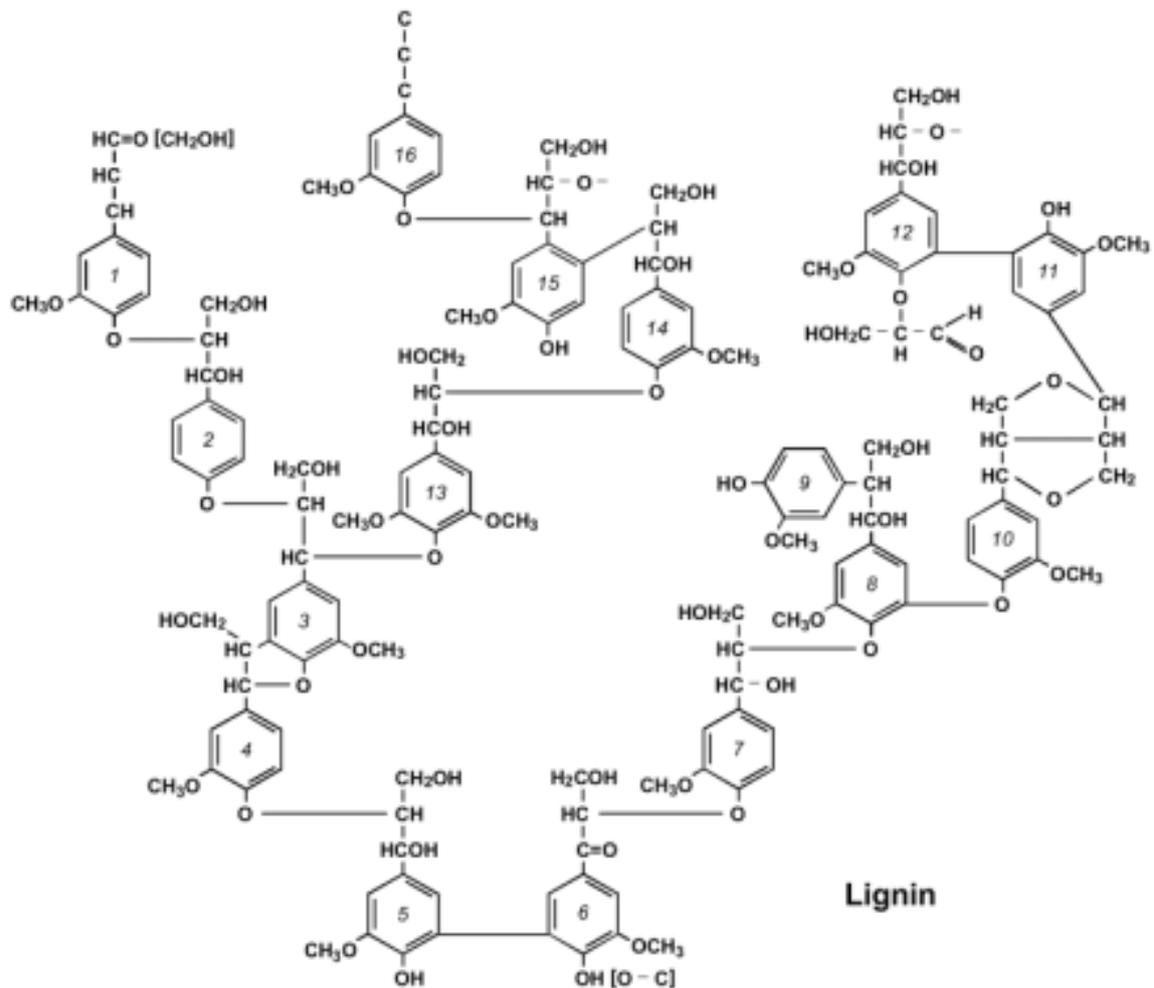
La lignine est le deuxième biopolymère renouvelable le plus abondant sur la terre, après la cellulose. Elle est généralement polymérisée à partir de trois précurseurs monomères phénylpropanoïdes : les alcools p-coumaryliques, coniféryliques et sinapyliques, qui sont aussi connus comme les monolignols (**Figure 27**).



**Figure 27: Structure des trois principaux constituants de la lignine**

La lignine ne possède pas une structure uniforme et homogène, bien définie, avec des unités répétitives établies. Pour cette raison, il n'est pas possible d'associer une structure définie à la lignine bien que certains modèles représentatifs aient été proposés, correspondant à des études sur certaines lignines extraites. La **figure 28** représente la structure d'un fragment de lignine de bois de résineux (*Picea sp.*) proposée par Adler (1977) [63].

[63] E. Adler. Lignin Chemistry-Past, Present and Future. *Wood Sci. Technol.* 11, 1977, 169-218.

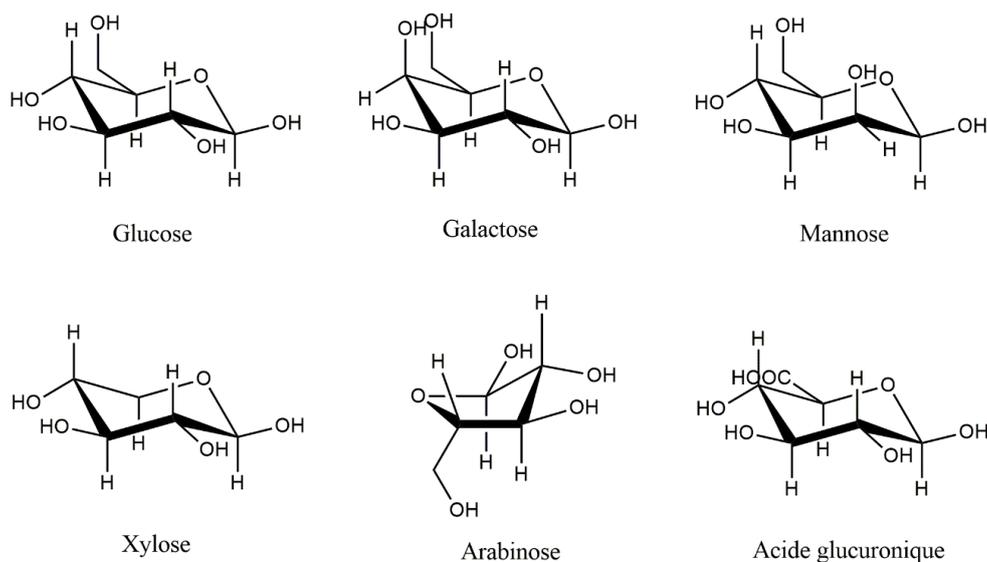


**Figure 28: Structure d'un fragment de lignine de bois de résineux selon Alder**

Les principales fonctions des lignines sont d'apporter une rigidité, une imperméabilité à l'eau et une grande résistance à la décomposition.

### IV.3. Les hémicelluloses

Les hémicelluloses sont des fibres polysaccharidiques dont le squelette est composé de résidus  $\beta$ -(1,4)-D-pyranose. Contrairement à la cellulose, les hémicelluloses contiennent plusieurs sucres à 5 atomes de carbone tels que le xylose et l'arabinose, et des sucres à 6 atomes de carbone tels que le glucose, le mannose, le galactose, l'acide galacturonique et l'acide glucuronique (**Figure 29**).



**Figure 29: Les principaux constituants des hémicelluloses [64]**

Les hémicelluloses peuvent être classées en quatre grands groupes :

- Les xyloglucanes qui ont un squelette de résidus de glucose sur lequel se greffent des résidus de xylose, de galactose et de fucose.
- Les xylanes qui incluent les glucuronoxylanes qui ont un squelette de résidus de xylose sur lequel se greffent des résidus d'acide glucuronique ou son dérivé O-méthylé.
- Les mannanes qui ont un squelette de résidus mannose et les glucomannanes qui ont un squelette de résidus de mannose et de glucose.
- Les glucanes à liaisons mixtes qui sont des chaînes non ramifiées de résidus D-glucose liés par des liaisons  $\beta$ -1,3 ou  $\beta$ -1,4.

L'étude des différentes voies de valorisations des matériaux lignocellulosiques, a fait l'objet de nombreux travaux [65, 66, 67, 68]. L'un de ces matériaux les plus anciens et les plus utilisés est le papier qui constitue un très bon support pour des réactions chimiques. La phosphorylation par

[64] H. V. Lee, S. B. A. Hamid, S. K. Zain. Conversion of Lignocellulosic Biomass to Nanocellulose: Structure and Chemical Process. *Sci. World J.* DOI: 10.1155/2014/631013.

[65] Y. Shi, D. Belosinschi, F. Brouillette, et al. Phosphorylation of Kraft fibers with phosphate esters. *Carbohydr. Polym.* 106, 2014, 121-127.

[66] G. Nourry, D. Belosinschi, M. P. Boutin, et al. Hydrophobization of phosphorylated cellulosic fibers. *Cellulose*. 23, 2016, 3511-3520.

[67] A. A. Gallegos, Z. Ahmad, M. Asgher, et al. Lignocellulose: A sustainable material to produce value-added products with a zero-waste approach-A review. *Int. J. Biol. Macromol.* 19, 2017, 308-318.

[68] W. Jiang, A. Kumar, S. Adamopoulos. Liquefaction materials lignocellulose and its applications in wood adhesives - A Review. *Ind Crops Prod.* 124, 2018, 325-342.

exemple est une des modifications chimiques qui permet d'élaborer un papier ignifuge [66], ou l'estérification en utilisant des acides gras qui permet de développer un papier hydrophobe [67].

#### **IV.4. La pâte à papier à partir du bois**

La préparation de pâtes à papier consiste à isoler les fibres lignocellulosiques à partir du bois tout en conservant au mieux leurs caractéristiques et leurs propriétés. Pour ce faire, il existe deux voies de préparation : la voie mécanique et la voie chimique.

##### **IV.4.1. Les pâtes mécaniques**

Dans le procédé de mise en pâte mécanique, les fibres sont séparées en brisant les parois primaires et secondaires par action mécanique. Ce procédé ne permet pas d'extraire la lignine, cette dernière confère au papier une certaine rigidité mais elle est aussi une substance qui fait vieillir et jaunir le papier plus vite. Afin de pallier cet inconvénient, il existe un procédé thermomécanique, son principe est aussi basé sur une séparation mécanique des fibres. Néanmoins, le bois est réchauffé à une température de 165°C, avec de la vapeur d'eau afin d'atteindre la température de transition vitreuse de la lignine. La pâte thermomécanique est obtenue avec des rendements élevés (93 - 95%) et présente une qualité supérieure à celle de la pâte mécanique.

##### **IV.4.2. Les pâtes chimiques**

La mise en pâte par des procédés chimiques consiste à séparer les fibres du bois en dissolvant au cours de cuissons chimiques la lamelle moyenne et les lignines, ne modifiant que très peu la structure des fibres. Les pâtes chimiques sont obtenues avec un rendement faible (50-55 %), elles ont une très bonne résistance mécanique et supportent beaucoup mieux le passage du temps, puisqu'il n'y a pas ou peu de jaunissement dû à la lumière. Parmi les procédés chimiques, le procédé Kraft est le plus utilisé, il représente 84% de la production mondiale de la pâte chimique.

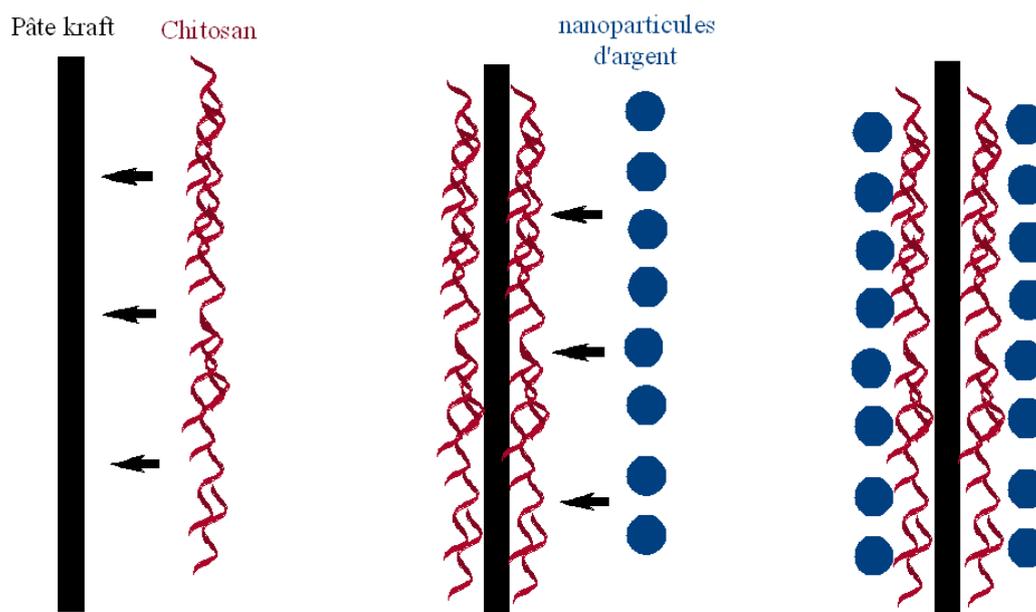
Le procédé Kraft se déroule en milieu basique et utilise de grandes quantités de soude et de sulfure de sodium pour dissoudre les lignines et une partie des hémicelluloses. Ce procédé est applicable à toutes variétés de bois et permet d'obtenir une pâte avec des meilleures propriétés mécaniques. La pâte issue du procédé Kraft contient plus de 85% de cellulose.

Dans notre étude, nous allons donc utiliser les fibres de pâtes à papier issues des procédés kraft et thermomécanique, comme support pour élaborer de nouveaux matériaux antibactériens.

#### IV.4.3. Le papier comme supports d'antibactériens

Le papier est considéré comme un matériau de base dans les domaines de l'écriture, du dessin, de l'impression, de l'emballage et de la peinture. Il est également utilisé dans la fabrication de composants divers comme par exemple les filtres.

Aujourd'hui, la concurrence des supports d'information numérique, impacte fortement la consommation de papier. Il devient donc important pour les fabricants de pâtes à papier de développer de nouveaux débouchés pour leurs productions. Pour cela, des travaux ont été mis au point pour élaborer des supports antibactériens à base de papier. Imani et coll. [69] ont déposé du chitosan et des nanoparticules d'argents sur des fibres de pâte Kraft (**Figure 30**). Trois types de matériaux ont été élaborés, par dépôt d'une, quatre et huit bicouches de principes actifs.



**Figure 30: Dépôt couche par couche du chitosan et des nanoparticules d'argents sur des fibres de la pâte Kraft [69]**

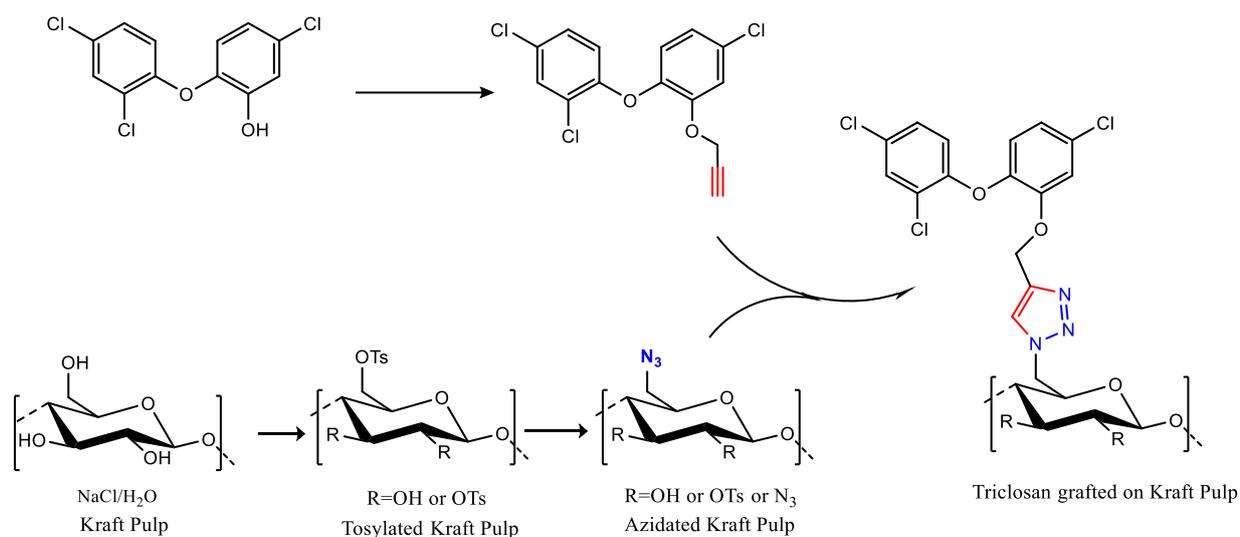
Le matériau qui contient huit bicouches présentait la meilleure activité contre *E. coli* et *S. aureus*, avec un taux d'inhibition de croissance de 100% après 24h de contact.

[69] R. Imani, M. Talaiepour, J. Dutta, et al. Production of antibacterial filter paper from wood cellulose. *BioResources*. 6, 2011, 891-900.

Johnston et coll. [70] ont déposé des nanoparticules d'or et d'argent sur des fibres de pâte Kraft non blanchies, pour développer des matériaux composites antibactériens. Les fibres composites élaborées présentaient une activité bactéricide contre des souches de *S. aureus*, avec inhibition de la croissance de 100% après 24h de contact.

Pei et coll. [71] quant à eux, ont greffé quatre composés phénoliques, le *p*-hydroxybenzoate de butyle, l'iso eugénol, l'acide *p*-coumarique et l'acide férulique sur de la pâte Kraft, afin de développer un emballage alimentaire actif. L'activité antibactérienne des matériaux élaborés a été testée contre *S. aureus*, *E. coli*, *B. subtilis* et *Salmonella*. Le matériau obtenu par greffage de *p*-hydroxybenzoate de butyle a présenté la meilleure activité antibactérienne avec un taux d'inhibition de 91%.

Par ailleurs, nous avons élaboré, au laboratoire, un papier bactéricide par greffage de triclosan propargylé [72], sur des fibres cellulosiques de pâte Kraft, qui ont été tosylées puis azidées (**Figure 31**).



**Figure 31: Greffage de triclosan sur les fibres de pâte Kraft [72]**

L'étude de l'activité antibactérienne du matériau élaboré a été réalisé contre quatre souches bactériennes, *S. aureus*, *E. coli*, *B. cereus* et *P. aeruginosa*. Le papier obtenu présente

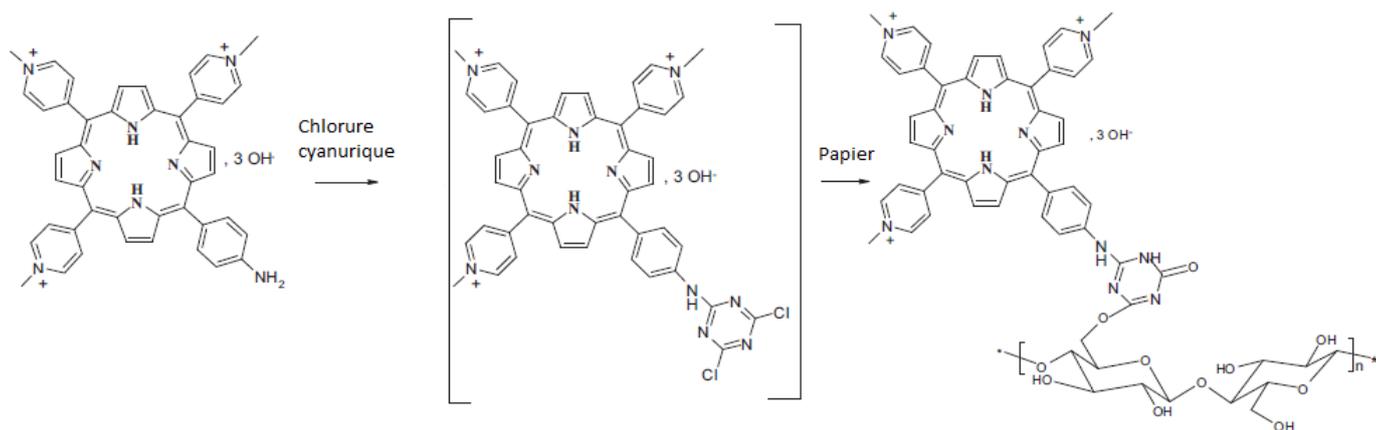
[70] J. H. Johnston and T. Nilsson. Nanogold and nanosilver composites with lignin-containing cellulose fibres. *J. Mat. Sci.* 47, **2012**, 1103–1112

[71] J. Pei, Y. Zhang, F. Zhang, et al. Enhancing Antimicrobial Activity in Unbleached Kraft Pulp using Laccase and Phenolic Compounds. *BioResources.* 8, **2013**, 515-529.

[72] Z. Khaldi, J. K. Nzambe Takeki, Claire Besse, et al. Synthesis, Characterization and Biological Evaluation of Triclosan Grafted onto cellulosic Fibers. *Fiber polym.* 19, **2018**, 1820-1827.

une activité bactéricide contre les trois premières souches bactériennes avec un taux d'inhibition de 100%, après 24h et 48h de contact. *P. aeruginosa* a montré une résistance au triclosan greffé.

Un papier filtre photobactéricide a été également élaboré par Mbakidi et coll. [73] au sein de notre laboratoire, en greffant une porphyrine cationique, la 5-(4-aminophenyl)-10,15,20-tri(4-Nméthylpyridyl) porphyrine, sur des feuilles de papier filtre via un lien triazine (**Figure 32**).



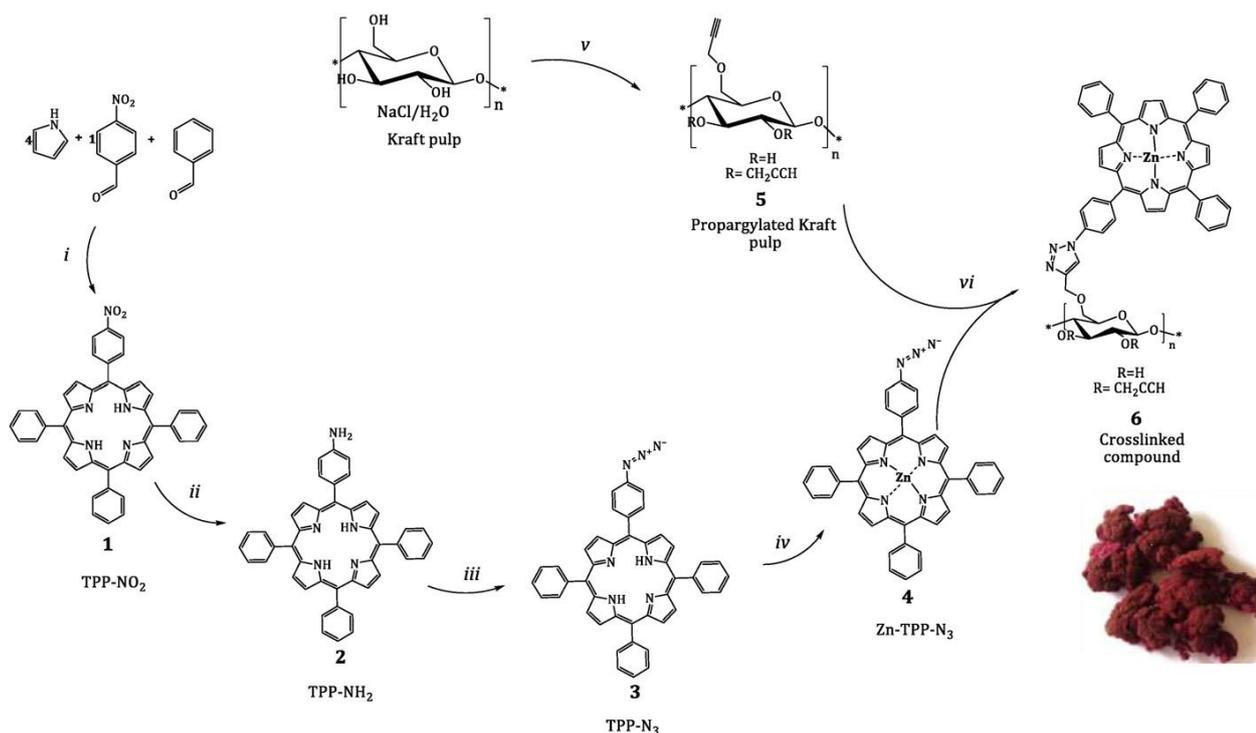
**Figure 32: Elaboration de papier filtre photobactéricide [73]**

Le matériau élaboré présentait une activité photobactéricide élevée contre *E. coli* et *S. aureus* avec une inhibition totale de la croissance bactérienne après 24h de contact.

Nzambe Ta keki et coll. [74] quant à eux, ont développé un papier photobactéricide par greffage d'une porphyrine neutre azidée, la 5-(4-azidophenyl)-10,15,20-triphenylporphyrin, sur des fibres de pâte kraft propargylées (**Figure 33**), par réaction de cycloaddition de Huisguen catalysée par le cuivre I.

[73] J. P. Mbakidi, K. Herke, S. Alvès, et al. Synthesis and photobiocidal properties of cationic porphyrin-grafted paper. *Carbohydr. Polym.* 91, **2013**, 333-8.

[74] J. K. Nzambe Ta keki, T. S. Ouk, R. Zerrouki, et al. Synthesis and photobactericidal properties of a neutral porphyrin grafted onto lignocellulosic fibers. *Mat. Sci. Eng. C.* 62, **2016**, 61-67.



(i) I<sub>2</sub>, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/p-chloranile; (ii) SnCl<sub>2</sub>, HCl, CHCl<sub>3</sub>, CH<sub>3</sub>COOH; (iii) 1) NaNO<sub>2</sub>, HCl, 2) NaN<sub>3</sub>; (iv) Zn(OAc)<sub>2</sub>·2H<sub>2</sub>O, THF; (v) NaCl/H<sub>2</sub>O/BrCH<sub>2</sub>CCH/H<sub>2</sub>O, (vi) CuSO<sub>4</sub>·5H<sub>2</sub>O, NaAsc THF/H<sub>2</sub>O

**Figure 33: Papier photobactéricide élaboré [74]**

Le papier obtenu présente une activité photobactéricide contre *S. aureus* et *P. aeruginosa* avec des taux d'inhibition de 100% après 24h de contact.

Dans le cadre de ces travaux de thèse, nous nous sommes intéressés dans un premier temps à l'élaboration de matériaux bioactifs par greffage de biocides naturels sur les fibres de pâte à papier.

# **Chapitre 2**

**Elaboration de papiers actifs par greffage de biocides naturels  
Evaluation biologique**



## I. Elaboration de matériaux antibactériens par immobilisation de biocides naturels

Comme nous l'avons décrit dans l'étude bibliographique, l'élaboration de matériaux actifs a fait l'objet d'un regain d'attention du fait de l'émergence de nombreuses maladies infectieuses. Nous avons également décrit plusieurs approches synthétiques développées pour l'élaboration de ce type de matériaux. Dans notre étude, nous nous sommes intéressés, dans un premier temps, à l'utilisation de biocides naturels.

### I.1. Les biocides naturels

Dans la nature, les organismes vivants ont développé des stratégies fascinantes sur des millions d'années afin de prévenir efficacement leur colonisation par des agents pathogènes. Ces stratégies ont récemment été imitées pour créer une nouvelle génération de surfaces empêchant la formation de biofilms. Différents biocides naturels produits par des organismes vivants sont utilisés pour développer ces surfaces actives. Cette catégorie de biocides regroupe des peptides, des enzymes et des huiles essentielles.

#### I.1.1. Les peptides antimicrobiens :

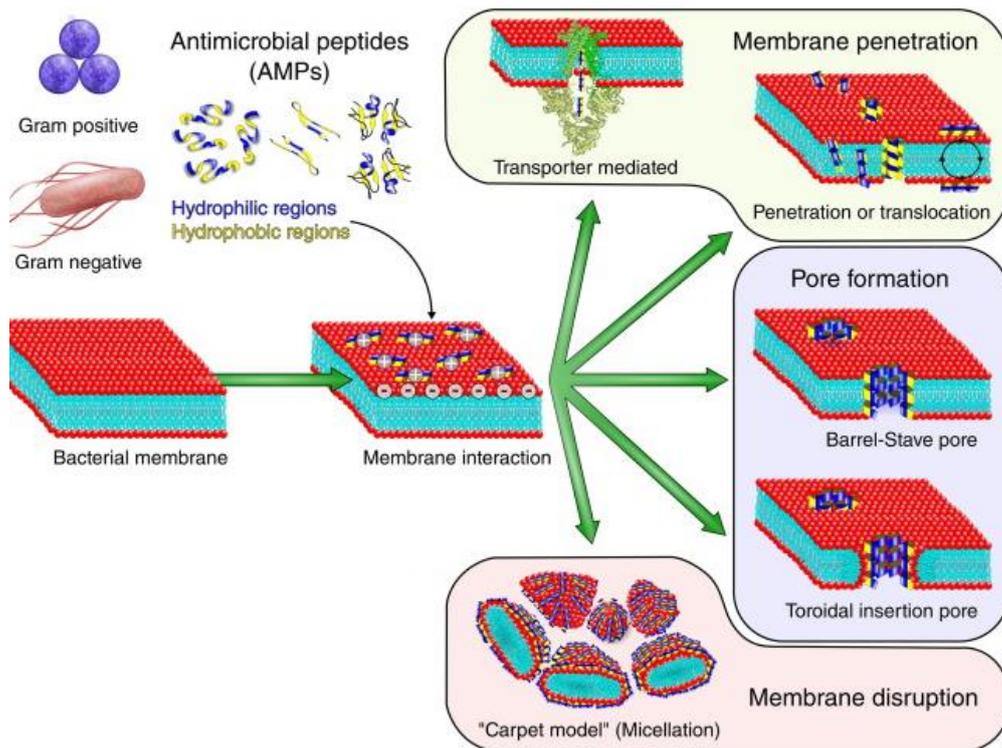
Un peptide est un enchainement d'acides aminés reliés entre eux par des liaisons peptidiques. C'est une classe de diverses molécules naturelles qui sont produites comme première ligne de défense par tous les organismes multicellulaires [75, 76]. Le mécanisme d'action classique des peptides implique un dommage de la membrane cellulaire. Les différents modes d'action membranaires des peptides sont présentés sur la **figure 34** [77]. Les peptides antimicrobiens (PAM) interagissent avec les composés membranaires conduisant à la pénétration dans la membrane, la formation de pores ou la déstructuration membranaire.

---

[75] J. A. Hoffmann, J. L. Dimarcq, P. Bulet. Antimicrobial Peptides from Insects: An Overview. *M/S*, 8, **1992**, 132-139.

[76] L. J. Zhang and R. L. Gallo. Antimicrobial peptides. *Current Biology*. 26, **2016**, R1–R21.

[77] J. M. Ageitos, A. Sánchez-Pérez, P. Calo-Mata, et al. Antimicrobial peptides (AMPs): Ancient compounds that represent novel weapons in the fight against bacteria. *Biochem. Pharmacol.* 133, **2017**, 117-138.



**Figure 34: Différents modes d'action des peptides antimicrobiens [77]**

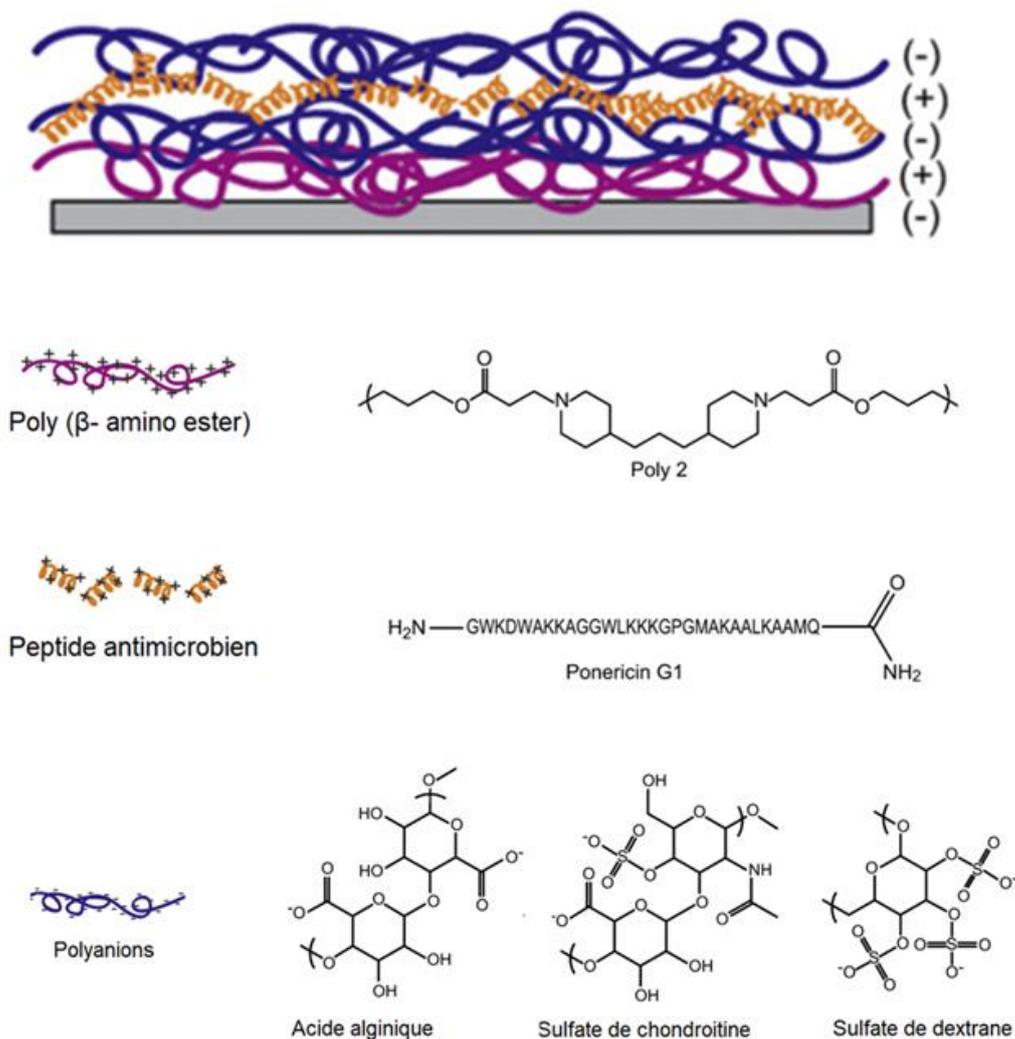
Les PAM présentent une activité à large spectre contre les microorganismes pathogènes et, comme ces composés n'interagissent pas avec des récepteurs spécifiques, leurs cibles microbiennes développent rarement des phénotypes résistants.

Afin de lutter contre les contaminations bactériennes, différents peptides sont utilisés pour la fonctionnalisation de surface des matériaux, en vue d'empêcher la croissance bactérienne et la formation de biofilms.

Shukla et coll. [78] ont utilisé la Ponericine G1, un peptide antimicrobien connu, isolés du venin de la fourmi prédatrice *Pachycondyla goeldii* [79]. Ce peptide a été incorporé dans un film multicouche hydrolytiquement dégradable, à base de polyélectrolytes (Poly ( $\beta$ - amino ester), sulfate de chondroïtine, acide alginique et sulfate de dextrane) (**Figure 35**).

[78] A. Shukla, K. E. Fleming, H. F. Chuang, et al. Controlling the release of peptide antimicrobial agents from surfaces. *Biomaterials*.31, **2010**, 2348-2357.

[79] J. Orivel. Ponericins: New Antibacterial and Insecticidal Peptides from the Venom of the Ant *Pachycondyla goeldii*. *J. Biol. Chem.* 276, **2001**, 17823-9.

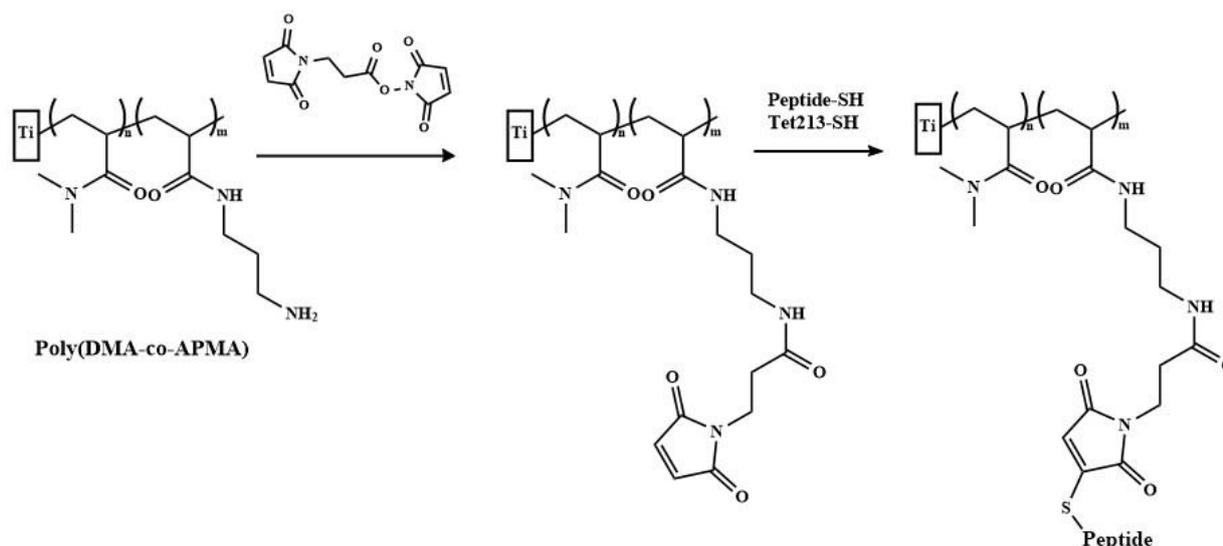


**Figure 35: La ponericine incorporé dans un film multicouche et la structure de Poly (β- amino ester), ponericine G1, sulfate de chondroïtine, acide alginique et sulfate de dextrane [78]**

La libération de Ponericine G1 a été observée sur dix jours. Les résultats indiquent que le peptide libéré a conservé son activité contre *S. aureus* et a permis d'inhiber l'adhésion de la souche bactérienne étudiée. Ces films peuvent être utilisés comme revêtement pour les matériaux d'implants.

Dans une même approche, Gao et coll. [80] ont immobilisé un peptide, Tet213, sur une surface de titane (**Figure 36**).

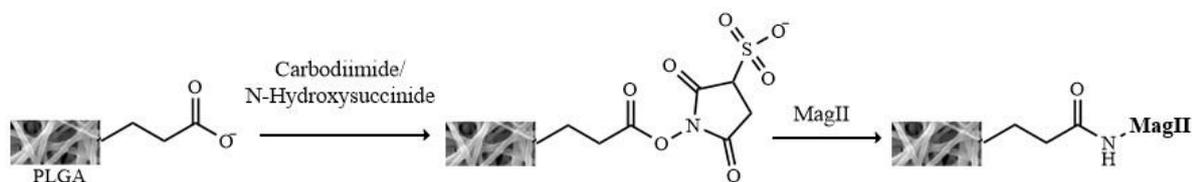
[80] G. Gao, K. Yu, J. Kindrachuk, et al. Antibacterial Surfaces Based on Polymer Brushes: Investigation on the Influence of Brush Properties on Antimicrobial Peptide Immobilization and Antimicrobial Activity. *Biomacromolecules*, 12, 2011, 3715–3727.



**Figure 36: Schéma de l'immobilisation de peptide Tet213 sur le titane [80]**

Une surface de titane contenant le copolymère portant une amine primaire, le poly (N, N-diméthylacrylamide-co-N-(3-aminopropyl) méthacrylamide (poly DMA-co-APMA) a été synthétisée puis traité par l'acide 3-maléimidopropionique N-hydroxysuccinimide. Le peptide antimicrobien Tet213 a été ensuite incorporé aux copolymères. Le matériau élaboré présentait une activité bactéricide contre *P. aeruginosa*.

Yüksel et coll. [81] quant à eux, ont greffé la Magainine II (Mag II) sur la surface d'une membrane en polylactide-co-glycolide (PLGA) (**Figure 37**). La Magainine II est un peptide constitués d'une chaîne de 23 AA, connu pour désorganiser la membrane cellulaire par la formation de pores toroïdaux très stables, entraînant un mouvement des lipides de la membrane et une translocation des peptides sur la membrane cytoplasmique [82]. Les tests réalisés sur *E. coli* et *S. aureus* ont montré une activité antibactérienne du complexe PLGA-Mag II, avec plus de 50 % de réduction de la viabilité bactérienne.



**Mag II** = H-Gly-Ile-Lys-Phe-Leu-His-Ser-Ala-Lys-Lys- Phe- Gly-Lys-Ala-Phe-Val-Gly-Glu-Ile-Met-Asn-Ser-OH

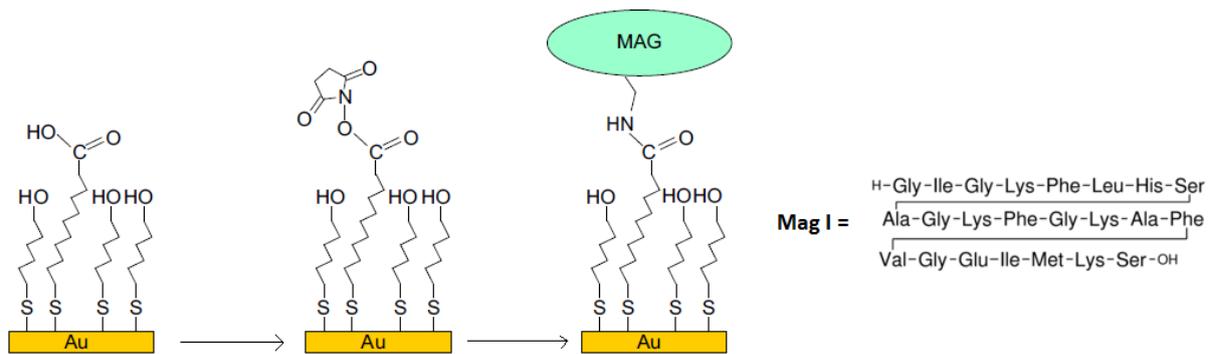
**Figure 37: Schéma de l'immobilisation de la Magainine II sur les fibres de PLGA [81]**

[81] E. Yüksel and A. Karakeçili. Antibacterial activity on electrospun poly(lactide-co-glycolide) based membranes via Magainin II grafting. *Mater. Sci. Eng. C*. 45, **2014**, 510–518.

[82] Y. Huang, J. Huang, Y. Chen. Alpha-helical cationic antimicrobial peptides: relationships of structure and function. *Protein Cell*. 1, **2010**, 143–152.

En utilisant le même principe, Humblot et coll. [83] ont réussi à fonctionnaliser une surface d'or par la Magainine I (**Figure 38**), un peptide antibactérien qui ne diffère de la Magainine II, que par deux résidus situés en position 10 et 22 de la chaîne.

La surface élaborée a montré un effet antiadhésif vis-à-vis des bactéries, *Listeria ivanovii*, *Enterococcus faecalis* et *S. aureus*, avec une inhibition de la croissance bactérienne supérieure à 50 %.



**Figure 38: Greffage de la Magainine I sur une surface d'or [83]**

### I.1.2. Les enzymes antimicrobiens

Un enzyme est une protéine dotée de propriétés catalytiques qui permet l'activation ou l'accélération de réactions biochimiques. Certains enzymes peuvent également hydrolyser des protéines ou des glycoprotéines utilisées par les espèces bactériennes pour s'attacher aux surfaces, ce qui permet d'empêcher la formation de biofilms [84]. Il existe également des enzymes qui ont la capacité de détruire la paroi cellulaire des bactéries, tel que les lysozymes [85]. Ces derniers sont des protéines globulaires d'une centaine d'acides aminés, impliqués dans la défense contre les infections bactériennes [86]. On les trouve en particulier dans un certain nombre de sécrétions [87] (larmes, salives, mucus...) et dans le blanc d'œuf [88].

[83] V. Humblot, J. F. Yala, P. Thebault, et al. The antibacterial activity of Magainin I immobilized onto mixed thiols Self-Assembled Monolayers. *Biomaterials*. 30, **2009**, 3503–3512.

[84] C. Leroy. Effects of commercial enzymes on the adhesion of a marine biofilm forming bacterium. *Biofouling*. 24, **2008**, 11-22.

[85] R. T. Ellison and T. J. Giehl. Killing of Gram-negative Bacteria by Lactoferrin and Lysozyme. *J. Clin. Invest.* 88, **1991**, 1080-1091.

[86] J. M. Borrero-de Acuña, C. Hidalgo-Dumont, N. Pacheco, et al. A novel programmable lysozyme-based lysis system in *Pseudomonas putida* for biopolymer production. *Sci. Reports*. 7, **2017**, 4373.

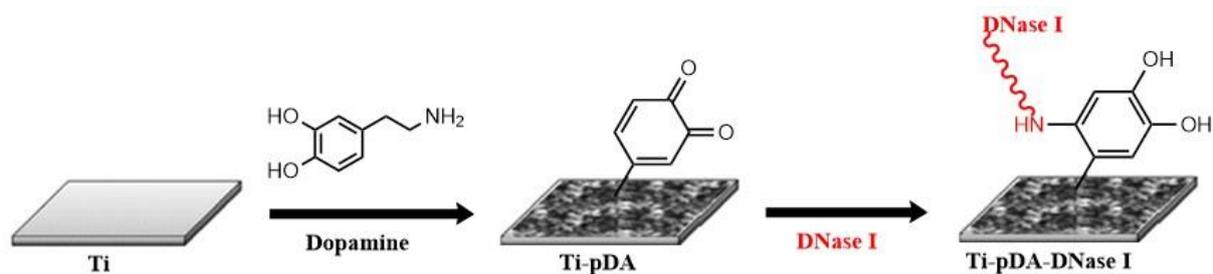
[87] R. Bonnafous and P. Raynaud. Le lysozyme dans le matériel et les sécrétions digestives chez le lapin domestique. *Reprod. Nutr. Develop.* 20, **1980**, 1273-1278.

[88] N. Sohrabi, N. Rasouli, M. Raissi. Study the Interaction of Ni Complex of Tetradentate Schiff Base Ligand with HEN Egg White Lysozyme. *Phys. Chem. Res.* 5, **2017**, 113-123.

Différents modes d'actions des enzymes sont décrits dans la littérature. Des enzymes telles que les protéases peuvent empêcher la fixation de microorganismes par hydrolyse des liaisons peptidiques, tandis que les glycosidases hydrolysent les liaisons glycosidiques, en dégradant les biofilms [89].

Des données de la littérature ont montré qu'il est possible d'exploiter l'activité biocide ou anti-biofilms des enzymes, en les fixant sur des surfaces.

Ye et coll. [90] ont immobilisé le DNase I, un enzyme qui hydrolyse les liaisons phosphodiesteres, sur une surface de titane (Ti). Pour ce faire, la surface de titane a été revêtue de dopamines puis couplée à la DNase I (**Figure 39**).



**Figure 39: Greffage de la DNase sur une surface de titane [90]**

Les propriétés antiadhésives du matériau élaboré ont été évaluées contre *Streptococcus mutans* et *Staphylococcus aureus*. Les résultats montrent que le revêtement empêche efficacement l'adhésion des bactéries et la formation de biofilm.

Visan et coll. [91] ont, quant à eux, élaboré un matériau composite à base de mélange de polyéthylène glycol (PEG) et de polycaprolactone (PCL), incorporant du lysozyme extrait de blanc d'œuf.

L'activité antibactérienne du matériau élaboré a été testée vis-à-vis de quatre souches, *E. coli*, *E. faecalis*, *B. subtilis* et *S. aureus*. Les tests microbiologiques montrent que le matériau élaboré présente une activité antibactérienne élevée, cette activité est plus importante contre les bacilles *E. coli* et *B. subtilis*.

[89] K. Glinel, P. Thebault, V. Humblot, et al. Antibacterial surfaces developed from bio-inspired approaches. *Acta Biomaterialia*. 8, 2012, 1670-1684.

[90] J. Ye, C. Shao, X. Zhang, et al. Effects of DNase I coating of titanium on bacteria adhesion and biofilm formation. *Mater. Sci. Eng. C Mater. Biol. Appl.* 1, 2017, 738-747.

[91] A. Visan, R. Cristesc, N. Stefan, et al. Antimicrobial polycaprolactone/polyethylene glycol embedded lysozyme coatings of Ti implants for osteoblast functional properties in tissue engineering. *Appl. Surf. Sci.* 417, 2017, 234-243.

Dans une même approche, Uddin et coll. [92] ont immobilisé le lysozyme extrait de blanc d'œuf, sur des aérogels préparés à partir de nanofibrilles de celluloses anioniques ou cationiques. L'aérogel cationique présente une meilleure activité antibactérienne contre *E. coli* et *S. aureus*, les taux d'inhibitions sont de 92% et 71% respectivement.

### **I.1.3. Les huiles essentielles**

Les huiles essentielles (HE) sont des substances odorantes, généralement de compositions complexes, obtenus à partir d'une matière première végétale, soit par entraînement à la vapeur d'eau, soit par distillation sèche, ou par un procédé mécanique approprié sans chauffage. L'huile essentielle est le plus souvent séparée par un procédé physique n'entraînant pas de changement significatif de sa composition [93].

Les HE sont des mélanges complexes de composés terpéniques, d'alcools, d'acides, d'esters, d'époxydes, d'aldéhydes, de cétones, d'amines et de sulfures. On peut diviser ces composés en deux groupes : les terpènes et les aromatiques.

L'appellation « huile » est due à leur très faible solubilité dans l'eau et pour certains à leur consistance, un caractère qui les rapprochent des huiles végétales. Leurs propriétés antibactériennes ont été décrites dans plusieurs études [94, 95, 96]. Dans de nombreux cas, cette activité résulte de l'interaction entre différents composés qu'elles contiennent.

Les mécanismes d'action des huiles essentielles ne sont pas complètement élucidés, leur spectre d'action est très étendu, car elles agissent contre un large éventail de bactéries, y compris celles qui développent des résistances aux antibiotiques [97]. Cette activité dépend en premier lieu du type et des caractéristiques des composants actifs, en particulier leur propriété hydrophobe. Cette dernière permet leur solubilisation dans les membranes, ce qui provoque une déstabilisation de

---

[92] M. A. K. Uddin, H. Orelma, P. Mohammadi, et al. Retention of lysozyme activity by physical immobilization in nanocellulose aerogels and antibacterial effects. *Cellulose*. 24, **2017**, 2837-2848.

[93] Huiles essentielles: <http://sciences-physiques.ac-montpellier.fr>

[94] S. A Burt and R. D Reinders. Antibacterial activity of selected plant essential oils against Escherichia coli O157:H7. *Lett. Appl. Microbiol.* 36, **2003**, 162–267.

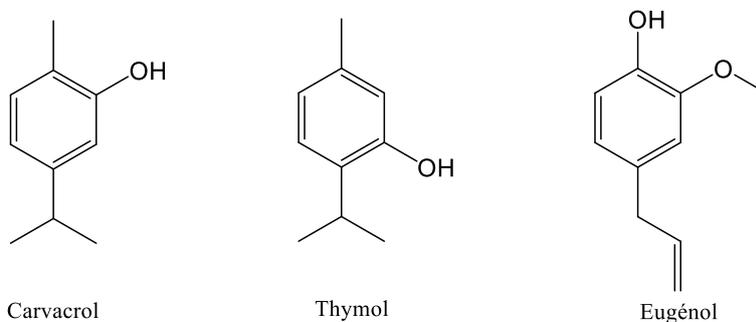
[95] S. Selim. Antimicrobial activity of essential oil against vancomycin-resistant enterococci (VRE) and echerichia coli O157:H7 in feta soft cheese and minced beef meat. *Brazilian J. Microbiol.* 42, **2011**, 187-196.

[96] B. Kpatinvoh, E. S. Adjou, E. Dahouenon-Ahoussi, et al. Efficacité des huiles essentielles de trois plantes aromatiques contre la mycoflore d'altération du niébé (*Vigna unguiculata* L., Walp) collecté dans les magasins de vente du Sud-Bénin. *J Appl Biosci.* 109, **2017**, 10680-10687.

[97] V. G. De Billerbeck. Essential oils and antibiotic-resistant bacteria. *Phytothérapie.* 5, **2007**, 249–253.

la structure et une augmentation de la perméabilité membranaire. Ces modifications entraînent une fuite d'ions et d'organites contenus dans les cellules, entraînant la mort cellulaire [98].

Les molécules possédant le coefficient antibactérien le plus élevé sont : le carvacrol, le thymol [99] et l'eugénol [100] qui appartiennent au groupe des phénols (**Figure 40**).



**Figure 40: Structure des composés impliqués dans les activités antibactériennes des huiles essentielles**

Aussi, il n'est pas étonnant de constater que les huiles essentielles riches en phénols, comme les huiles de thym, d'origan et de clou de girofle, possèdent les plus hautes activités antibactériennes [101, 102, 103, 104].

Des données de la littérature ont montré qu'il est possible d'exploiter l'activité antibactérienne de certaines huiles essentielles en les immobilisant sur des surfaces, sans que leur action ne soit réduite.

---

[98] A. Ultee, M. H. J. Bennik, R. Moezelaar. The Phenolic Hydroxyl Group of Carvacrol Is Essential for Action against the Food-Borne Pathogen *Bacillus cereus*. *Appl. Environ. Microbiol.* 68, **2002**, 1561–1568.

[99] A. Marchese, I. E. Orhan, M. Daglia, et al. Antibacterial and antifungal activities of thymol: A brief review of the literature. *Food Chemistry*. 210, **2016**, 402-414.

[100] K. P. Devi, S. A. Nisha, R. Sakthivel, et al. Eugenol (an essential oil of clove) acts as an antibacterial agent against *Salmonella typhi* by disrupting the cellular membrane. *J. Ethnopharmacol.* 130, **2010**, 107-115.

[101] K. Chaieb, H. Hajlaoui, T. Zmantar, et al. The chemical composition and biological activity of clove essential oil, *Eugenia caryophyllata* (*Syzygium aromaticum* L. Myrtaceae): a short review. *Phytoterapy research*, 21, **2007**, 501–506.

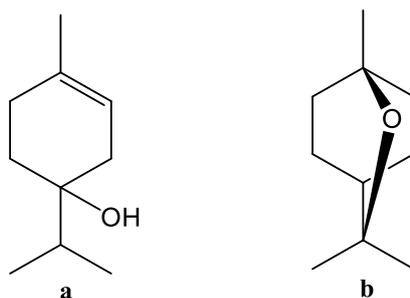
[102] I. C. Cirino, S. M. Menezes-Silva, H. T. Silva, et al. The Essential Oil from *Origanum vulgare* L. and Its Individual Constituents Carvacrol and Thymol Enhance the Effect of Tetracycline against *Staphylococcus aureus*. *Chemotherapy*. 60, **2014**, 290-293.

[103] S. M. Nabavi, A. Marchese, M. Izadi, et al. Plants belonging to the genus *Thymus* as antibacterial agents: From farm to pharmacy. *Food Chemistry*. 173, **2015**, 339–347.

[104] N. Martins, L. Barros, C. Santos-Buelga, et al. Decoction, infusion and hydroalcoholic extract of cultivated thyme: Antioxidant and antibacterial activities, and phenolic characterization. *Food Chemistry*. 167, **2015**, 131–137.

Sánchez-González et coll. [105] ont préparé un film antimicrobien par incorporation de différentes concentrations d'huile essentielle d'arbre à thé (*Melaleuca alternifolia*) dans des films de chitosan.

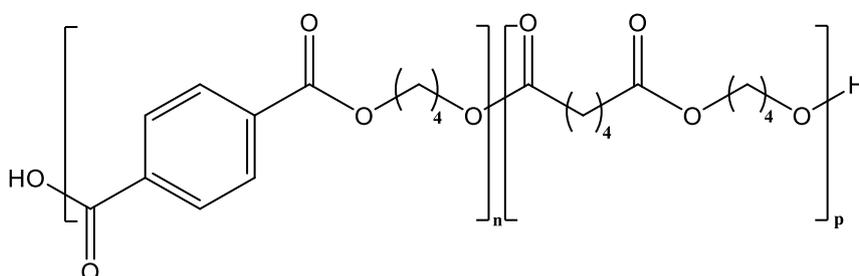
Cette huile essentielle de *Melaleuca alternifolia* est un mélange complexe d'hydrocarbures terpéniques et d'alcools tertiaires. Les principaux composés responsables de son activité antimicrobienne sont le terpinène-4-ol et le 1,8-cinéole (**Figure 41**). Le mécanisme d'action de cette huile n'est pas clairement élucidé.



**Figure 41: Structure de terpinène-4-ol (a) et de 1,8-cinéole (b)**

L'huile essentielle d'arbre à thé a été ajoutée à une solution de chitosan pour atteindre des concentrations finales de 0,5%, 1% et 2%. Les mélanges chitosan-huile essentielle ont été émulsionnés à température ambiante. L'incorporation de l'huile essentielle dans le chitosan à une concentration en masse de 0.5% a amélioré les propriétés antibactériennes des films de chitosan. Une inhibition totale de la croissance de *Listeria monocytogenes* a été observée.

Cardoso et coll. [106] ont développé un film actif par incorporation d'huile essentielle d'origan (*Origanum vulgare*) dans du polybutyrate adipate téréphtalate (PBAT) (**Figure 42**), un polyester biodégradable.



**Figure 42: Structure du polybutyrate adipate téréphtalate (PBAT)**

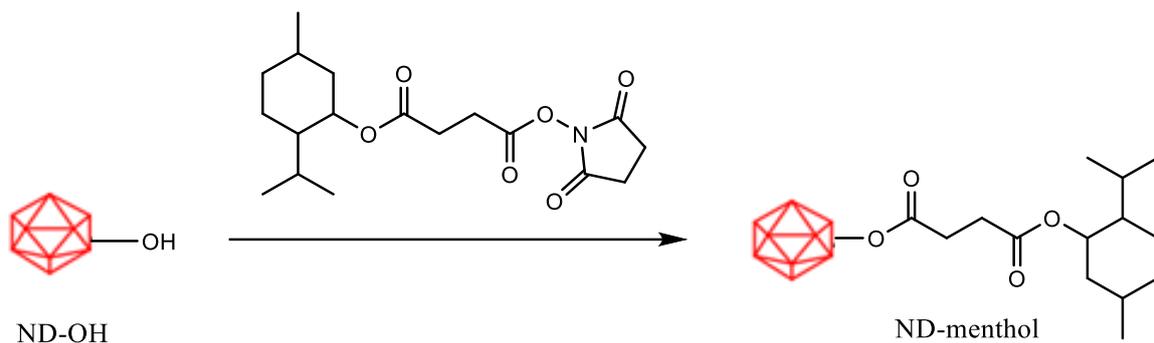
[105] L. Sánchez-González, C. González-Martínez, A. Chiralt, et al. Physical and antimicrobial properties of chitosan–tea tree essential oil composite films. *J. Food Eng.* 98, **2010**, 443–452.

[106] L. G. Cardoso, J. C. P. Santos, G. P. Camilloto, et al. Development of active films poly (butylene adipate co-terephthalate) – PBAT incorporated with oregano essential oil and application in fish fillet preservation. *Industrial Crops and Products.* 108, **2017**, 388–397.

L'huile essentielle d'origan contient majoritairement le thymol et le carvacrol, elle possède des propriétés antibactériennes, antivirales et fongicides. Les films de PBAT et l'huile essentielle ont été mélangés manuellement puis traités par extrusion thermofusible. Le matériau élaboré présentait une activité antibactérienne élevée contre *S. aureus*. Il peut être utilisé comme emballage actif et biodégradable pour la préservation des aliments.

Cependant, la volatilité des huiles essentielles limite leur activité antibactérienne lorsqu'elles sont incorporées ou déposées sur des matériaux. De plus leur forte odeur contribue à la limitation de leur utilisation [107, 108]. Afin d'éliminer le problème de volatilité, plusieurs recherches se sont orientées vers l'immobilisation de composés d'huile essentielle par liaison covalente sur divers matériaux sans que leur activité ne soit réduite.

Dans cette optique, Turcheniuk et coll. [109] ont greffé le menthol, un terpénoïde présent dans les huiles essentielles des menthes, sur des particules de nanodiamant par une liaison covalente (**Figure 43**). Le but étant de développer un biocide actif contre les biofilms. La modification de ce matériau a été effectuée en solution aqueuse.



**Figure 43: Greffage du menthol sur la surface de nanodiamant [109]**

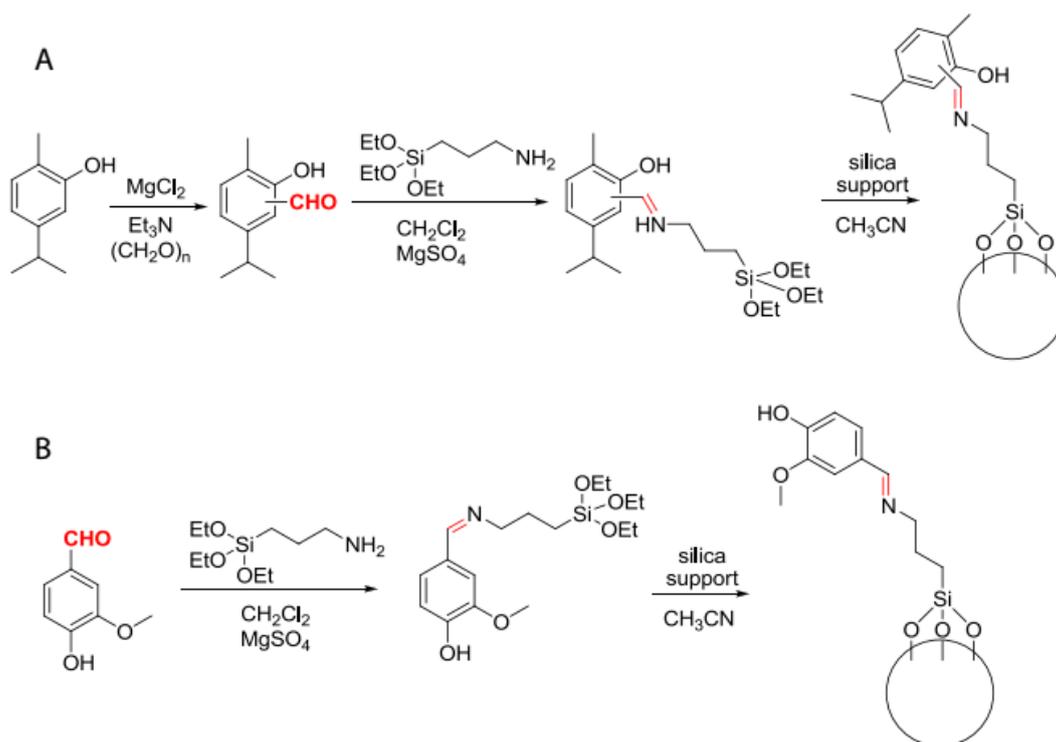
Les tests microbiologiques effectués sur *S. aureus* et *E. coli* révèlent que le matériau obtenu (ND-menthol) présente une activité anti biofilm élevée à une concentration de 100 µg/ml. Cette activité est supérieure à celle du menthol libre et similaire à l'ampicilline, un antibiotique connu.

[107] K. Hąc-Wydro, M. Flasiński, K. Romanczuk. Essential oils as food eco-preservatives: Model system studies on the effect of temperature on limonene antibacterial activity. *Food Chemistry*. 235, **2017**, 127-135

[108] R. Ribeiro-Santos. Application of encapsulated essential oils as antimicrobial agents in food packaging. *Curr. Opin. Food Sci.* 14, **2017**, 78-84

[109] V. Turcheniuk, V. Raks, R. Issa, et al. Antimicrobial activity of menthol modified nanodiamond particles. *Diam. Relat. Mater.* 57, **2015**, 2-8.

Un autre type de support a été utilisé par M. Ruiz-Rico et coll. [110] qui ont fixé le carvacrol, l'eugénol, le thymol et la vanilline, sur trois types de supports de silice (silice sublimée, silice amorphe et silice mésoporeuse) afin de développer une nouvelle surface antimicrobienne (**Figure 44**).



**Figure 44: Schéma générale du greffage de composés d'huiles essentielles sur une surface de silice, A : greffage du carvacrol ; B : greffage de la vanilline [110]**

L'activité antibactérienne des supports obtenus a été réalisée sur deux souches bactériennes, *Listeria innocua*, et *E. coli*. Les supports élaborés par immobilisation de vanilline ne présentaient pas d'activité antibactérienne. Cependant, les supports obtenus avec fixation du carvacrol, thymol ou eugénol présentaient une activité élevée contre *L. innocua*.

*E. coli* quant à elle a été très sensible aux matériaux élaborés par fixation du thymol ou eugénol. Pour les deux souches, l'activité des supports de silice obtenus a été supérieure à celle des composés d'huiles essentielles à leur état libre.

Des nanoparticules de silice mésoporeuses ont également été utilisées par Ribes et coll. [111] pour supporter l'eugénol ou le thymol. L'évaluation de l'activité antifongique des agents bioactifs

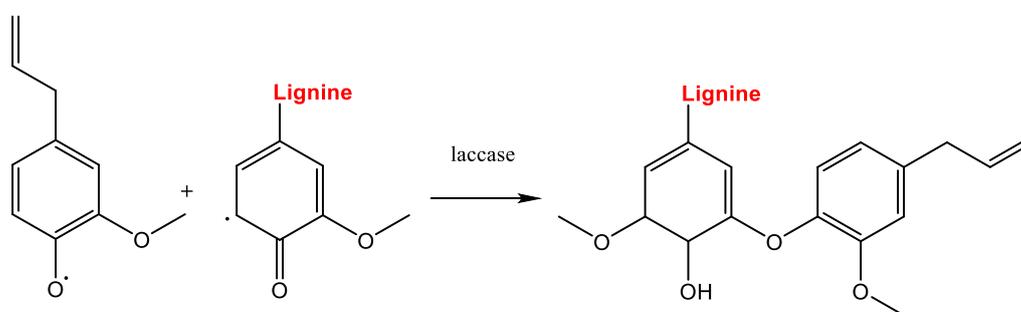
[110] M. Ruiz-Rico, E. Pérez-Esteve, A. Bernardos, et al. Enhanced antimicrobial activity of essential oil components immobilized on silica particles. *Food Chem.* 233, **2017**, 228–236.

[111] S. Ribes, M. Ruiz-Rico, É. Pérez-Esteve, et al. Eugenol and thymol immobilized on mesoporous silica-based material as an innovative antifungal system: Application in strawberry jam. *Food Control.* 81, **2017**, 181-188.

immobilisés a été réalisée contre *Aspergillus flavus*, *Aspergillus niger*, *Penicillium expansum*, *Zygosaccharomyces rouxii* et *Zygosaccharomyces bailii*. Les nanoparticules élaborées présentaient une activité fongicide élevée.

Les auteurs ont par la suite examiné l'efficacité antifongique des agents bioactifs libres et immobilisés, contre *Aspergillus niger* et *Zygosaccharomyces bailii* dans la confiture de fraise. Les résultats ont montré que lorsqu'ils sont incorporés à l'état libre, l'eugénol induit une meilleure conservation de la confiture de fraises en termes de détérioration des champignons par rapport au thymol. Cependant, après l'immobilisation sur les nanoparticules de silice, les deux agents bioactifs ont montré une activité antifongique élevée.

Thakur et coll. [112] quant à eux, ont greffé l'eugénol, sur les fibres de coco riche en lignine en utilisant la laccase comme catalyseur (**Figure 45**).



**Figure 45: Greffage d'eugénol sur les fibres de coco [112]**

L'activité antibactérienne du matériau élaboré a été évalué contre *E. coli* et *S. aureus*. Cette activité est plus importante contre *E. coli*. Le nombre de bactéries dénombrées après 24h de contact était de  $44 \times 10^9$  UFC/mL pour *E. coli* et de  $224 \times 10^9$  UFC/mL pour *S. aureus*.

L'immobilisation des composés d'huiles essentielles ne limite pas leur activité antibactérienne comme le montre les exemples précédents. De plus, des études ont montré que le développement de résistance bactérienne vis-à-vis des huiles essentielles est improbable [113]. En effet, tout changement qui pourrait rendre les membranes bactériennes résistantes aux huiles essentielles, aura probablement aussi un impact négatif sur le fonctionnement normal de cette membrane. De plus l'utilisation de certains composés d'huiles essentielles comme le thymol et le carvacrol

[112] K. Thakur, S. Kaliab, B.S. Kaith, et al. The development of antibacterial and hydrophobic functionalities in natural fibers for fiber-reinforced composite materials. *J. Environ. Chem. Eng.* 4, **2016**, 1743–1752.

[113] C. G. Sokolik, R. Ben-Shabat-Binyamini, A. Gedanken, et al. Proteinaceous microspheres as a delivery system for carvacrol and thymol in antibacterial applications. *Ultrason Sonochem.* 41, **2018**, 288-296.

réduit la résistance des bactéries aux antimicrobiens. Palaniappan et coll. [114] ont étudié l'effet de l'utilisation des composés d'huile essentielles en mélange avec des antibiotiques pour augmenter leur efficacité. Pour cela, ils ont utilisé six antibiotiques, la tétracycline, l'ampicilline, la pénicilline G, l'érythromycine, la bacitracine et la novobiocine, et cinq composés d'huile essentielles, l'eugénol, le carvacrol, le thymol, le cinnamaldéhyde et l'isothiocyanate d'allyle.

Les tests antibactériens ont été réalisés contre quatre souches bactériennes: *Salmonella Typhimurium* et *E. coli*, résistantes aux six antibiotiques utilisés, *S. aureus* résistants à trois antibiotiques parmi les six utilisés (l'ampicilline, la pénicilline et la bacitracine) et *Streptococcus pyogenes* résistant uniquement à l'érythromycine.

Les résultats ont montré que les composés d'huiles essentielles, notamment le thymol et le carvacrol, en combinaison avec les antibiotiques étudiés, étaient capables d'augmenter la sensibilité des souches étudiées aux antibiotiques auxquels elles présentaient une résistance.

Comme le montre cette étude de la littérature, les huiles essentielles présentent une activité antibactérienne, qu'elles soient libres ou greffées sur supports. De plus, ces études ont montré que le développement de résistance bactérienne vis-à-vis des huiles essentielles était improbable.

En se basant sur ces données de la littérature, nous nous sommes intéressés au greffage de composés d'huiles essentielles sur les fibres de pâte à papier.

## **II. Elaboration de nouveaux matériaux bioactifs par greffage de composés d'huiles essentielles sur les fibres de pâte kraft [115]**

Comme nous l'avons souligné précédemment, certains composés d'huiles essentielles présentent une activité antibactérienne élevée contre un grand nombre de bactéries, c'est le cas du thymol et du carvacrol. Nous avons donc choisi de greffer ces deux composés sur la pâte à papier et nous avons commencé par la pâte issue du procédé kraft.

### **II.1. Stratégie de synthèse**

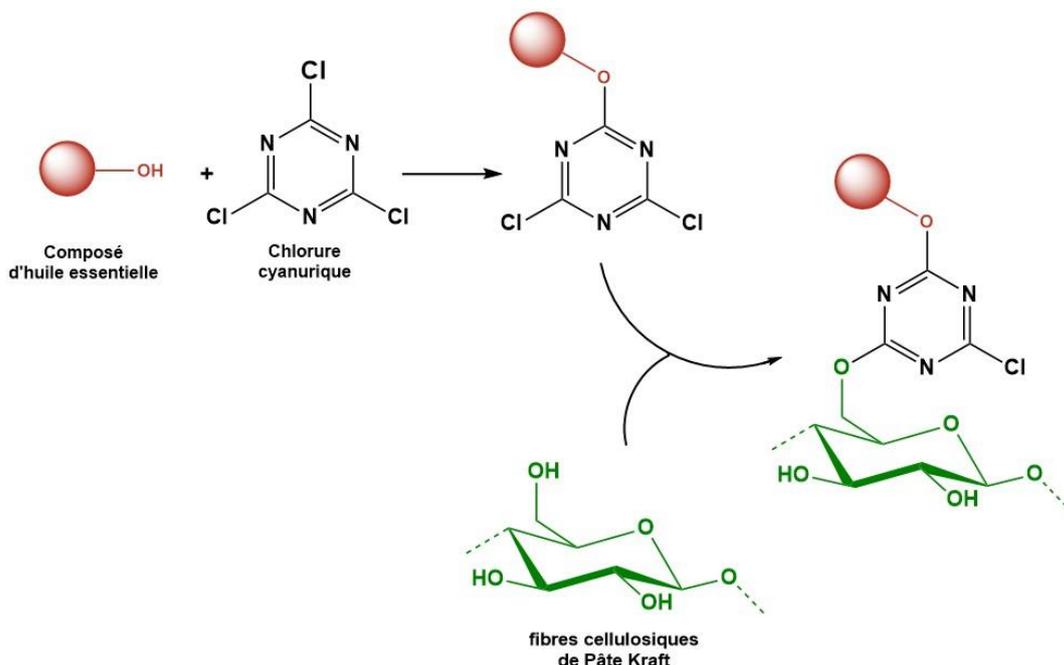
La stratégie de synthèse mise en œuvre comporte deux étapes. Elle débute par la fixation du composé d'huile essentielle (CHE) sur le noyau triazine, par substitution d'un chlore du

---

[114] K. Palaniappan and R. A. Holley. Use of natural antimicrobials to increase antibiotic susceptibility of drug resistant bacteria. *Int. J. Food Microbiol.* 140, **2010**, 164-8.

[115] Z. Khaldi, T.S. OUK, R. Zerrouki. Synthesis and antibacterial properties of thymol and carvacrol grafted onto lignocellulosic kraft fibers. *J. Bioact. Compat. Pol.* **2018**, 1-13.

chlorure cyanurique. Le composé obtenu est greffé sur la pâte Kraft lors d'une seconde étape, en substituant un deuxième chlore de la triazine (**Figure 46**).



**Figure 46: Schéma de greffage de composés d'huiles essentielles sur les fibres de pâte Kraft**

## II.2. Mono substitution de la triazine

### II.2.1. Fixation du thymol sur la triazine

Afin d'immobiliser le thymol sur la pâte Kraft, nous nous sommes intéressés dans un premier temps, à sa fixation sur le noyau triazine. Avant de présenter la synthèse et la caractérisation du produit, nous nous proposons de présenter brièvement quelques aspects du chlorure cyanurique utilisé.

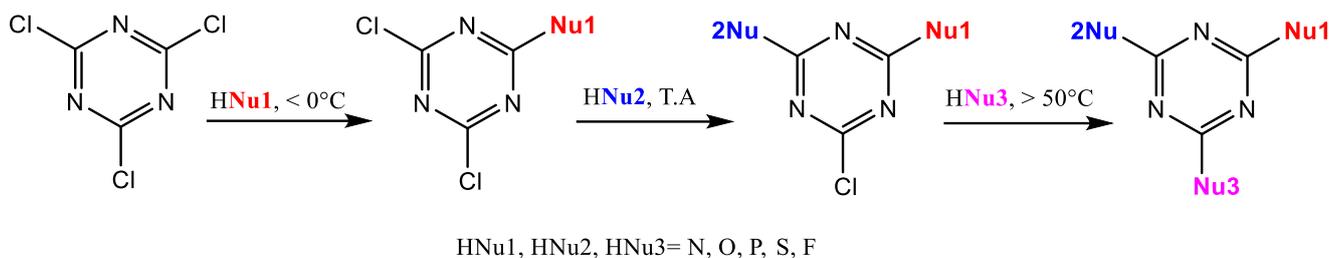
#### Le chlorure cyanurique :

Le chlorure cyanurique ou le 2,4,6-trichloro-1,3,5-triazine, est un composé connu depuis 1827. Ce réactif est disponible commercialement à très faible coût et est associé à différents domaines tel que la coloration du textile, la synthèse de pesticides, la synthèse de médicaments ainsi que la conception de surfaces bioactives [116, 117].

[116] Z. Jiang, M. Qiao, X. Ren, et al. Preparation of antibacterial cellulose with s- triazine based quaternarized N-halamine. *J. Appl. Polym. Sci.* 134, **2017**.

[117] Z. Jiang. Synthesis of novel reactive N-halamine precursors and application in antimicrobial cellulose. *Appl. Surf. Sci.* 288, **2014**, 518-523.

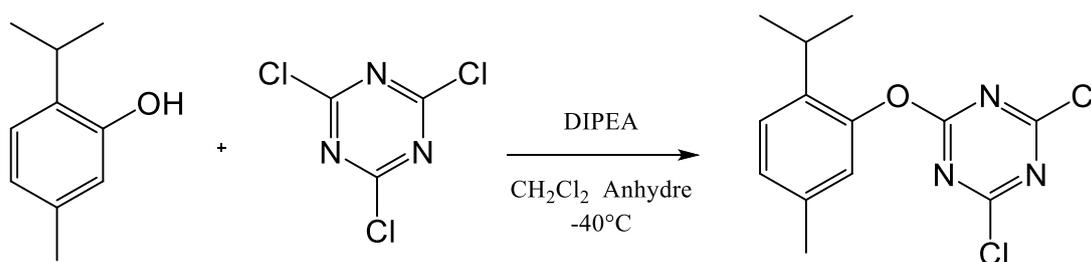
La triazine chlorée est très utilisée dans les substitutions nucléophiles séquentielles contrôlées. Cela est dû à la réactivité régiosélective des trois atomes de chlore en position 2, 4 et 6 qui dépend de la température, permettant ainsi de contrôler la mono, di ou tri-substitution de la triazine (**Figure 47**). En général, la mono-substitution de chlorure cyanurique nécessite des températures inférieures à 0°C, la di-substitution se produit à température ambiante, alors que la tri-substitution nécessite des températures au-dessus de 50 °C [118].



**Figure 47: Réactivité thermo-dépendante du chlorure cyanurique**

La substitution du chlorure cyanurique dépend également de la structure du nucléophile, de sa basicité et des facteurs stériques du substituant déjà présent sur l'anneau 1,3,5-triazine.

Pour réaliser la synthèse du thymol-triazine, le thymol est solubilisé dans le dichlorométhane anhydre en présence de 1 éq. de N, N-Diisopropyléthylamine (DIPEA), puis mis à réagir avec 1,05 éq. de chlorure cyanurique. Dans notre cas, des essais réalisés à 0°C, -10°C, -20°C et -30°C ont abouti à la formation d'un mélange de triazine mono- et di-substituée. La réaction réalisée à -40°C (**Figure 48**), conduit à la formation d'un seul produit résultant de la mono-substitution.



**Figure 48: Schéma de synthèse du thymol-triazine**

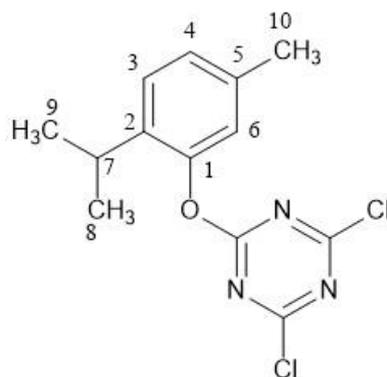
La réaction est suivie par CCM, après 5 min on observe la disparition totale du thymol et la formation d'un seul produit. La réaction est alors arrêtée et le mélange réactionnel dilué dans le

[118] G. Blotny. Recent applications of 2,4,6-trichloro-1,3,5-triazine and its derivatives in organic synthesis. *Tetrahedron*. 62, **2006**, 9507-9522.

dichlorométhane puis lavé à l'eau. Après séchage de la phase organique et évaporation du solvant, le produit est récupéré sous forme d'huile jaune avec un rendement brut quantitatif.

L'analyse par spectroscopie RMN du proton et par spectrométrie de masse montre la présence de traces de DIPEA. Afin de caractériser le produit, une fraction de ce dernier est purifiée par chromatographie sur couche mince préparative. Le rendement de purification est de 79%.

L'analyse du produit purifié par RMN du proton dans le DMSO-d<sub>6</sub> (**tableau 2**) montre la présence des protons des méthyles de l'isopropyle qui résonnent à 1,15 ppm sous la forme d'un doublet et le proton du CH qui résonne quant à lui à 3,01 ppm sous la forme d'un septuplet. Les protons du méthyle liés à l'aromatique résonnent à 2,3 ppm sous la forme d'un singulet. Enfin, les protons aromatiques résonnent entre 6,99 ppm et 7,25 ppm.

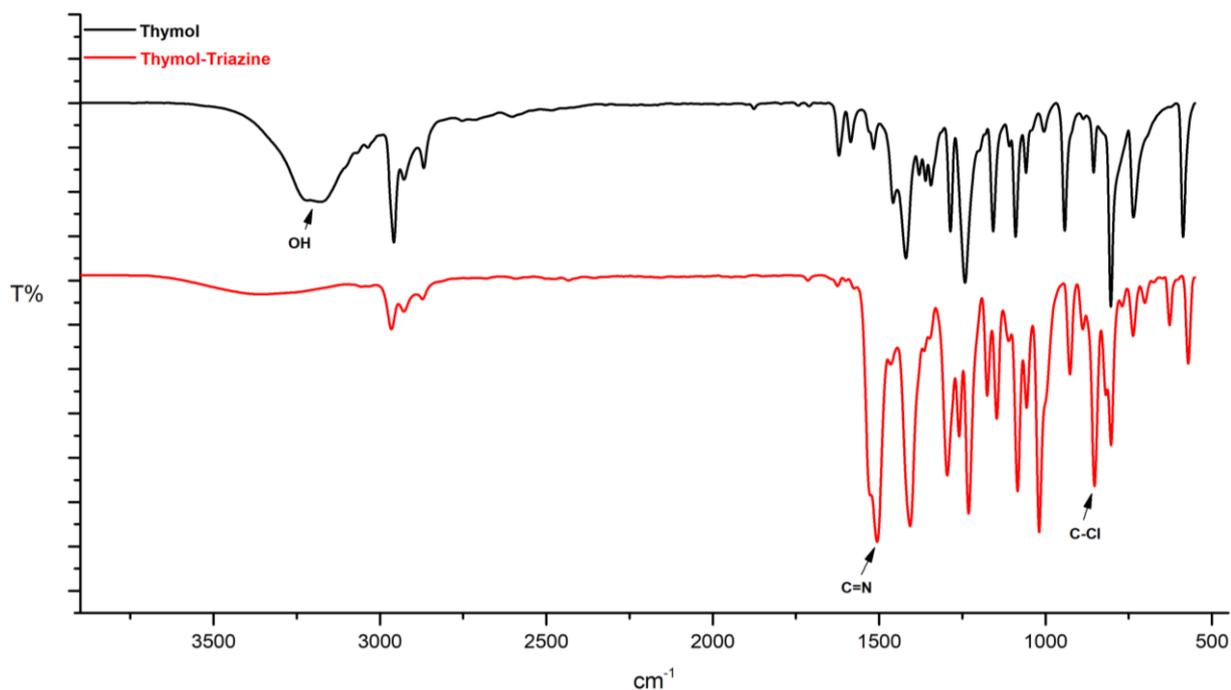


**Tableau 2: RMN <sup>1</sup>H du Thymol-triazine dans le DMSO-d<sub>6</sub>**

Déplacement Chimique (ppm)	Multiplicité	Attribution	J(Hz)
1,15	Doublet	H8 et H9	7,4
2,3	Singulet	H10	-
3,01	Septuplet	H7	7,3
6,99	Singulet élargi	H6	-
7,08	Doublet dédoublé	H4	2,5 et 8,1
7,25	Doublet	H3	8,2

L'analyse par spectrométrie de masse confirme la structure du produit obtenu. Elle met en évidence la présence des pics  $m/z$  à 298, 300 et 302, qui correspondent à la molécule protonée  $[M+H]^+$ . Les différents pics sont dû aux deux isotopes du chlore.

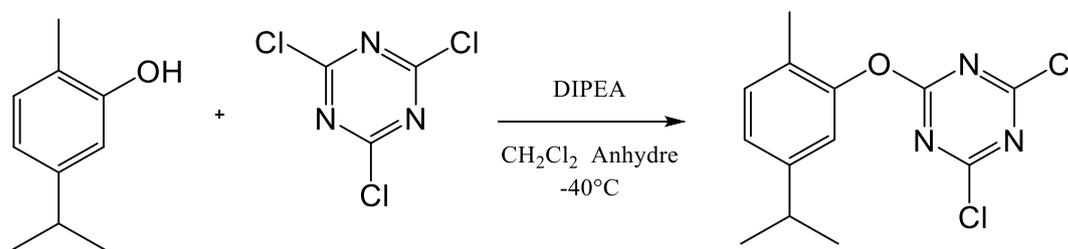
L'analyse par spectroscopie IR du Thymol-Triazine a été réalisée (**Figure 49**) et comparée au spectre du thymol. On observe la disparition de la bande caractéristique de la vibration OH à  $3204\text{ cm}^{-1}$ , ainsi que l'apparition d'une bande à  $1520\text{ cm}^{-1}$ , caractéristique de la liaison C=N et une bande à  $820\text{ cm}^{-1}$  caractéristique de la liaison C-Cl.



**Figure 49: Spectre IR du thymol et du Thymol-Triazine**

## II.2.2. Fixation du carvacrol sur la triazine

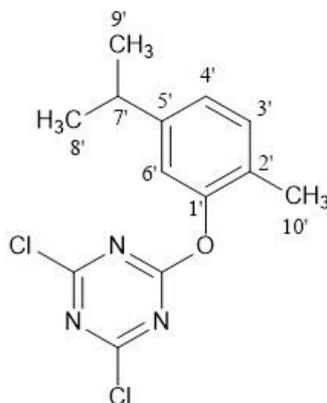
Le protocole de fixation du carvacrol sur la triazine chlorée est similaire à celui décrit pour la synthèse du thymol-triazine (**Figure 50**). Le produit a été obtenu sous forme de cristaux verts avec un rendement de 98 %.



**Figure 50: Schéma de synthèse du carvacrol-triazine**

Afin de caractériser le produit obtenu, une fraction de ce dernier a également été purifiée par chromatographie sur couche mince préparative. Le rendement de purification est de 68%.

Le spectre RMN du proton dans le DMSO-d<sub>6</sub> (**Tableau 3**) montre la présence des protons des méthyles de l'isopropyle qui résonnent à 1,19 ppm et les protons du méthyle liés à l'aromatique résonnent à 2,11 ppm ainsi que le proton (CH) de l'isopropyle à 2,88 ppm. Les protons aromatiques résonnent entre 7 ppm et 7,3 ppm.



**Tableau 3: RMN <sup>1</sup>H du carvacrol-triazine dans le DMSO-d<sub>6</sub>**

Déplacement Chimique (ppm)	Multiplicité	Attribution	J(Hz)
1,19	Doublet	H8' et H9'	6,9
2,11	Singulet	H10'	-
2,88	Septuplet	H7'	6,95
7,08	Doublet dédoublé	H4'	9,05 et 1,65
7,23	Singulet élargi	H6'	-
7,25	Doublet	H3'	9,10

L'analyse par spectrométrie de masse confirme la structure et met en évidence la présence des pics  $m/z$  à 298, 300 et 302 qui correspondent à la molécule protonée  $[M+H]^+$ . Les différents pics sont dû aux deux isotopes du chlore.

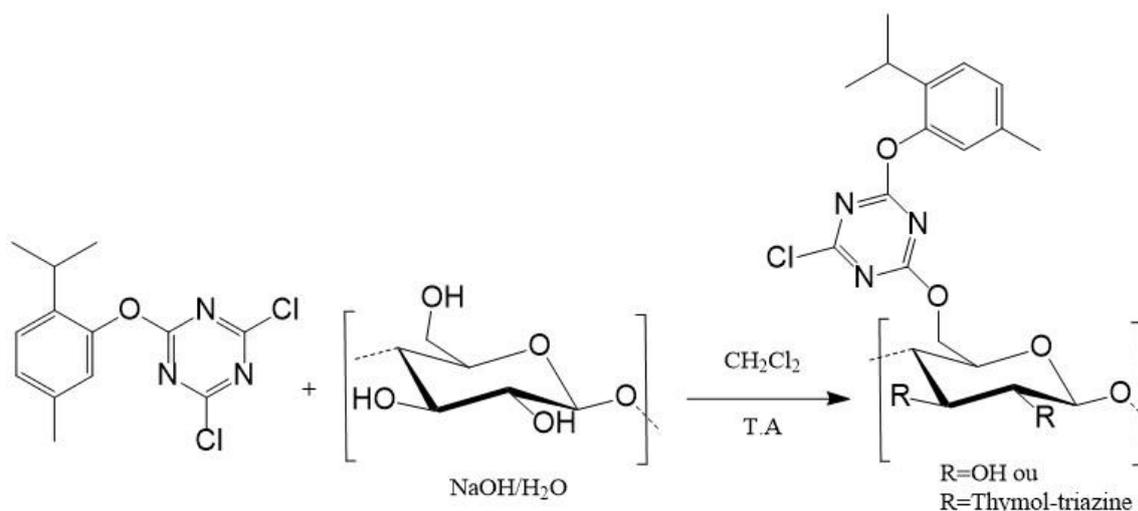
Comme dans le cas du thymol, l'analyse par spectroscopie infrarouge, montre la disparition de la bande caractéristique de la vibration OH à  $3205\text{ cm}^{-1}$ , ainsi que l'apparition d'une bande à  $1521\text{ cm}^{-1}$ , caractéristique de la liaison C=N et une bande à  $821\text{ cm}^{-1}$  caractéristique de la liaison C-Cl.

### II.3. Fonctionnalisation de la pâte Kraft

Nous avons par la suite, couplé le thymol-triazine et le carvacrol-triazine à la pâte Kraft par substitution d'un deuxième chlore du chlorure cyanurique.

### II.3.1. Greffage du thymol-triazine sur les fibres de pâte Kraft

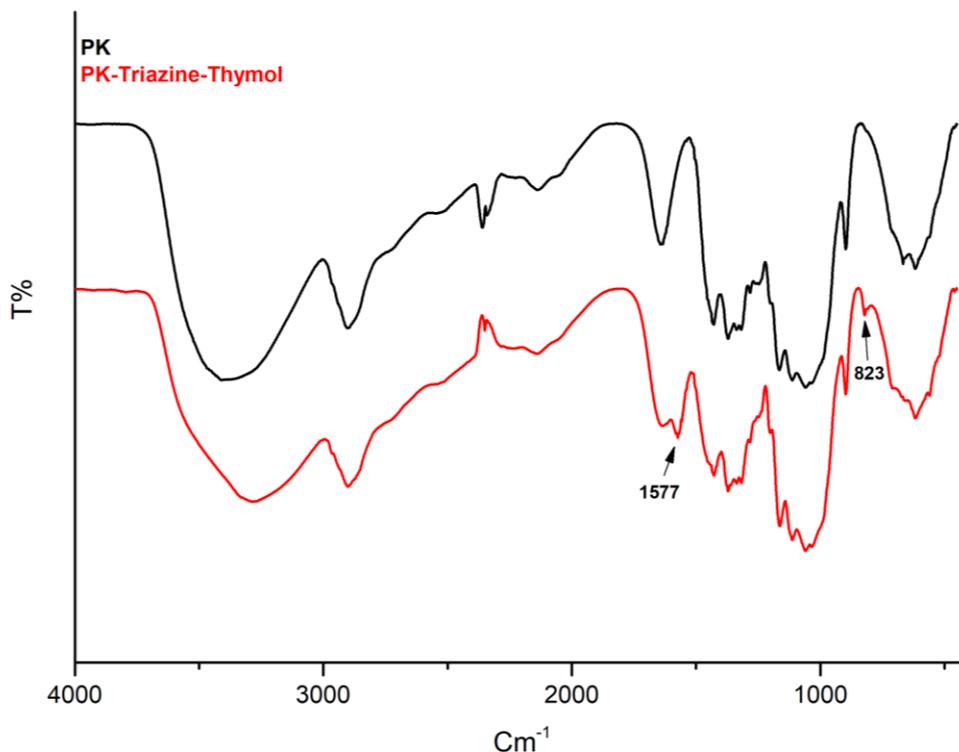
Le greffage du thymol-triazine sur les fibres de pâte Kraft a été réalisé selon une méthode décrite dans la littérature par Mbakidi et coll. [73]. Les fibres de pâte Kraft sont dispersées dans une solution de NaOH à 0,5 M. Après 24h sous agitation magnétique, le thymol-triazine (1,5 éq./UAG), préalablement dissous dans le dichlorométhane, est ajouté (**Figure 51**).



**Figure 51: Schéma de greffage du thymol-triazine sur les fibres de pâte kraft**

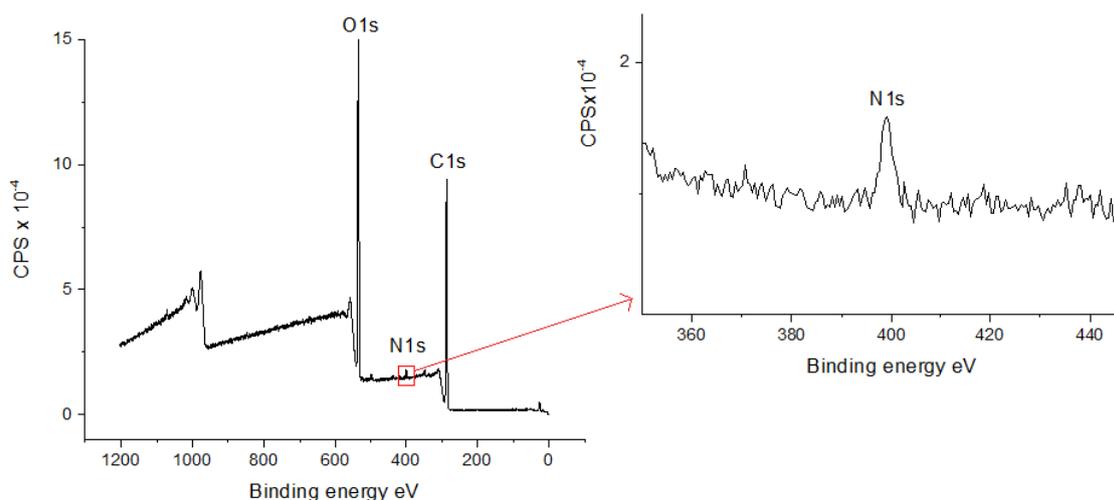
Après 48h de réaction à température ambiante, le mélange est filtré et la pâte Kraft modifiée obtenue, est lavée au dichlorométhane afin d'éliminer tout le thymol-triazine libre, à l'eau jusqu'à pH neutre, et à l'éthanol puis séchée à l'étuve à 60°C. On obtient des fibres blanches avec un rendement massique de 101 %.

L'analyse par spectroscopie infrarouge des fibres obtenues (**Figure 52**), révèle la présence d'une bande caractéristique de l'élongation C-Cl se situant à 823 cm<sup>-1</sup>, et une bande caractéristique de l'élongation C=N à 1577 cm<sup>-1</sup> du lien triazine, confirmant ainsi la fixation du thymol-triazine sur la pâte kraft.



**Figure 52: Spectre IR de la PK greffée par le thymol-triazine**

L'analyse par spectroscopie photoélectronique par rayons X (XPS), montre la présence d'atomes d'oxygène à 533,15 eV (O1s), de carbone à 286,74 eV (C1s) et d'azote à 399,20 eV (N1s) (**Figure 53**). Le chlore n'a pas été détecté, ceci est sûrement dû à la faible quantité du thymol-Triazine fixée.



**Figure 53: Spectre XPS de la pâte Kraft greffée par le thymol-triazine**

**Tableau 4 : Analyses XPS de PK-Triazine-Thymol**

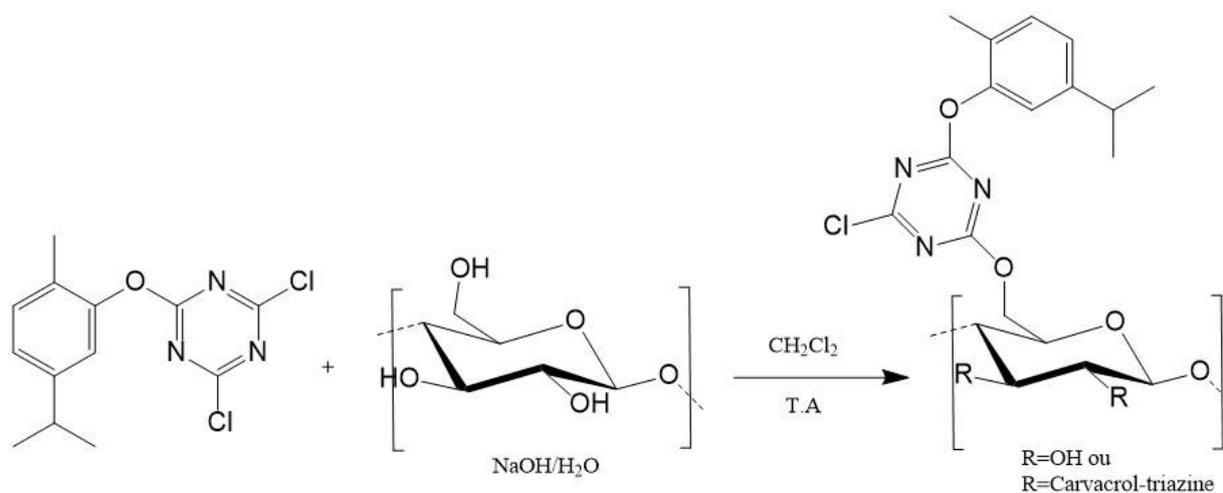
	O 1s	C 1s	N 1s	DS
<b>PK</b>	36,0%	64,0%	-	-
<b>PK-Triazine-Thymol</b>	35,9%	62,8%	1,4%	0,07

L'apparition du pic correspondant à l'atome d'azote sur le spectre, confirme le greffage du thymol-triazine.

En assimilant les fibres de pâte kraft à 100% de fibres de cellulose, un DS d'environ 0,07 est déterminé.

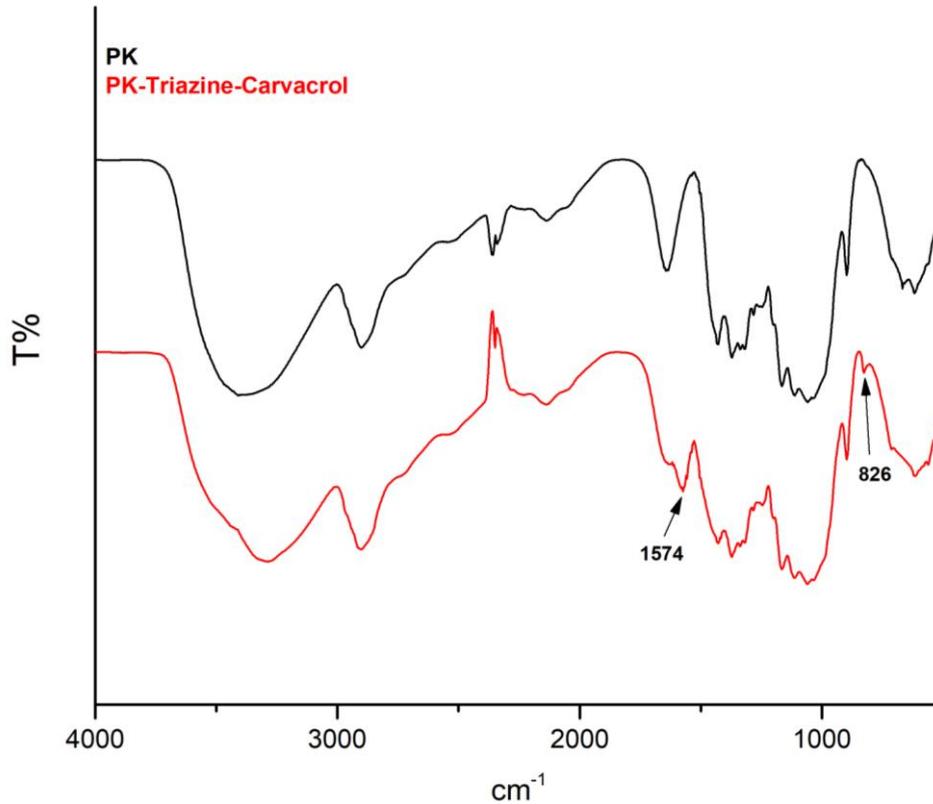
### II.3.2. Greffage du carvacrol-triazine sur la pâte Kraft

Nous avons procédé au greffage du carvacrol sur la pâte Kraft, comme décrit précédemment (**Figure 54**). Après traitement et séchage à l'étuve de la pâte Kraft modifiée, nous avons obtenu des fibres blanches avec un rendement massique de 102%.



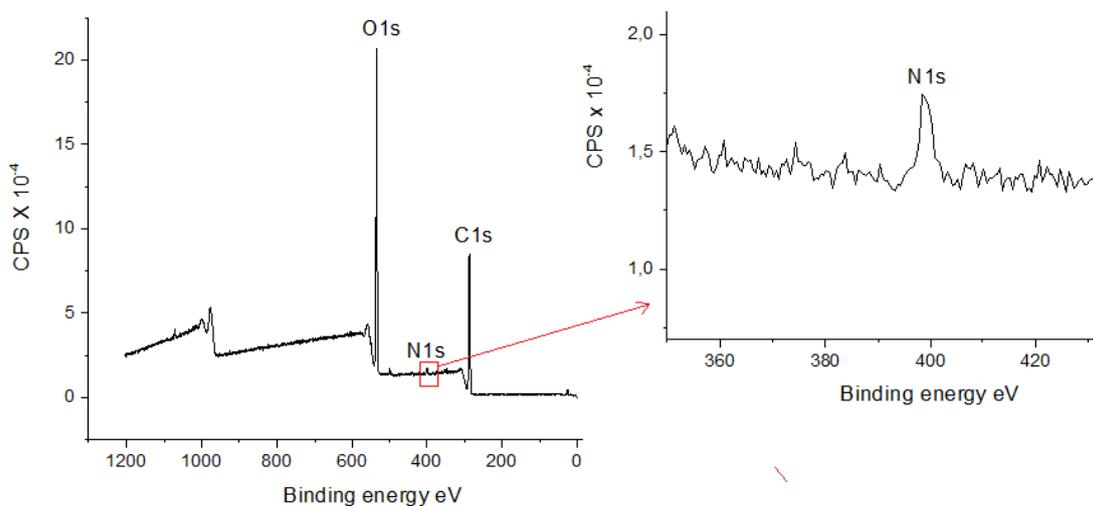
**Figure 54: Greffage du carvacrol-triazine sur la pâte Kraft**

Comme dans le cas précédent, l'analyse du spectre infrarouge (**Figure 55**), révèle la présence de deux bandes caractéristiques de l'élongation C-Cl à  $826\text{ cm}^{-1}$  et de l'élongation C=N, à  $1574\text{ cm}^{-1}$ , ce qui confirme la fixation du carvacrol-triazine sur la pâte Kraft.



**Figure 55: Spectre IR de la pâte Kraft greffée par le carvacrol-triazine**

L'analyse par XPS montre la présence d'atomes d'oxygène à 533,09 eV (O1s), de carbone à 286,70 eV (C1s) et d'azote à 399,26 eV (N1s) (**Figure 56**). Un DS de 0,07 a été déterminé, identique à celui obtenu lors du greffage du thymol-triazine (**Tableau 5**). Dans ce cas également, le chlore n'a pas été détecté.



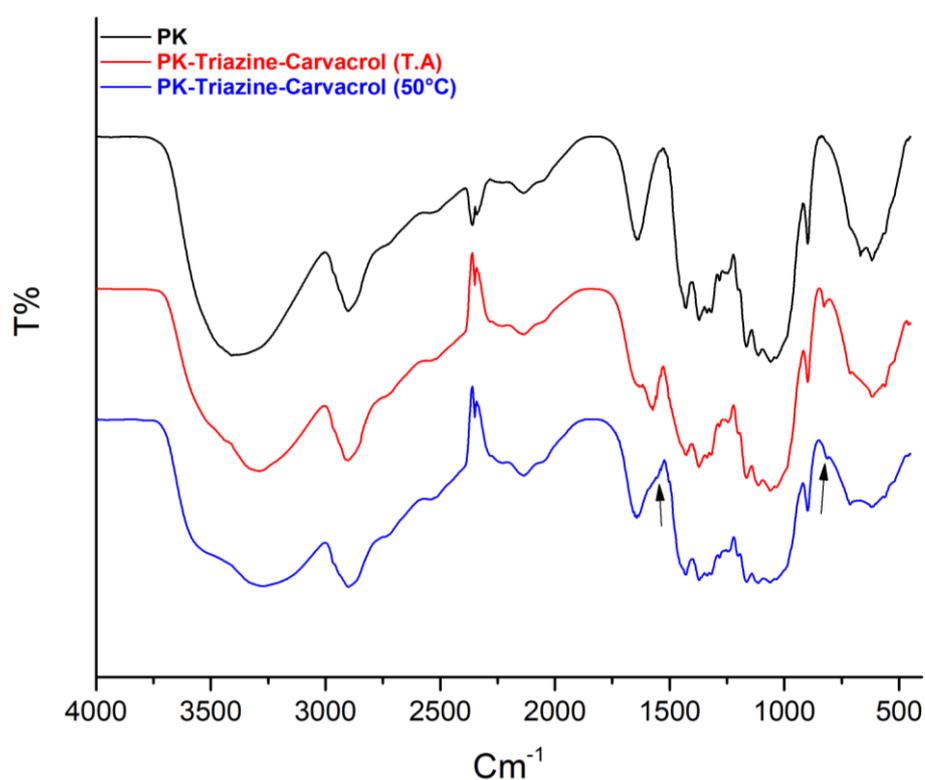
**Figure 56: Spectre XPS de la pâte Kraft greffée par le carvacrol-triazine**

**Tableau 5: Résultats d'analyses XPS de la pâte Kraft et du matériau PK-Triazine-Carvacrol**

	O 1s	C 1s	N 1s	DS
<b>PK</b>	36,0%	64,0%	-	-
<b>PK-Triazine-Carvacrol</b>	35,4%	63,1%	1,5%	0,07

Nous avons greffé le thymol-triazine et le carvacrol-triazine sur les fibres de pâte kraft avec un DS d'environ 0,07, ce greffage est réalisé à température ambiante. Dans certains cas, lorsque la première molécule greffée sur le noyau triazine présente un encombrement, la substitution du deuxième chlore nécessite des températures plus élevées. Nous avons donc réalisé des essais à 40°C et 50°C afin d'augmenter le DS du greffage du thymol et du carvacrol sur les fibres de pâte Kraft sans les dégrader. Nous avons remarqué dans des travaux précédents que des températures supérieures à 50°C entraînaient une dégradation des fibres.

L'analyse par spectroscopie infrarouge montre que le taux de greffage est inférieur à celui obtenue à température ambiante. Comme le montre la **figure 57**, dans le cas du matériau PK-Triazine-Carvacrol par exemple, on observe un épaulement vers 820 cm<sup>-1</sup> et 1570 cm<sup>-1</sup>, en comparaison avec le matériau PK-Triazine-Carvacrol obtenue à température ambiante où les bandes caractéristiques du greffage sont bien définies.



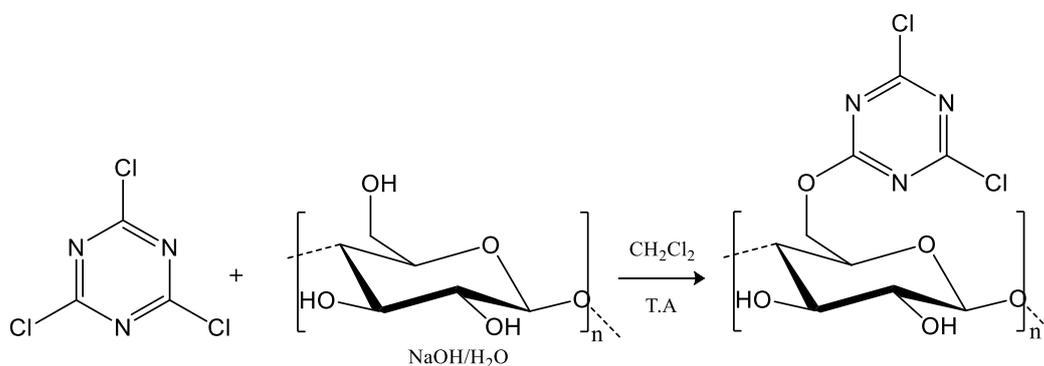
**Figure 57: Spectre IR du matériau PK-Triazine-Carvacrol à T.A et à 50 °C**

Nous avons donc poursuivi le travail par l'évaluation de l'activité antibactérienne des matériaux de pâte Kraft greffé avec le thymol et celle avec le carvacrol, à température ambiante. Pour cela, des feuilles ont été préparées à partir de ces derniers et des tests microbiologiques ont été effectués sur ces feuilles.

## II.4. Evaluation de l'activité microbiologique

Les tests microbiologiques ont été réalisés sur deux souches bactériennes : une souche Gram négatif, *E. coli* CIP54.8T, et une souche Gram positif, *S. aureus* CIP 7625. Ces souches ont été obtenues auprès de la « Collection Institut Pasteur » de l'institut Pasteur de Paris.

Au cours de ces tests, nous avons utilisé comme contrôles la pâte Kraft non modifiée (PK) et la pâte Kraft-triazine (PK-Triazine). En effet, la triazine libre est connue pour avoir un effet antimicrobien [119, 120, 121]. Nous avons ainsi voulu vérifier l'activité du lien triazine sur la pâte Kraft. Nous avons donc fixé le chlorure cyanurique sur les fibres de pâte kraft. Pour ce faire, les fibres de pâte Kraft sont dispersées dans une solution de NaOH à 0,5 M. Après 24h sous agitation magnétique, le chlorure cyanurique (1,5 éq./UAG), préalablement dissous dans le dichlorométhane, est ajouté (**Figure 58**).



**Figure 58: Greffage du chlorure cyanurique sur la pâte kraft**

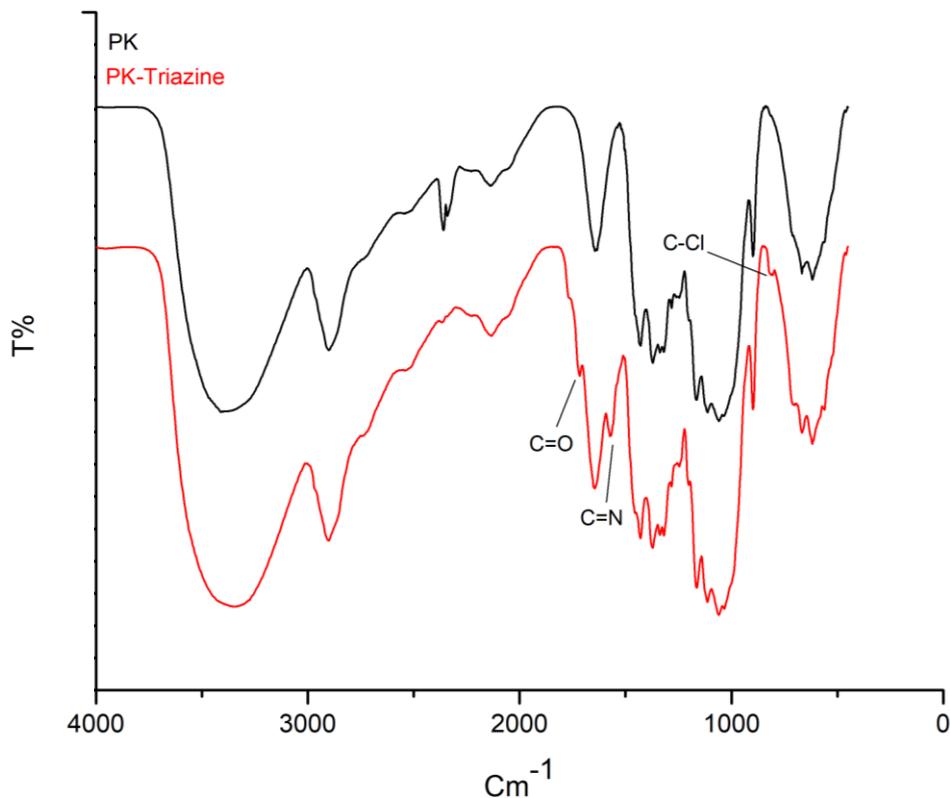
Après 48h de réaction à températures ambiante, le mélange est filtré et la pâte Kraft modifiée obtenue, est lavée au dichlorométhane, à l'eau et à l'éthanol puis séchée à l'étuve à 60°C. On obtient des fibres blanches avec un rendement massique de 102 %.

[119] R. P. Modh, E. De Clercq, C. Pannecouque, et al. Design, synthesis, antimicrobial activity and anti-HIV activity evaluation of novel hybrid quinazoline–triazine derivatives. *J. Enzyme Inhib. Med. Chem.* 29, **2014**, 100-108.

[120] K. Ma, Z. Xie, Q. Jiang, et al. Cytocompatible and Regenerable Antimicrobial Cellulose Modified by N-Halamine Triazine Ring. *J. Appl. Polym. Sci.* 131, **2014**, 40627.

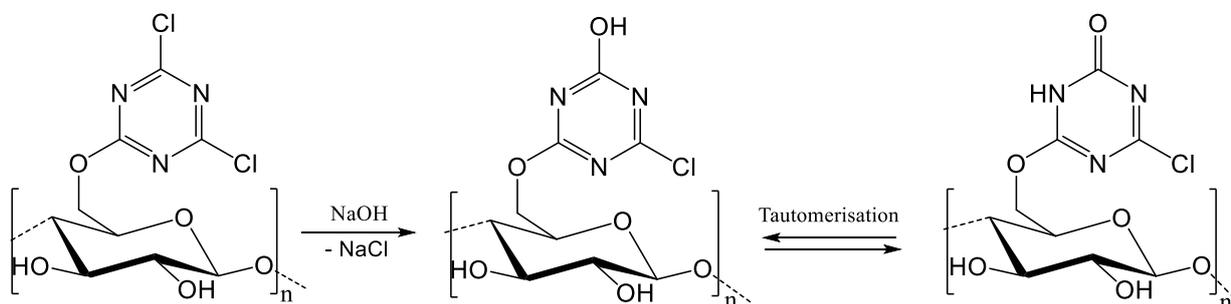
[121] P. Pathak, A. Thakur, H. R. Bhat et al. Hybrid 4-Aminoquinoline-1,3,5-triazine Derivatives: Design, Synthesis, Characterization, and Antibacterial Evaluation. *J. Heterocyclic Chem.* 52, **2015**, 1108-1113.

L'analyse du spectre infrarouge (**Figure 59**), révèle la présence des bandes caractéristiques du lien triazine, à  $813\text{ cm}^{-1}$  (C-Cl) et à  $1573\text{ cm}^{-1}$  (C=N). On observe également une bande à  $1716\text{ cm}^{-1}$  caractéristique de la présence d'un groupement carbonyle.



**Figure 59: Spectre IR de la pâte Kraft greffée par la triazine**

Le groupement carbonyle (C=O) est sûrement obtenu à la suite de la substitution d'un chlore du chlorure cyanurique par l'hydroxyde de sodium comme détaillé sur la **Figure 60**. Le groupement carbonyle est obtenu par tautomérie.



**Figure 60: Schéma de la substitution d'un chlore du novau triazine par l'hydroxyde**

L'analyse par spectroscopie XPS montre la présence d'atomes d'oxygène à  $532,49\text{ eV}$  (O1s), de carbone à  $286,1\text{ eV}$  (C1s), d'azote à  $399,5\text{ eV}$  (N1s) et de chlore à  $197,65\text{ eV}$  (Cl2p).

**Tableau 6: Résultats d'analyses XPS de la PK-Triazine**

	O 1s (%at)	C 1s (%at)	N 1s (%at)	Cl2p (%at)	DS
<b>PK</b>	36,0	64,0	-	-	-
<b>PK-Triazine</b>	37,39	59,52	1,82	1,27	0,08

Un DS de 0,08 a été déterminé comparable au DS obtenu lors du greffage du thymol et du carvacrol *via* la triazine.

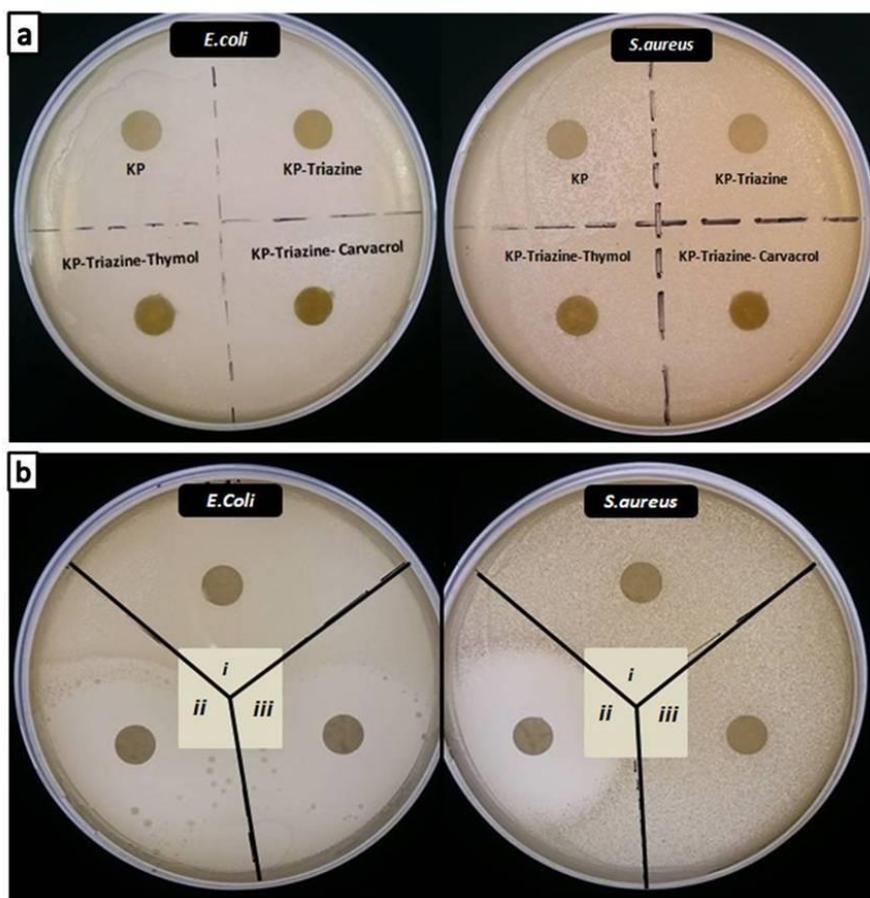
#### **II.4.1. Préparation des échantillons**

A partir des nouveaux matériaux obtenus et des pâtes servant de contrôles, des feuilles ont été préparées puis découpées en disques de 8 mm de diamètre. L'ensemble des disques est pasteurisé à 70°C.

#### **II.4.2. Activité antibactérienne des matériaux PK-Triazine-Thymol et PK-Triazine-Carvacrol**

Nous avons commencé par effectuer un test qualitatif pour confirmer l'absence de relargage des molécules greffées sur les fibres de pâte Kraft et ainsi confirmer le greffage. Pour ce faire, nous avons évalué la formation d'une zone d'inhibition autour des matériaux élaborés dans notre étude. Comme témoin supplémentaire, une solution de thymol et de carvacrol a été déposée sur des disques de pâte Kraft non modifiée.

Une suspension bactérienne de 1 mL à  $10^5$  UFC/ml (*S. aureus* ou *E. coli*) a étéensemencée sur milieux gelosés (TS+AGAR). Par la suite, les disques de différents matériaux (PK, PK-Triazine, PK-Triazine-Thymol et PK-Triazine-Carvacrol) ont été placés sur le milieu gélosé puis incubées à 37 ° C pendant 24h. En parallèle, nous avons déposé 50 µL d'une solution du thymol et du carvacrol à 18 g/L sur des disques de pâte Kraft, ce qui correspond à la quantité de 0,9 mg greffés sur un disque de 7 mg, équivalent au DS obtenu dans le cas du greffage. Les résultats sont présentés sur la **figure 61**.



**Figure 61: Evaluation de la zone d'inhibition, a: matériaux greffés; b: composés d'huiles essentielles libres déposés sur les fibres de pâte kraft. i: PK; ii: Thymol libre déposé sur la pâte kraft; iii: Carvacrol libre déposé sur la pâte kraft**

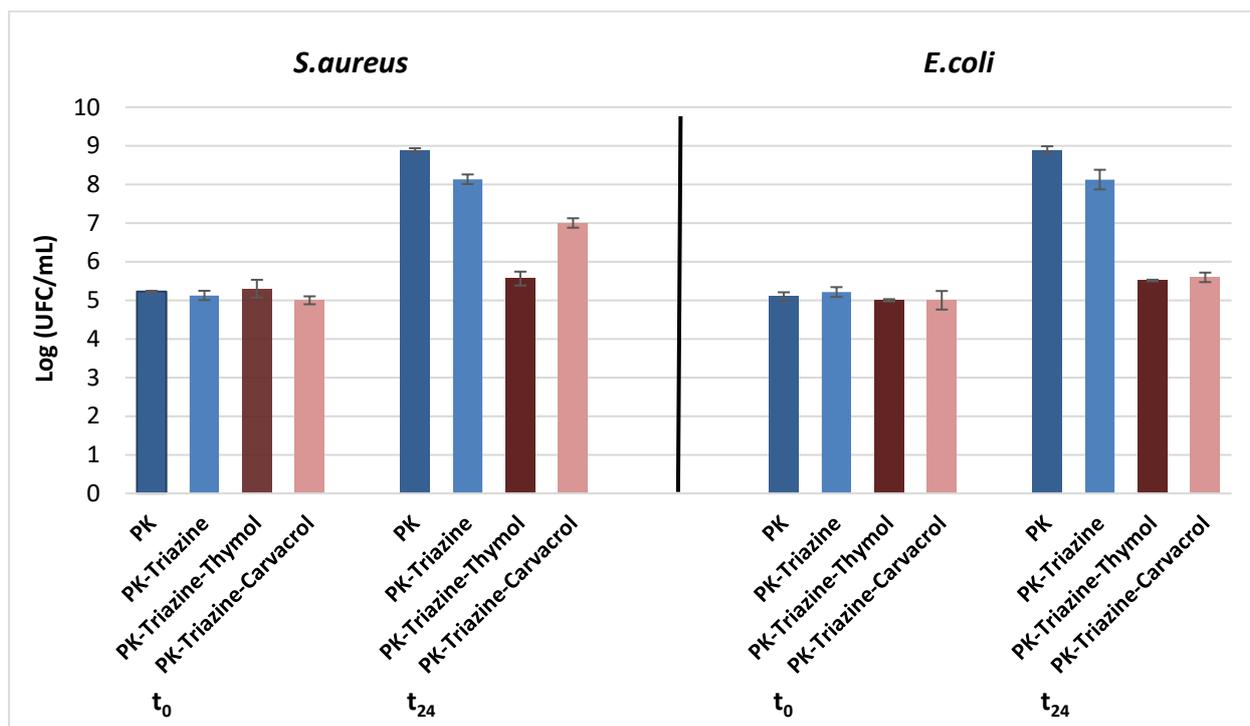
Dans le cas des matériaux greffés élaborés dans notre étude (**Figure 61:a**), nous avons observé l'absence de zone d'inhibition, indiquant l'absence de thymol ou de carvacrol libres, confirmant le greffage covalent du thymol et du carvacrol sur les fibres de pâte Kraft. Pour les composés d'huiles essentielles libres déposés sur les disques de fibre de pâte kraft (**Figure 61:b**), les résultats montrent la présence d'une zone d'inhibition due à la diffusion des composés d'huile essentielles. *S. aureus* s'est montré moins sensible au carvacrol libre à 18 g/L.

Nous avons procédé par la suite, à l'évaluation de l'activité antibactérienne des matériaux PK-Triazine-Thymol et PK-Triazine-carvacrol. Pour ce faire, nous avons utilisé une méthode basée sur la norme AATCC100 « Assessment of Antibacterial Finish Textile Materials ». C'est une méthode quantitative normalisée pour les textiles qui se déroule en deux étapes, un dénombrement des bactéries à  $t_0$  suivi d'un dénombrement à  $t_{24}$ , permet de tester l'activité antibactérienne après 24h de contact.

A partir d'une culture de bactérie en phase exponentielle de croissance, une suspension bactérienne, à une concentration déterminée ( $10^6$  UFC/mL) a été préparée dans un milieu nutritif

(TS). Cette suspension (50  $\mu$ L) a été déposée sur trois disques du même échantillon. Directement après le dépôt, un disque est récupéré, agité vigoureusement pendant deux heures afin de décrocher toutes les bactéries des différents matériaux. Ensuite, des dilutions en série au 1/10ème sont effectuées et ensemencées sur milieux gélosés (TS+AGAR). Après 24h d'incubation à 37°C, les colonies bactériennes sont dénombrées, ce qui correspond à  $t_0$ . Les deux disques restants sont laissés à 37°C. Après 24 heures de contact avec le matériau, ces derniers sont traités de la même façon que le premier disque ( $t_0$ ), afin de dénombrer les bactéries, ce qui correspond à  $t_{24}$ . Tous les tests ont été réalisés quatre fois.

Les résultats des tests microbiologiques des différents matériaux sont représentés sur la **figure 62**. Pour les deux souches testées, *E. coli* et *S. aureus*, les contrôles négatifs (PK et PK-Triazine) ne présentent aucune activité antimicrobienne. En effet, après 24 heures de contact, une croissance bactérienne de l'ordre de 4 log par rapport à la référence  $t_0$  est observée.



**Figure 62: Activité antibactérienne des matériaux « PK-Triazine-Composé d'huile essentielle » contre *E. coli* et *S. aureus***

La souche *S. aureus*, n'est pas sensible au matériau PK-triazine-Carvacrol. Une croissance de 2 log a été observée par rapport à  $t_0$ . La faible sensibilité de *S. aureus* au carvacrol a déjà été

signalée dans la littérature [122]. A l'opposé, après 24h, un effet bactériostatique a été observé pour le matériau PK-triazine-thymol. La croissance bactérienne est bloquée, elle est similaire à celle observée à  $t_0$ .

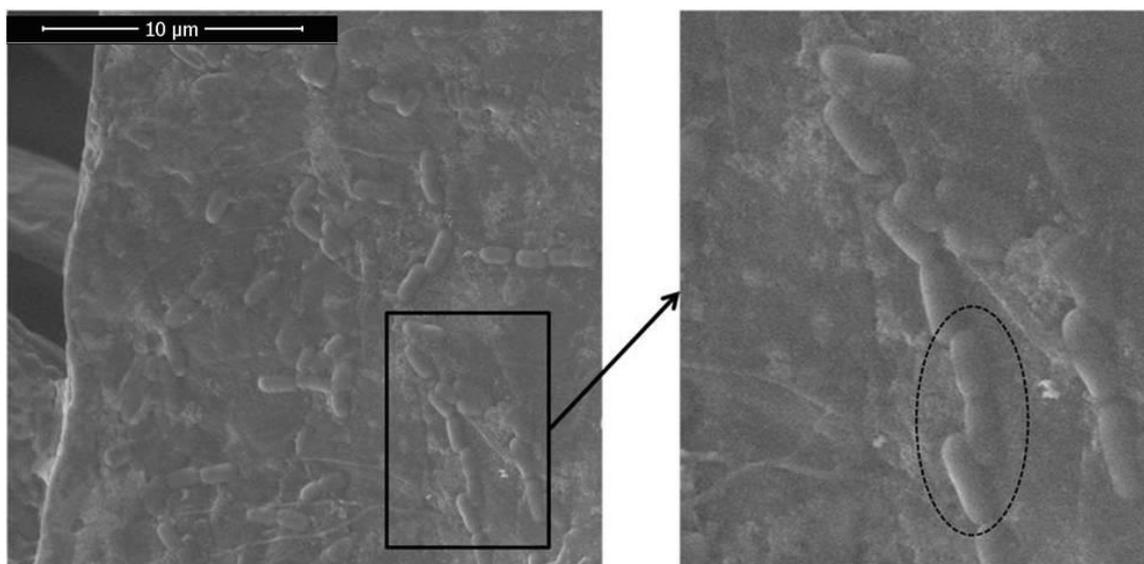
Pour *E. coli*, après 24 heures de contact avec les deux matériaux PK-triazine-thymol et PK-triazine-carvacrol, un effet bactériostatique a été observé.

L'analyse par microscopie électronique à balayage (MEB) environnemental des matériaux élaborés ainsi que des matériaux témoins a été réalisée. Deux disques de chaque matériau ont été préparés et 50  $\mu$ L de la suspension bactérienne à  $2 \times 10^6$  UFC/mL ont été déposés sur ces disques. Après 24h d'incubation à 37°C, les échantillons sont observés sans traitement préalable.

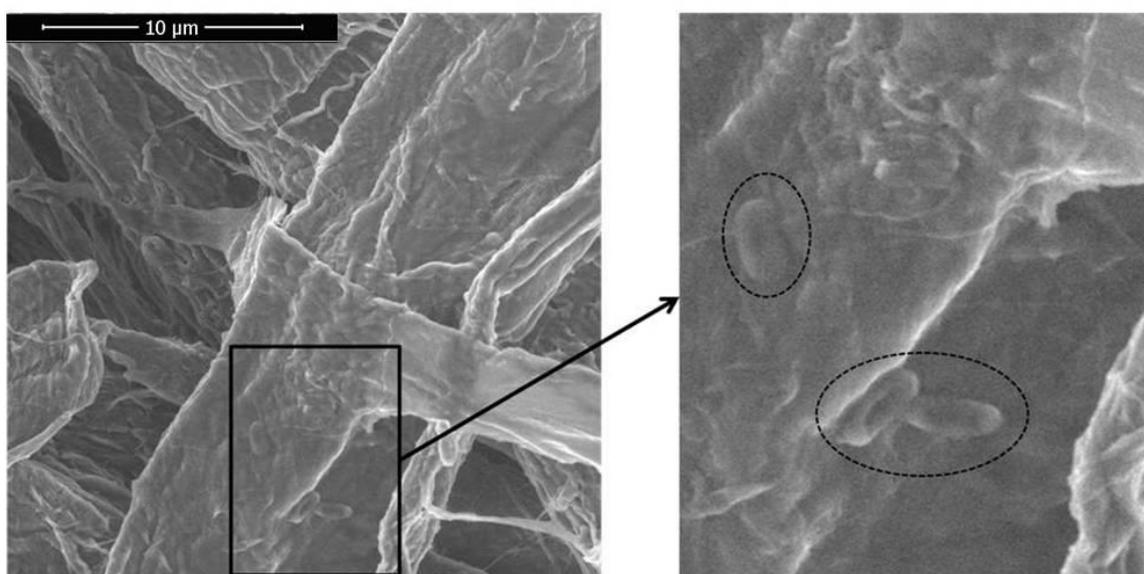
Dans le cas de *E. coli*, après 24 heures de contact avec le matériau PK-Triazine-Thymol, une modification de la structure de la paroi cellulaire bactérienne a été observée en comparaison avec des bactéries en contact avec de la pâte Kraft non modifiée (**Figure 63**).

---

[122] H. Miladi, T. Zmantar, Y. Chaabouni et al. Antibacterial and efflux pump inhibitors of thymol and carvacrol against food-borne pathogens ». *Microb. Pathog.* 99, **2016**, 95-100.



SEM image of *E. coli* after 24h of contact with KP



SEM image of *E. coli* after 24h of contact with KP-Triazine-Thymol

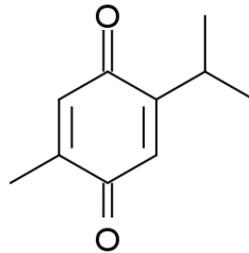
**Figure 63: Analyses par MEB environnemental de *E. coli* après 24h de contact avec la pâte kraft non modifiée et avec le matériau PK-Triazine-Thymol**

Il est bien indiqué dans la littérature que les principales cibles bactériennes des composés d'huiles essentielles sont les parois cellulaires et les membranes bactériennes [123]. Lambert et coll. [124] ont montré que le thymol et le carvacrol altèrent la membrane bactériennes en augmentant sa perméabilité.

[123] I. Rasooli, M. B. Rezaei, A. Allameh. Ultrastructural studies on antimicrobial efficacy of thyme essential oils on *Listeria monocytogenes*. *Int. J. Infect. Dis.* 10, **2006**, 236-41.

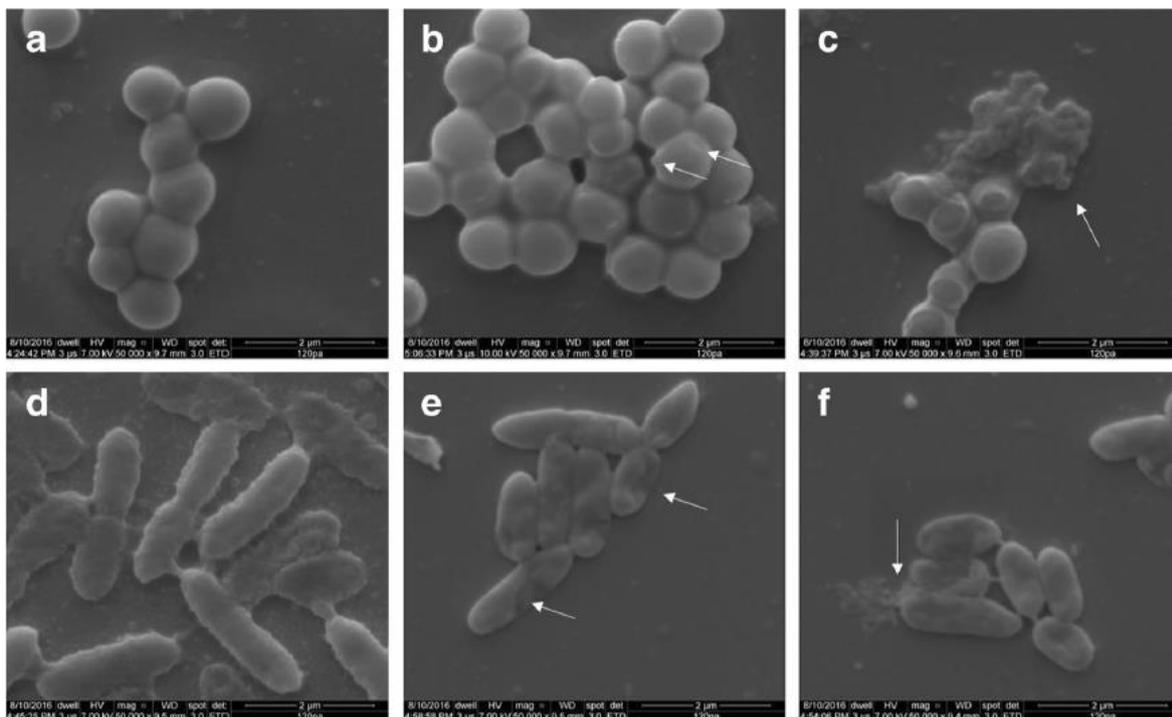
[124] R. J. Lambert, P. N. Skandamis, P. J. Coote, et al. A study of the minimum inhibitory concentration and mode of action of oregano essential oil, thymol and carvacrol. *J. Appl. Microbiol.* 91, **2001**, 453-62.

Récemment, Goel et coll. [125] ont observé au MEB des bactéries, *S. aureus* et *E. coli*, exposées à la thymoquinone (**Figure 64**), cette dernière constitue avec le thymol, les composés majoritaires de l'huile essentielle de cumin noir (*Nigella sativa*) [126].



**Figure 64: Structure de la thymoquinone**

Les images MEB montrent des irrégularités dues à l'endommagement de la paroi des bactéries exposées à la thymoquinone à une concentration correspond à sa CMI (**Figure 65:b et e**), en augmentant la concentration de la thymoquinone, les bactéries se lysent formant des débris bactériens (**Figure 65:c et d**).



**Figure 65: Images MEB de *S. aureus* non traitée (a), *S. aureus* exposée à la thymoquinone à une concentration égale à la CMI (b), *S. aureus* exposée à la thymoquinone à une concentration égale à 2xCMI (c), *E. coli* non traitée (d), *E. coli* exposée à la thymoquinone à une concentration égale à la CMI (e), *E. coli* exposée à la thymoquinone à une concentration égale à 2xCMI (f) [125]**

[125] S. Goel, P. Mishra. Thymoquinone inhibits biofilm formation and has selective antibacterial activity due to ROS generation. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 102, 2018, 1955–1967.

[126] Herlina, S. A. Aziz, A. Kurniawati, et al. Changes of Thymoquinone, Thymol, and Malondialdehyde Content of Black Cumin (*Nigella sativa* L.) in Response to Indonesia Tropical Altitude Variation. *HAYATI J. Biosci.* 24, 2017, 156-161.

Dans notre étude, les images de MEB environnemental montrent que le thymol greffé sur la pâte kraft a un effet similaire sur la paroi cellulaire. Cette perturbation de la structure de la paroi cellulaire pourrait induire une modification potentielle de la membrane, conduisant à la libération d'ions, de molécules d'ATP, menant à la mort cellulaire.

Par ailleurs, différents travaux de la littérature ont montré que la synergie entre le carvacrol et le thymol libre permet d'atteindre des résultats supérieurs à ceux obtenus lorsqu'ils sont testés séparément [127, 128, 129]. Pour cela, nous avons évalué l'activité antibactérienne de mélanges des matériaux PK-Triazine-Thymol et PK-Triazine-Carvacrol afin d'étudier cette synergie dans le cas où chacun des composés est greffé sur un support solide.

#### **II.4.3. Activité antibactérienne de mélanges des matériaux PK-Triazine-Thymol et PK-Triazine-Carvacrol.**

Afin d'étudier l'effet de synergie entre le thymol et le carvacrol greffés sur les fibres de pâte Kraft, nous avons préparé des mélanges de matériaux obtenus précédemment dans différentes proportions (**Tableau 7**) :

**Tableau 7: Différentes proportions utilisées pour préparer les mélanges de matériaux élaborés**

	<b>PK-Triazine-Thymol</b>	<b>PK-Triazine-Carvacrol</b>
<b>Mélange 1</b>	30%	70%
<b>Mélange 2</b>	50%	50%
<b>Mélange 3</b>	70%	30%

L'activité antimicrobienne des mélanges a été évaluée comme précédemment suivant la méthodologie basée sur la norme AATCC100.

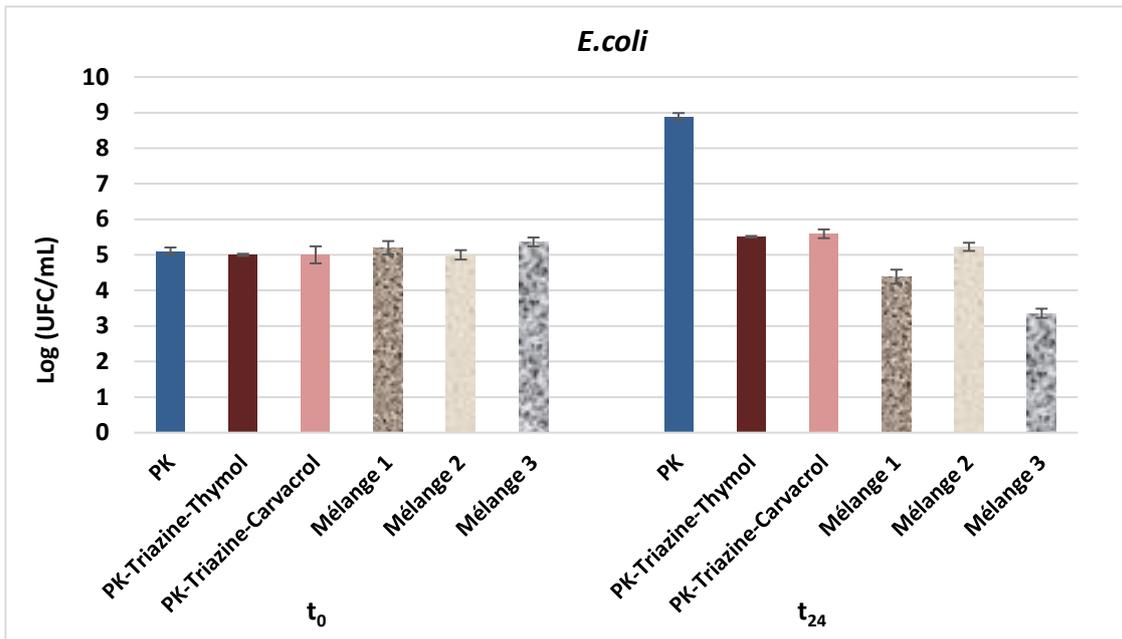
Pour *E. coli* (**Figure 66**), le mélange 1 et 3 montrent bien l'effet synergique entre le thymol et le carvacrol lorsqu'ils sont greffés sur les fibres de pâte Kraft. Si l'on compare aux résultats obtenus avec PK-Triazine-Thymol et PK-Triazine-Carvacrol, chacun testé séparément, on remarque qu'on passe d'un effet bactériostatique à un effet bactéricide avec une inhibition de la croissance

[127] R. Lambert, P. N. Skandamis, P. J. Coote, et al. A study of the minimum inhibitory concentration and mode of action of oregano essential oil, thymol and carvacrol. *J. Appl. Microbiol.* 91, **2001**, 453–462.

[128] H. Moon and M. S. Rhee. Synergism between carvacrol or thymol increases the antimicrobial efficacy of soy sauce with no sensory impact. *Int. J. Food. Microbiol.* 217, **2016**, 35–41.

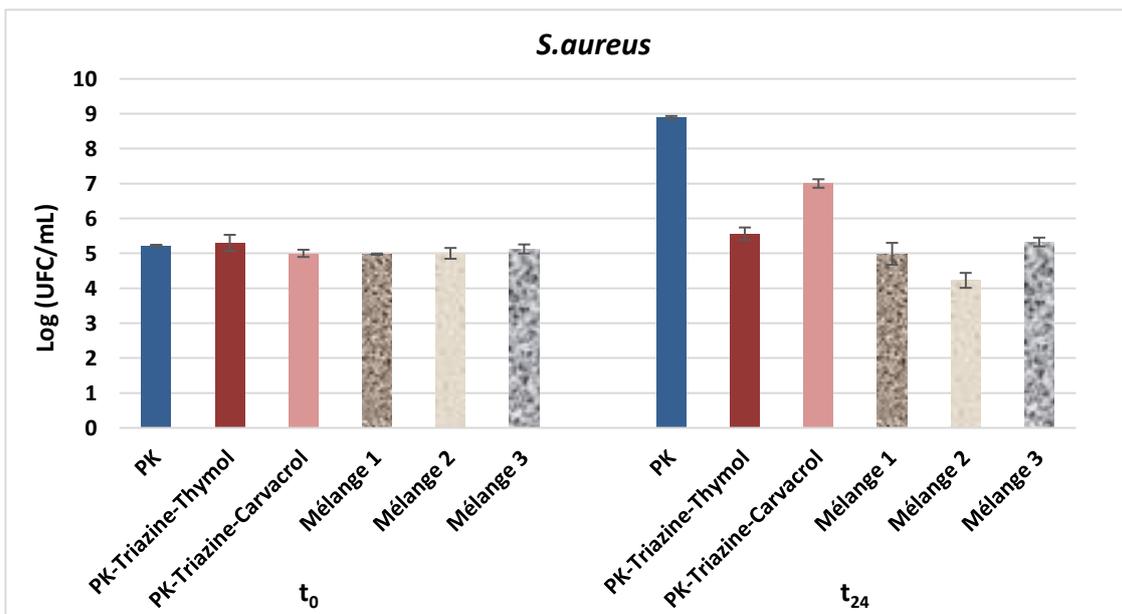
[129] M. Krepker, R. Shemeshab, Y. D. Poleg, et al. Active food packaging films with synergistic antimicrobial activity. *Food Control.* 76, **2017**, 117-126.

bactérienne de 17% pour le mélange 1 et 40% pour le mélange 3. Dans le cas du mélange 2, l'activité bactériostatique est maintenue.



**Figure 66: Comparaison de l'activité antibactérienne des matériaux PK-Triazine-Thymol et PK-Triazine-Carvacrol avec les mélanges 1,2 et 3 contre *E. coli***

Pour *S. aureus* (Figure 67), le mélange 2 présente une activité bactéricide avec un taux d'inhibition de croissance de 15% montrant un faible effet synergique entre le thymol et le carvacrol lorsqu'ils sont greffés sur les fibres de pâte Kraft. Les mélanges 1 et 3 ont présenté un effet bactériostatique.



**Figure 67: Comparaison de l'activité antibactérienne des matériaux PK-Triazine-Thymol et PK-Triazine-Carvacrol avec les mélanges 1, 2 et 3 contre *S. aureus***

Les matériaux élaborés lors de cette étude présentent une activité antibactérienne intéressante vis-à-vis de *S. aureus* et *E. coli*, lorsque chacune des souches bactériennes est testées séparément. Cependant, en réalité, lorsqu'un matériau se trouve dans l'environnement, il sera souvent contaminé par plusieurs bactéries [130]. Il nous a donc semblé intéressant d'étudier l'activité antibactérienne des différents matériaux élaborés sur un mélange des deux souches bactériennes *S. aureus* et *E. coli*.

#### **II.4.4. Activité antibactérienne sur un mélange de bactéries, *E. coli* et *S. aureus***

Dans certains cas, les bactéries en mélanges peuvent devenir plus virulentes et plus résistantes aux antimicrobiens. Ramsey et coll. [131] ont montré par exemple, que *Acinobacter actinomycetemcomitans*, une bactérie Gram négatif, montre un taux de croissance plus élevé et une plus grande virulence lorsqu'elle est co-cultivée avec *Streptococcus gordonii*. Cela est dû à sa capacité à métaboliser le lactate produit par *Streptococcus gordonii*, ce qui lui permet de croître rapidement à un stade précoce et de persister.

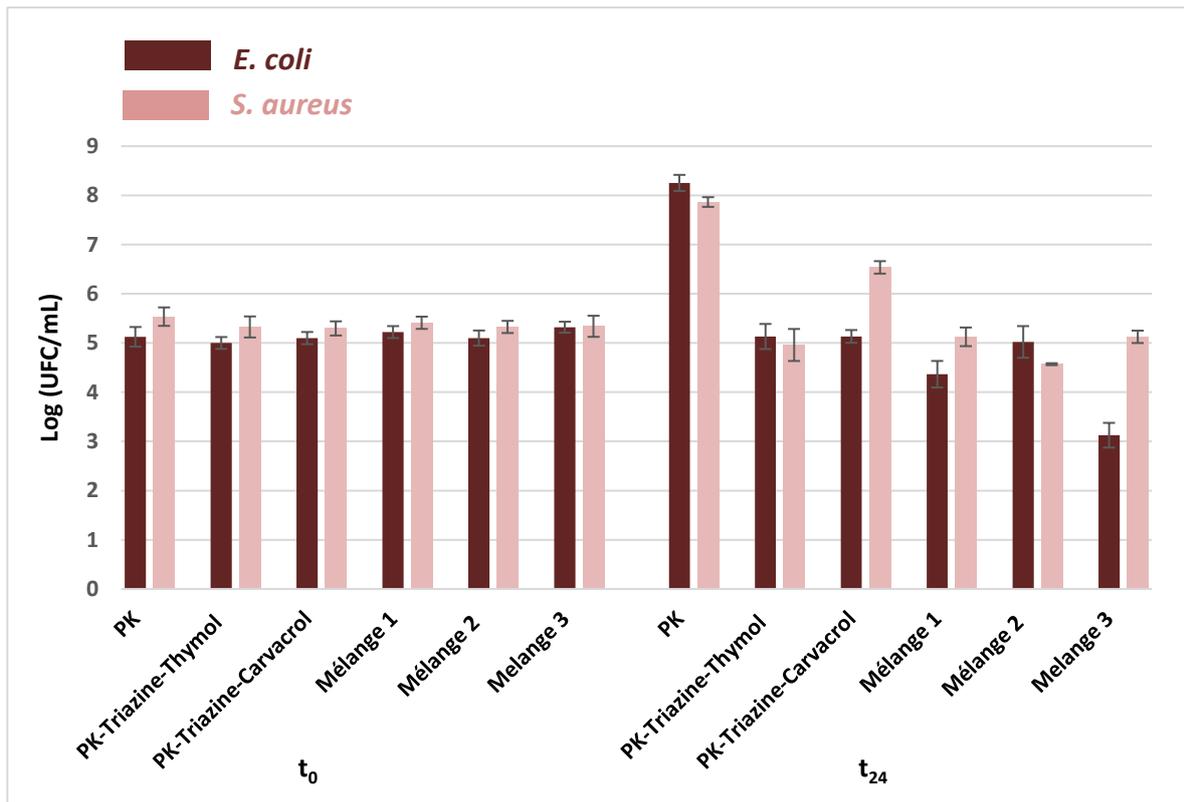
Nous avons donc testé l'activité des différents matériaux sur un mélange des deux bactéries, *S. aureus* et *E. coli*. Pour ce faire, nous avons préparé une solution contenant  $10^5$  UFC de chaque bactérie dans le milieu nutritif (TS). Cette suspension (50  $\mu$ L) a été déposés sur trois disques du même échantillon. Etant donné que les colonies de *E. coli* et celles de *S. aureus* sont visuellement différentes, nous avons dénombré les colonies de chaque bactérie à  $t_0$  et à  $t_{24}$ . Tous les tests ont été réalisés quatre fois. Les résultats sont présentés sur la **figure 68**.

En présence d'un mélange des deux bactéries, *E. coli* et de *S. aureus*, l'activité antibactérienne des matériaux est équivalente à celle obtenue contre les deux bactéries *E. coli* et *S. aureus*, chacune testées séparément. Avec dans le cas de *E. coli*, une activité bactéricide pour le mélange 1 et 2 et une activité bactériostatique pour les autres matériaux. Dans le cas de *S. aureus*, nous observons une activité bactéricide pour le mélange 2, et une activité bactériostatique pour le matériau PK-Triazine-Thymol et les mélanges 1 et 3 et nous ne remarquons toujours pas d'activité antibactérienne pour le matériau PK-Triazine-Carvacrol.

---

[130] K. L. Asfahl and M. Schuster. Social interactions in bacterial cell-cell signaling. *FEMS Microbiol. Rev.* 41, 2017, 92-107.

[131] M. M. Ramsey, K. P. Rumbaugh, M. Whiteley. Metabolite cross-feeding enhances virulence in a model polymicrobial infection. *PLoS Pathog.* 7, 2011, e1002012.



**Figure 68: Activité antibactérienne des différents matériaux sur un mélange de *E. coli* et *S. aureus***

Ces résultats indiquent que les matériaux pourraient inhiber la croissance bactérienne et empêcher leur prolifération même quand les deux bactéries sont en communauté.

## II.5. Conclusion

Pour conclure, nous avons greffé deux composés d'huiles essentielles sur des fibres de pâte Kraft, *via* un lien triazine. La stratégie mise en œuvre pour l'élaboration de ces nouveaux matériaux permet de greffer le thymol et le carvacrol sans modification préalable de la pâte Kraft, contrairement à des travaux de la littérature, où le support doit être modifié pour introduire des groupements fonctionnels permettant le greffage de molécules actives.

Même avec un DS faible, inférieur à 0,1, les matériaux développés possèdent une activité bactériostatique, ils bloquent la croissance bactérienne ce qui pourrait empêcher la formation des biofilms. Dans le cas de *E. coli*, le matériau PK-Triazine-Thymol a un effet sur la paroi bactérienne, l'étude par MEB environnemental suggère la déstructuration de la paroi des bactéries.

L'étude de l'activité de mélanges de matériaux a montré la présence d'un effet synergique entre le thymol et le carvacrol lorsqu'ils sont greffés sur les fibres de pâte kraft. En effet, à partir de mélanges de deux matériaux bactériostatiques, nous avons élaboré des matériaux bactéricides.

Les taux d'inhibition de la croissance bactérienne de *E. coli* est de 40% pour le mélange Pk-Triazine-thymol / PK-Triazine-Carvacrol, 3/7. Pour *S. aureus*, un effet bactéricide est observé pour le mélange Pk-Triazine-thymol / PK-Triazine-Carvacrol, 1/1, avec un taux d'inhibition de 15%.

L'évaluation de l'activité antibactérienne des différents matériaux sur un mélange des deux souches *E. coli* et *S. aureus* montre que ces nouveaux matériaux, inhibent la croissance bactérienne même quand les deux bactéries sont en communauté.

Les résultats obtenus lors de cette étude montrent bien que le greffage des composés d'huiles essentielles est parfaitement réalisable sur les fibres de pâte kraft, et permet de développer de nouveaux matériaux bioactifs qui peuvent être utilisés pour protéger et éviter la prolifération bactérienne sur des objets à base de fibres de pâte kraft.

Nous avons poursuivi ce travail par l'étude du transfert des greffages du thymol et du carvacrol sur des fibres de pâte thermomécanique.

### **III. De la pâte Kraft à la pâte thermomécanique**

La pâte thermomécanique (PTM) est présente majoritairement dans la fabrication du papier journal, des papiers sanitaires et domestiques. Elle peut être également utilisée pour remplacer la farine de bois dans les matériaux bois-composites. Ces derniers sont utilisés dans la construction, ils se composent d'un polymère thermoplastique, tel que le polypropylène (PP) ou le polyéthylène (PE), des particules de bois de différentes tailles et formes, telles que la farine de bois ou les fibres de bois, ainsi que des additifs. L'introduction de la PTM à la place de la farine de bois permet d'augmenter la résistance des matériaux [132].

Les fibres de pâte thermomécanique sont produites à partir de copeaux de bois avec des rendements supérieurs à 90%, ce qui donne une pâte moins chère par rapport aux pâtes chimiques. Elle conserve tous les principaux composants du bois, la cellulose, les hémicelluloses et la lignine.

L'utilisation de la PTM comme support antibactérien permet d'élargir le champ d'application des matériaux élaborés. Pour ce faire, nous avons greffé le thymol et le carvacrol sur les fibres de la PTM en utilisant la même procédure que pour les fibres de pâte kraft.

---

[132] O. Mertens, J. Gurr, A. Krause. The utilization of thermomechanical pulp fibers in WPC: A review. *J. Appl. Polym. Sci.* 134, **2017**, 1-11.

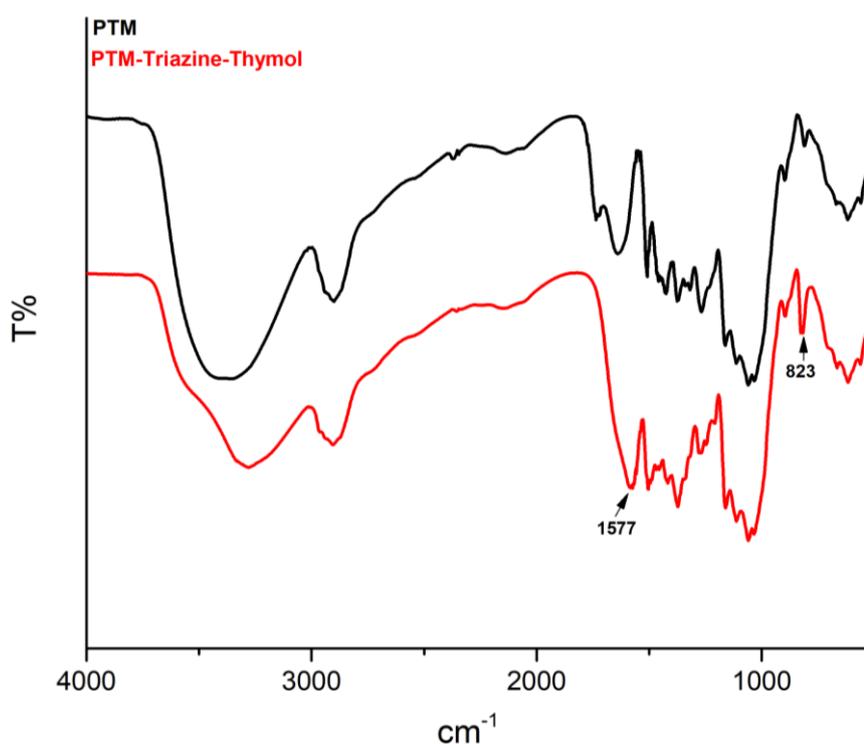
### III.1. Préparation des matériaux PTM-Triazine-Thymol et PTM-Triazine-Carvacrol.

Le Thymol-triazine et le Carvacrol-triazine ont été greffés sur les fibres de PTM comme décrit précédemment. Après lavage au dichlorométhane, à l'eau jusqu'à pH neutre, et à l'éthanol puis séchage à l'étuve à 60°C, on obtient des fibres colorées (**Figure 69**) avec un rendement massique de 99 % pour les deux matériaux PTM-Triazine-Thymol et PTM-Triazine-Carvacrol.



**Figure 69: Fibres de pâte thermomécanique non modifiées;**  
**b: Fibres de pâte thermomécanique greffées avec le Thymol-Triazine**

L'analyse par spectroscopie infrarouge (**Figure 70**), révèle la présence d'une bande caractéristique de l'élongation C-Cl se situant aux alentours de 823  $\text{cm}^{-1}$  et l'apparition d'une bande caractéristique de l'élongation C=N, vers 1577  $\text{cm}^{-1}$  confirmant ainsi la fixation du Thymol-triazine et du Carvacrol-Triazine sur les fibres de pâte thermomécanique.



**Figure 70: Spectre IR de la pâte thermomécanique et du matériau PTM-Triazine-Thymol**

L'analyse par spectroscopie XPS, montre la présence d'atomes d'oxygènes, de carbone, d'azote et de chlore (tableau 8).

**Tableau 8: Résultats d'analyses XPS de la pâte thermomécanique et de la pâte thermomécanique greffée par le thymol et le carvacrol**

	<b>O 1s</b>	<b>C 1s</b>	<b>N 1s</b>	<b>Cl 2p</b>
<b>PTM</b>	29,21%	70,01%	0,76%	0%
<b>PTM-Triazine-Thymol</b>	30,50%	65,18%	4,03%	0,18%
<b>PTM-Triazine-Carvacrol</b>	26,72%	67,65%	5,04%	0,38%

L'augmentation du pourcentage d'azote après réaction de la Triazine-Thymol et de la Triazine-Carvacrol avec la pâte thermomécanique confirme le greffage.

La pâte thermomécanique étant constituée majoritairement de cellulose, lignine et hémicellulose, il n'est pas possible de déterminer par XPS, un DS approximatif, comme nous l'avons fait dans le cas de la pâte Kraft en assimilant les fibres de pâte à papier à des fibres de cellulose.

Afin de quantifier le Thymol et le Carvacrol fixé sur la pâte thermomécanique, nous nous sommes tournés vers l'analyse élémentaire des matériaux obtenus (tableau 9). Nous avons déterminé un taux de greffage en nombre de millimole de molécule greffée par gramme de matériau obtenu.

**Tableau 9: Résultats d'analyses élémentaires de la pâte thermomécanique et des matériaux PTM-Triazine-Thymol, PTM-Triazine-Carvacrol, PK-Triazine-Thymol et PK-Triazine-Carvacrol**

<b>Echantillons</b>	<b>Masse (mg)</b>	<b>N%</b>	<b>C%</b>	<b>H%</b>	<b>Quantité greffée (mmol/g)</b>
<b>PTM</b>	0,874	0	46,52	5,60	-
<b>PTM-Triazine-Thymol</b>	0,822	2,11	46,39	5,49	<b>0,50</b>
<b>PTM-Triazine -Carvacrol</b>	0,936	2,66	46,27	5,42	<b>0,63</b>
<b>PK-Triazine-Thymol</b>	0,807	0,35	41,94	5,95	<b>0,08</b>
<b>PK-Triazine-Carvacrol</b>	1,518	0,45	41,2	5,9	<b>0,1</b>

Le taux de greffage calculé est de 0,5 mmol/g pour le matériau PTM-Triazine-Thymol et de 0,63 mmol/g pour le matériau PTM-Triazine-Carvacrol.

L'analyse élémentaire effectuée sur les matériaux obtenus par greffage sur la pâte Kraft conduit à des taux de greffage de 0,08 mmol/g et 0,1 mmol/g pour le thymol et le carvacrol respectivement. Le taux de greffage sur la pâte thermomécanique est nettement plus élevé. Cette dernière contient de la lignine, un polyphénol qui réagit rapidement avec la soude par une réaction acide/base, conduisant à des phénolates, augmentant ainsi la nucléophilie des fonctions phénols. La réaction de substitution nucléophile permettant le greffage du Thymol-Triazine ou du Carvacrol-Triazine est donc favorisée conduisant à un taux de greffage plus important que dans le cas de la pâte Kraft composée majoritairement de cellulose (85%).

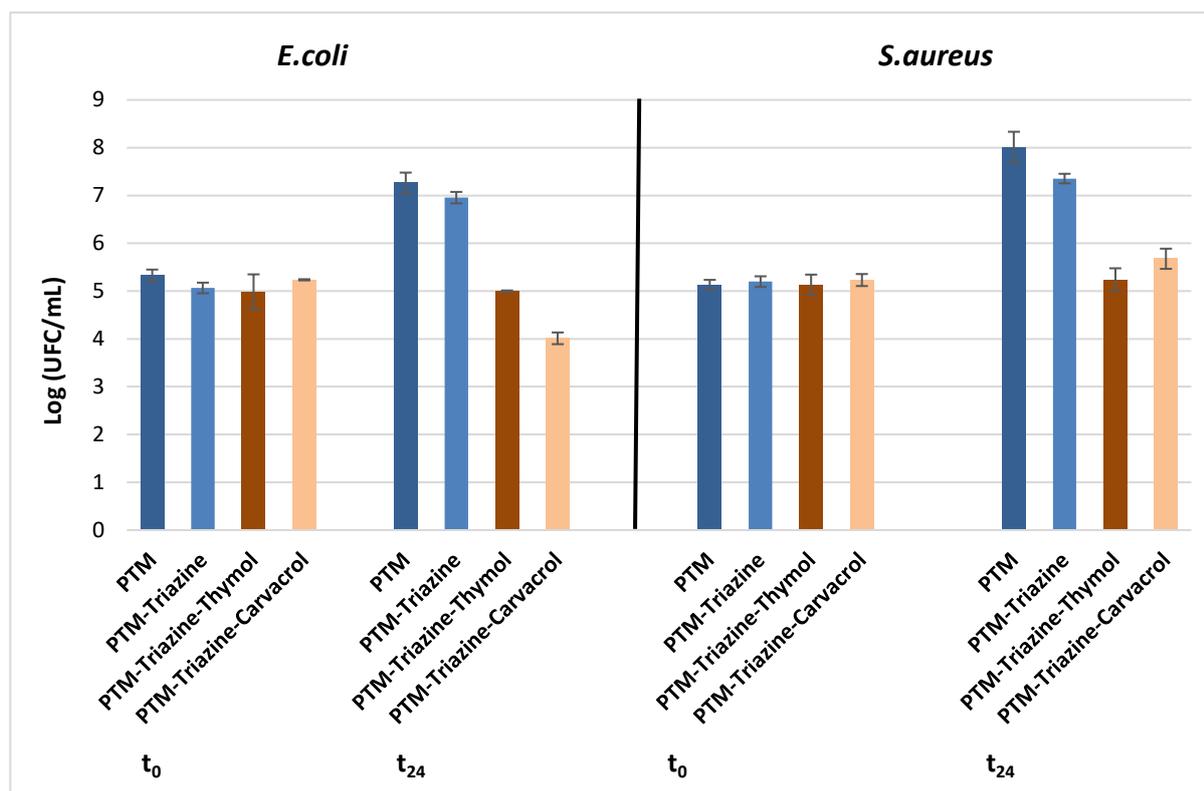
### **III.2. Evaluation de l'activité antibactérienne des matériaux PTM-Triazine-Thymol et PTM-Triazine-Carvacrol.**

L'activité antimicrobienne des matériaux élaborés a été évaluée comme précédemment suivant la méthodologie basée sur la norme AATCC100. Les tests ont été réalisés sur les mêmes souches bactériennes, *E. coli* et *S. aureus*.

Au cours de ces tests, nous avons utilisé comme contrôles, la pâte thermomécanique non modifiée (PTM) ainsi que la pâte thermomécanique greffée avec la triazine (PTM-Triazine). En effet, comme nous l'avons indiqué précédemment, la triazine libre est connue pour avoir un effet antimicrobien.

Pour cela nous avons fixé le chlorure cyanurique sur les fibres de PTM en utilisant le même protocole que pour son greffage sur les fibres de pâte Kraft. Après 48h de réaction à température ambiante, le mélange est filtré et la pâte thermomécanique modifiée obtenue, est lavée au dichlorométhane, à l'eau et à l'éthanol puis séchée à l'étuve à 60°C. On obtient des fibres greffées avec un rendement massique de 103 %. L'analyse du spectre infrarouge, révèle la présence des bandes caractéristiques du motif triazine à 812  $\text{cm}^{-1}$  (C-Cl) et à 1570  $\text{cm}^{-1}$  (C=N).

Les résultats des tests microbiologiques ont montré que les matériaux utilisés comme contrôles, ne présentent aucune activité antibactérienne vis-à-vis des deux souches étudiées. En effet, après 24h de contact, une croissance de l'ordre de 2 log est observée par rapport à la référence  $t_0$  pour *E. coli*, et une croissance de l'ordre de 3 log par rapport à la référence  $t_0$  pour *S. aureus* (**Figure 71**).

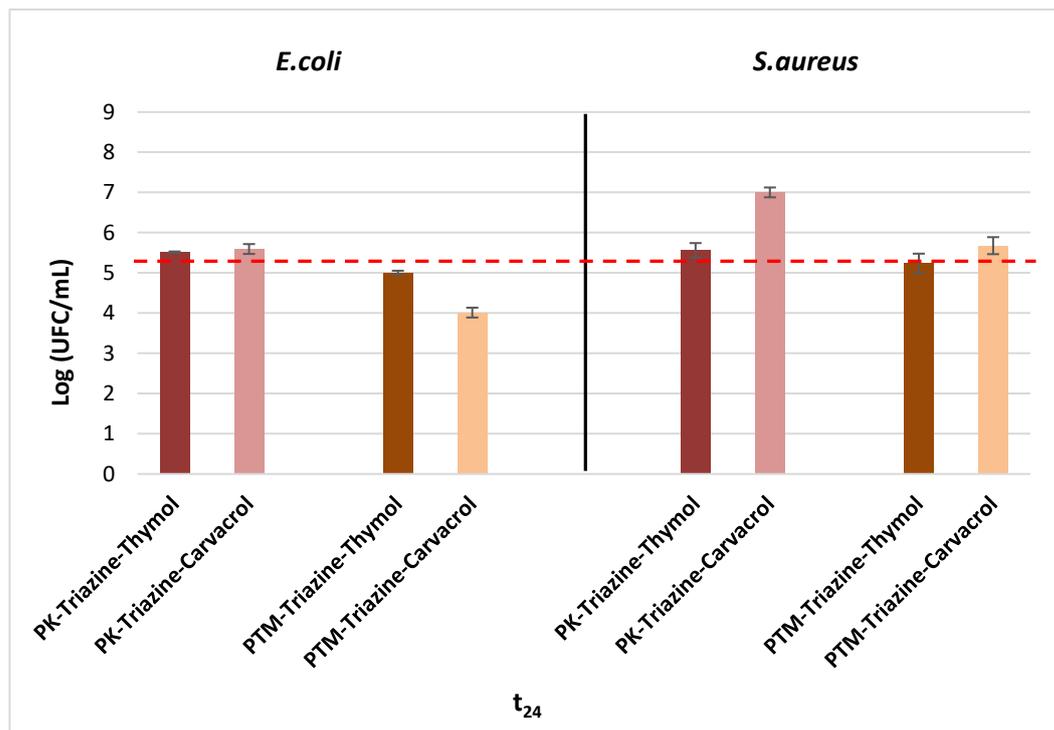


**Figure 71: Activité antibactérienne des matériaux « PTM-Composé d’huile essentielle » contre *E. coli* et *S. aureus***

Pour *E. coli*, le matériau PTM-Triazine-Thymol présente un effet bactériostatique. Le matériau PTM-Triazine-Carvacrol quant à lui, présente un effet bactéricide avec un taux d’inhibition de 23% par rapport à la référence t<sub>0</sub>.

Pour *S. aureus*, un effet bactériostatique a été observé pour les deux matériaux PTM-Triazine-Thymol et PTM-Triazine-Carvacrol.

Comme le montre la **figure 72**, l’activité observée dans le cas des matériaux à base de pâte thermomécanique est supérieure à celle observée dans le cas des matériaux obtenus avec la pâte Kraft. Pour *E. coli*, le matériau PTM-Triazine-Carvacrol présente une activité bactéricide avec un taux d’inhibition de 23% alors que la matériaux PK-Triazine-Carvacrol présente un effet bactériostatique. Pour *S. aureus*, le matériau PTM-Triazine-Carvacrol présente un effet bactériostatique, alors que dans le cas de la pâte Kraft, il ne présentait pas d’activité. Cette différence peut être dû au taux de greffage qui est plus important dans le cas de la pâte thermomécanique.



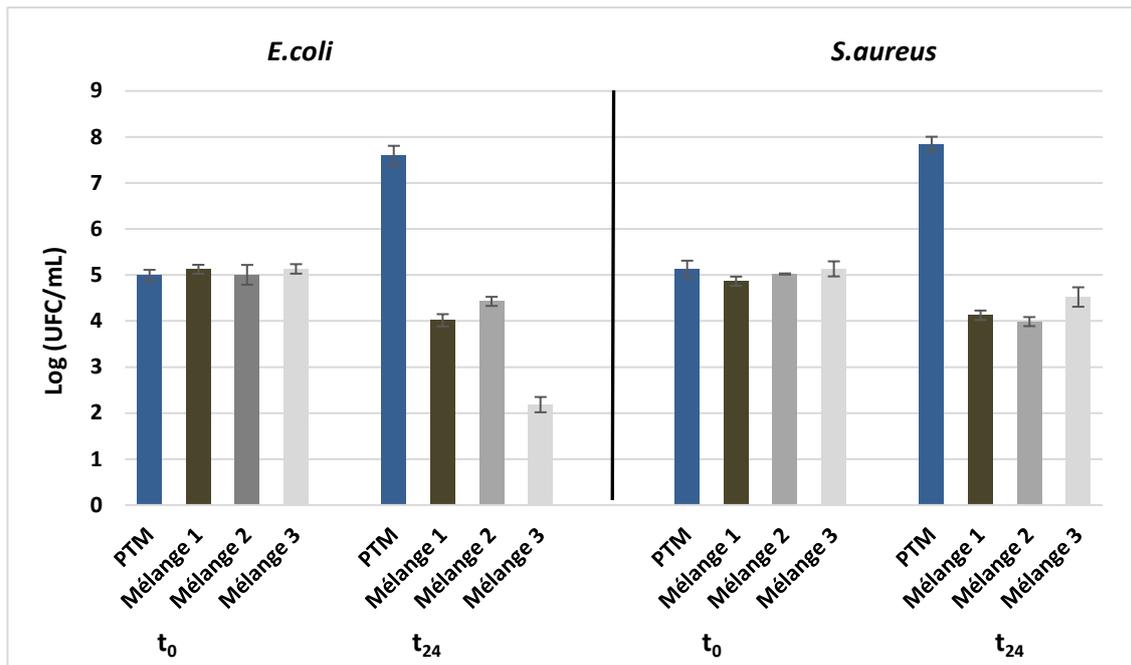
**Figure 72: Comparaison de l'activité antibactérienne des matériaux à base de PK et ceux à base de PTM contre *E. coli* et *S. aureus***

Par la suite, nous avons étudié l'effet de synergie entre le thymol et le carvacrol greffés sur les fibres de pâte thermomécanique. Pour cela, nous avons préparé des mélanges de matériaux obtenus dans les mêmes proportions que pour la pâte Kraft (**Tableau 10**)

**Tableau 10: Différentes proportions utilisées pour préparer les mélanges de matériaux de pâte thermomécanique greffées par le thymol et le carvacrol**

	PTM-Triazine-Thymol	PTM-Triazine-Carvacrol
<b>Mélange 1</b>	30%	70%
<b>Mélange 2</b>	50%	50%
<b>Mélange 3</b>	70%	30%

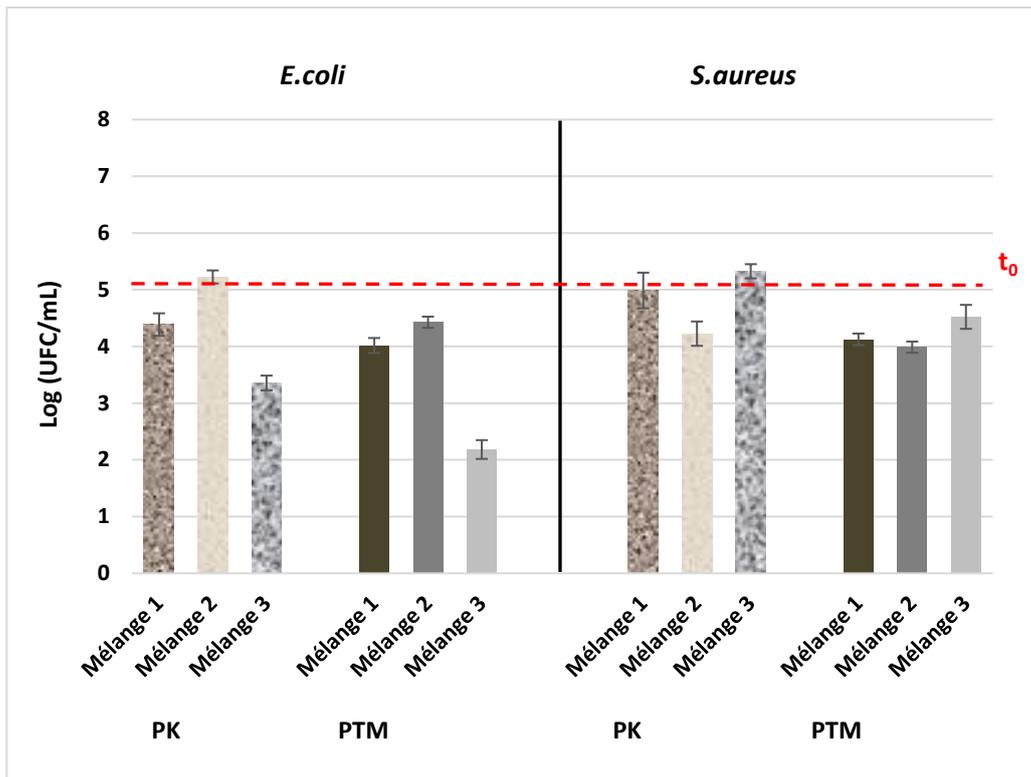
A la suite de l'obtention des différents matériaux, nous avons évalué leur activité antibactérienne. Les résultats sont présentés sur la **figure 73**.



**Figure 73: Activité antibactérienne des mélanges de matériaux PTM-Triazine-Thymol et PTM-Triazine-Carvacrol contre *E. coli* et *S. aureus***

Pour *E. coli*, les résultats montrent un effet de synergie entre le thymol et le carvacrol lorsqu'ils sont greffés sur la PTM. Les trois mélanges présentent un effet bactéricide avec une inhibition de la croissance bactérienne de 21%, 12% et 60% pour les mélanges 1, 2 et 3 respectivement. Pour *S. aureus*, les trois mélanges présentent également une activité bactéricide avec des taux d'inhibition de 15%, 20% et 12% pour les mélanges 1, 2 et 3 respectivement.

Comme le montre la **figure 74**, l'activité de ces mélanges est supérieure à celle des mélanges de matériaux à base de pâte Kraft, les différents mélanges à base de PTM présentent une activité bactéricide contre les deux souches bactériennes.



**Figure 74: Comparaison de l'activité antibactérienne des différents mélanges à base de PK et ceux à base de PTM contre *E. coli* et *S. aureus***

### III.3. Conclusion

Nous avons transféré les greffages des deux composés d'huile essentielle, le thymol et le carvacrol, sur les fibres de pâte thermomécanique. Les matériaux présentent une activité antibactérienne supérieure à celle des matériaux à base des fibres de pâte Kraft. On passe d'un effet bactériostatique contre *E. coli* dans le cas du matériaux PK-Triazine-Carvacrol, à un effet bactéricide dans le cas du matériau PTM-Triazine-Carvacrol. Contre *S. aureus*, dans le cas du greffage sur la pâte Kraft, le carvacrol était inactif, alors que greffé sur la pâte thermomécanique, ce dernier présente un effet bactériostatique.

L'étude de l'activité de mélange de matériaux a montré un effet de synergie entre le thymol et le carvacrol lorsqu'ils sont greffés sur les fibres de pâte thermomécanique. Cet effet est également supérieur à celui obtenu avec les mélanges de matériaux à base de pâte Kraft. En effet, les différents mélanges à base de pâte thermomécanique présentent une activité bactéricide avec des taux d'inhibition allant jusqu'à 60% contre *E. coli*. L'amélioration de l'activité antibactérienne des matériaux à base de pâte thermomécanique par rapport à ceux à base de pâte Kraft, peut être expliqué par un taux de greffage plus important comme nous l'avons décrit précédemment.



# **Chapitre 3**

## **Elaboration de nouveaux matériaux antibactériens portant le motif aryl-1,2,3-triazole**



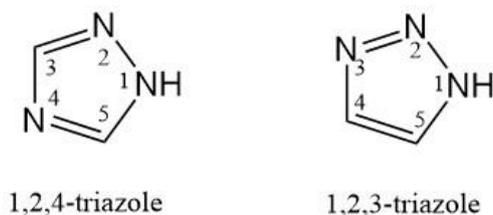
## I. Elaboration de nouveaux matériaux bioactifs portant le motif aryl-1,2,3-triazole

Dans la deuxième partie de ce travail, nous nous sommes intéressés aux composés triazolés et leur activité antimicrobienne.

### I.1. Les triazoles

Le triazole et ses dérivés constituent une classe importante de molécules bioactives dans le domaine pharmaceutique. Ils possèdent des caractéristiques recherchées telles qu'une bonne stabilité à l'hydrolyse acide et basique, et aux conditions oxydatives et réductrices, ainsi qu'une résistance à la dégradation métabolique [133].

Le nom de triazole a été donné pour la première fois par Bladin qui a décrit ces dérivés en 1885, un autre nom, le pyrrodiazole, a été donné par Andreocci en 1889 en le considérant comme un membre d'une classe de composés analogues au pyrrole [134]. Les triazoles sont des composés cycliques, contenant deux atomes de carbone et trois atomes d'azote. Selon la position des atomes d'azote, on distingue les 1,2,4-triazoles et les 1,2,3-triazoles (**Figure 75**). Ils sont tous d'origine synthétique et n'existent pas à l'état naturel.



**Figure 75: Structure de 1,2,3-triazole et 1,2,4-triazole**

De nombreuses études se sont concentrées sur ces deux triazoles isomères. Ils ont été évalués contre plusieurs cibles biologiques en tant qu'anti-inflammatoire, antiplaquettaire, antimicrobien, anticancéreux, antivirale, etc. [135]. La plupart des médicaments commercialisés contiennent le 1,2,4-triazole, ils sont utilisés pour le traitement de différents types de maladies,

[133] G. Şerban, „2,4-triazoles as intermediates for the synthesis of hybrid molecules. *Farmacia*. 64, **2016**, 549-552.

[134] KT. Potts. The chemistry of 1,2,4-triazole. *Chem Rev.* 61, **1961**, 87-127.

[135] V. F. Ferreira, D. R. da Rocha, F. C. da Silva, et al. Novel 1H-1,2,3-, 2H-1,2,3-, 1H-1,2,4- and 4H-1,2,4-triazole derivatives: a patent review. *Expert Opin. Ther. Pat.* 23, **2013**, 319-331

en particulier, les maladies fongiques [136]. A notre connaissance, un seul médicament contenant le 1,2,3-triazole est actuellement commercialisé comme antibiotique [132, 137].

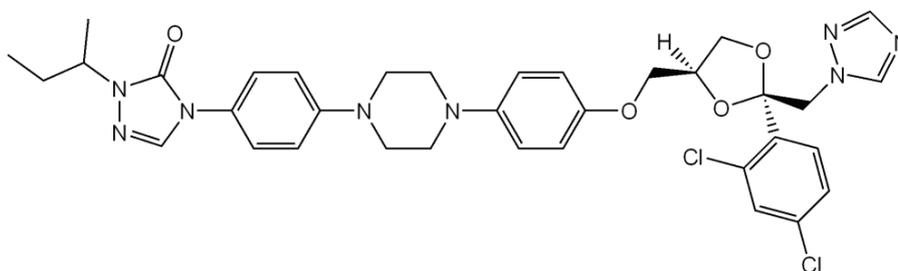
### I.1.1. Les 1,2,4-triazoles

Parmi les médicaments 1,2,4-triazolés les plus connus, on trouve le fluconazole. C'est l'un des médicaments les plus prescrits dans le cadre de la prise en charge des infections fongiques (**Figure 76**). Il est actif contre la plupart des espèces de *Candida*.



**Figure 76: Structure de fluconazole**

L'itraconazole (**Figure 77**), est un autre médicament 1,2,4-triazolés utilisé pour traiter les infections fongiques. Il a un spectre d'activité plus large que le fluconazole, en raison de son activité contre l'*Aspergillus*.

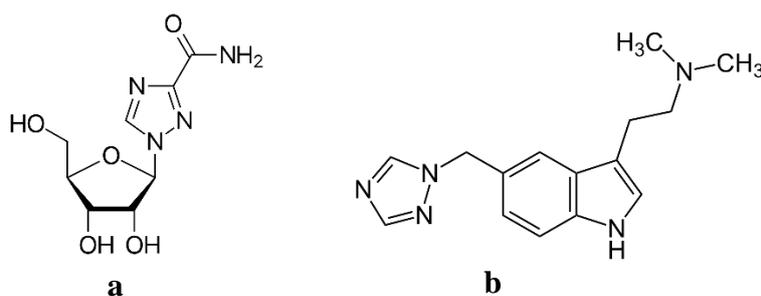


**Figure 77: Structure de l'itraconazole**

Les dérivés 1,2,4-triazolés sont également commercialisés comme médicament antiviral. La ribavirine (**Figure 78:a**) par exemple, est connue pour son utilisation contre la réplication du virus de l'hépatite C. Le rizatriptane (**Figure 78:b**), quant à lui, est un analgésique indiqué pour le traitement aigu des migraines.

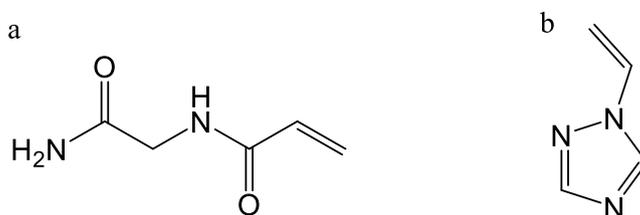
[136] S. Scodavolpe, S. Quaranta, B. Lacarelle, et al. Triazole antifungal agents: practice guidelines of therapeutic drug monitoring and perspectives in treatment optimization. *Ann. Biol. Clin.* 72, 2014, 391-404.

[137] J. Rademacher and T. Welte. New antibiotics – standstill or progress. *Medizinische Klinik - Intensivmedizin und Notfallmedizin.* 112, 2017, 206-213.



**Figure 78: Structure de la ribavirine et du rizatriptane**

Les dérivés 1,2,4-triazoles présentent également des propriétés antibactériennes. Wang et coll. [138] ont synthétisé un hydrogel antibactérien contenant le motif 1,2,4-triazole. Pour ce faire, ils ont copolymérisé deux monomères, le N-acryloyl glycinamide (NAGA) et le 1-vinyl-1,2,4-triazole (VTZ) (Figure 79).



**Figure 79: Structure du N-acryloyl glycinamide et de 1-vinyl-1,2,4-triazole**

L'activité antibactérienne de l'hydrogel élaboré a été évaluée contre *E. coli* et *S. aureus*. L'hydrogel à base de poly-NAGA n'a aucune activité antibactérienne. Cependant, celui à base de poly-NAGA et poly-VTZ, présente une activité antibactérienne vis-à-vis des deux souches bactériennes étudiées. Cette activité augmente avec l'augmentation de la teneur en poly-VTZ.

### I.1.2. Les 1,2,3-triazoles

Les composés 1,2,3-triazolés ont montré de nombreuses propriétés biologiques anti-inflammatoire [139], anticancéreuse [140], antituberculeuse [141], antiparasitaire [142],

[138] H. Wang, H. Zhu, W. Fu, et al. A High Strength Self-Healable Antibacterial and Anti-Inflammatory Supramolecular Polymer Hydrogel. *Macromol. Rapid Commun.* 38, **2017**.

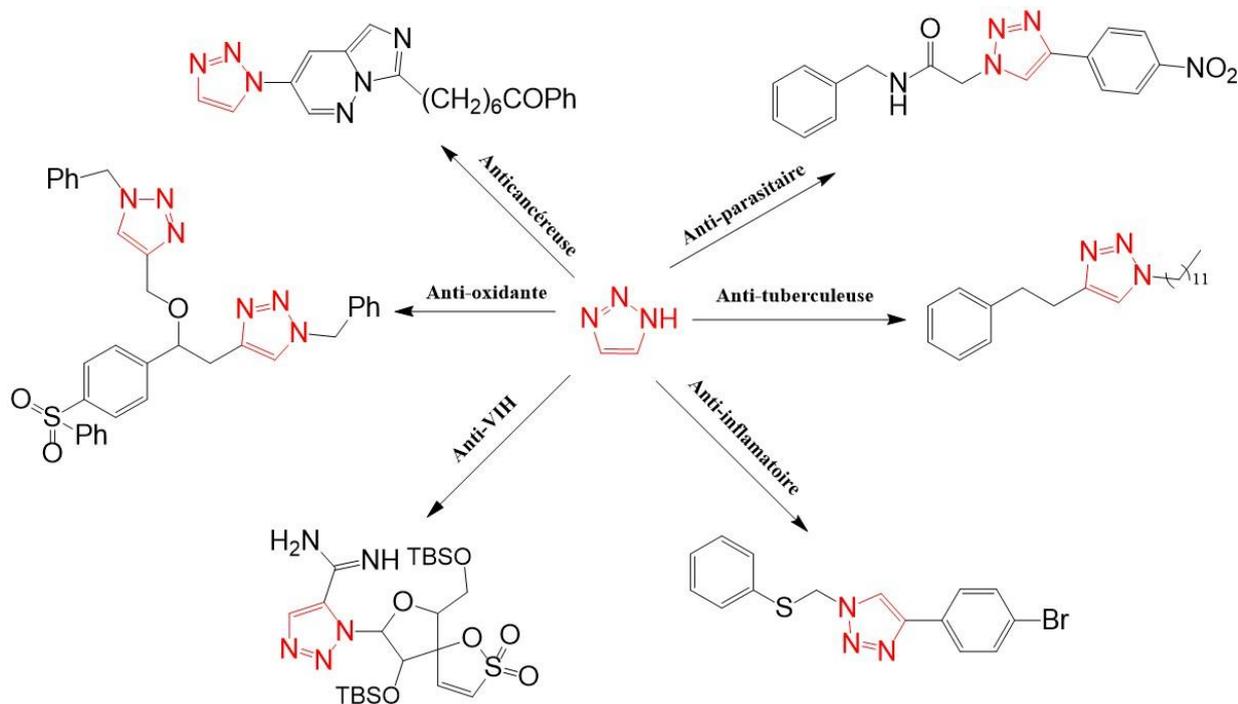
[139] R. De Simone, M. G. Chini, I. Bruno, et al. Structure-based discovery of inhibitors of microsomal prostaglandin E2 synthase-1, 5-lipoxygenase and 5-lipoxygenase-activating protein: promising hits for the development of new anti-inflammatory agents. *J. med. chem.* 54, **2011**, 1565-75.

[140] K. Jabeena, H. Irfan, J. L. Gayatri, et al. Conception et synthèse du roman 1,2,3-triazole dérivés de la coronopiline en tant que composés anticancéreux. *Eur. J. Med. Chem.* 82, **2014**, 255-262.

[141] R. S. Keri, S. A. Patil, S. Budagumpi et al. Triazole: A Promising Antitubercular Agent. *Chem. Biol. Drug Des.* 86, **2015**, 410-423.

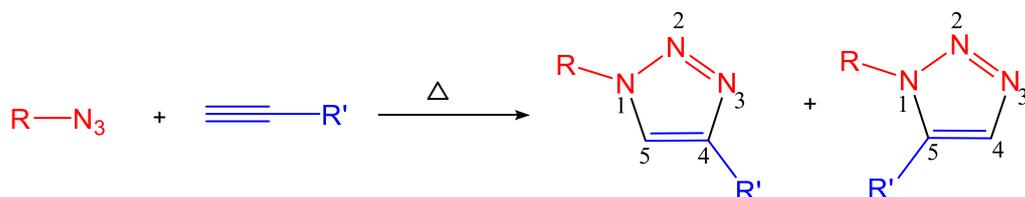
[142] P. de Andrade, O. A. Galo, M. R. Carvalho, et al. 1,2,3-Triazole-based analogue of benzimidazole displays remarkable activity against *Trypanosoma cruzi*. *Bioorganic Med. Chem.* 23, **2015**, 6815-6826.

antioxydante [143] et notamment antibactérienne. Certains de ces composés sont représentés sur la **figure 80**.



**Figure 80: Exemple de molécules bioactives à base de 1,2,3-triazole**

Les composés 1,2,3-triazolés font l'objet d'un regain d'attention en raison de leur large spectre d'activité biologique [144], et de leur synthèse simplifiée grâce à la cycloaddition de Huisguen catalysée par le cuivre I [145]. La synthèse des 1,2,3-triazoles a été décrite par Huisguen en 1963 [146], elle nécessitait des températures élevées, des temps de réactions longs et conduisait à un mélange de deux triazoles isomères di-substitués, 1,4 et 1,5 (**Figure 81**).



**Figure 81: Réaction de cycloaddition azoture/alcyne de Huisguen conduisant à deux triazoles isomères**

[143] D. Ashok, S. Gundu, V. K. Aamate, et al. Microwave-assisted synthesis, antioxidant and antimicrobial evaluation of 2-indolinone-based bis-1,2,3-triazole derivatives. *Mol. divers.* 22, **2018**, 57-70.

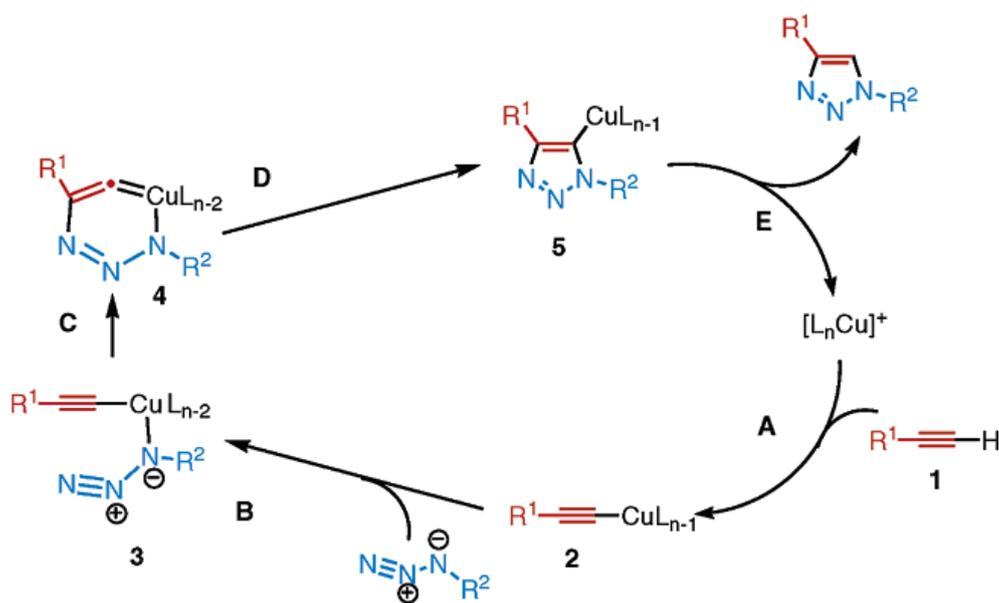
[144] D. Dheer, V. Singh, R. Shankar. Medicinal attributes of 1,2,3-triazoles: Current developments. *Bioorg. Chem.* 71, **2017**, 30-54.

[145] H. C. Kolb and K. B. Sharpless. The growing impact of click chemistry on drug discovery. *Drug Discov. Today.* 8, **2003**, 1128-1137.

[146] R. Huisguen. 1,3-Dipolar Cycloadditions. *Angew. Chem. Int. Ed.* 2, **1963**, 1-10.

L'étude de cette réaction par Sharpless et Meldal en 2002 [147] utilisant le cuivre I comme catalyseur, a donné naissance à la cycloaddition 1,3-dipolaire azoture/alcyne catalysée par le cuivre (CuAAC). Cela a permis de diminuer considérablement les temps et les températures de réaction et a permis d'obtenir uniquement l'isomère 1,4-disubstitué du 1,2,3-triazole.

Le mécanisme de cette réaction a été proposé en 2005 par Himo et coll. [148] (**Figure 82**). Le cycle catalytique commence par la formation d'un complexe Cu-Acétylide **2**, suivi par la formation d'un complexe Cu-Acétylide-Azoture **3**. Ce dernier se cyclise en formant un métallacycle de cuivre intermédiaire **4**. Une fois le triazole **5** formé, le catalyseur est régénéré par scission de la liaison Cu-C.



**Figure 82: Mécanisme de cycloaddition 1,3-dipolaire azoture/alcyne catalysée par le cuivre**

La cycloaddition 1,3-dipolaire de Huisgen catalysée par le cuivre est considérée comme la réaction la plus utilisée du concept de « Click chemistry ». Ce concept est une récente façon de concevoir la construction moléculaire, il regroupe des réactions simples à mettre en œuvre, insensibles à l'oxygène et à l'eau et ne nécessitant pas de purification chromatographique. Elles ne génèrent que des sous-produits inoffensifs et donnent des rendements élevés avec une grande variété de substrats de départ.

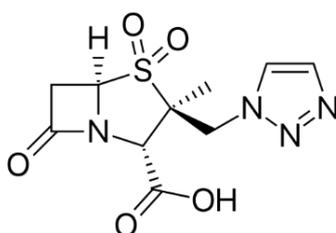
[147] V. V. Rostovtsev, L. G. Green, V. V. Fokin, et al. A Stepwise Huisgen Cycloaddition Process: Copper-Catalyzed Regioselective; Ligation of Azides and Terminal Alkynes. *Angew Chem Int.* 41, **2002**, No. 14

[148] F. Himo, T. Lovell, R. Hilgraf, et al. Copper(I)-Catalyzed Synthesis of Azoles. DFT Study Predicts Unprecedented Reactivity and Intermediates. *J. Am. Chem. Soc.* 127, **2005**, 210-216.

Cette approche de « Click chemistry » a permis la production d'un grand nombre de 1,2,3-triazoles 1,4-disubstitués, en vue d'une application antimicrobienne.

Sur le marché pharmaceutique, le noyau 1,2,3-triazole est le pharmacophore d'inhibiteurs de  $\beta$ -lactamases bactériennes. Ces dernières sont des enzymes produits par des bactéries, qui sont à l'origine de résistance aux antibiotiques  $\beta$ -lactamines tels que la pénicilline.

Le tazobactame (**Figure 83**) est le seul médicament 1,2,3-triazolé commercialisé, prescrit en combinaison avec des  $\beta$ -lactamines pour traiter les infections liées aux bactéries résistantes à ces derniers [149, 150]. Il se lie de façon irréversible au site actif des bêta-lactamases. Cela protège les autres antibiotiques de la famille des  $\beta$ -lactamines de la catalyse des  $\beta$ -lactamases.



**Figure 83: Structure du tazobactame**

Plusieurs travaux sont axés sur la conception de nouvelles molécules antimicrobiennes à base de 1,2,3-triazole. Pour ce faire, il existe deux cas de figure, soit le 1,2,3-triazole est utilisé pour développer de nouvelles molécules antimicrobiennes à partir de substrats inactifs, soit le 1,2,3-triazole est couplé à des molécules antimicrobiennes connues, pour optimiser leur activité biologique.

#### **I.1.2.1. Utilisation du 1,2,3-triazole pour l'optimisation de l'activité antimicrobienne**

L'addition du noyau 1,2,3-triazole à la structure de molécules antimicrobiennes connues, peut conduire à des activités complémentaires et/ou avec des cibles pharmacologiques multiples. C'est ainsi que Faidallah et coll. [151] ont synthétisé des dérivés 1,2,3-triazolés de trois

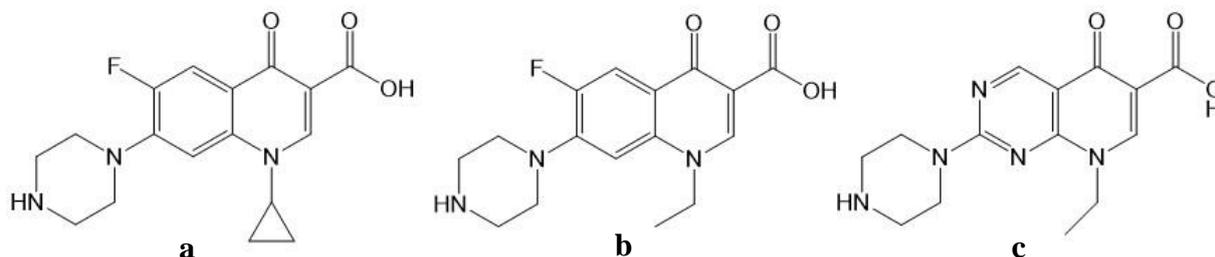
---

[149] H. W. Boucher, G. H. Talbot, D. K. Benjamin, *et al.* 10 × '20 Progress—Development of New Drugs Active Against Gram-Negative Bacilli: An Update From the Infectious Diseases Society of America. *Clin. Infect. Dis.*, 12, **2013**, 1685–1694.

[150] S. M. Tamma, A. J. Hsu, P. D. Tamma. Prescribing Ceftolozane/Tazobactam for Pediatric Patients: Current Status and Future Implications. *Pediatr. Drugs*, 18, **2015**, 1-11.

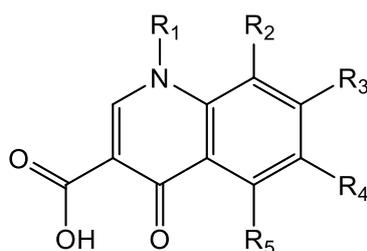
[151] H. M. Faidallah, S. A. Girgis, A. D. Tiwari, *et al.* Synthesis, antibacterial properties and 2D-QSAR studies of quinolone-triazole conjugates. *Eur. J. Med. Chem.*, 143, **2018**, 1524-1534.

antibiotiques appartenant aux familles des quinolones : le ciprofloxacine, le norfloxacine et l'acide pipemidique (**Figure 84**).



**Figure 84: Structure du ciprofloxacine (a), du norfloxacine (b) et de l'acide pipemidique (c)**

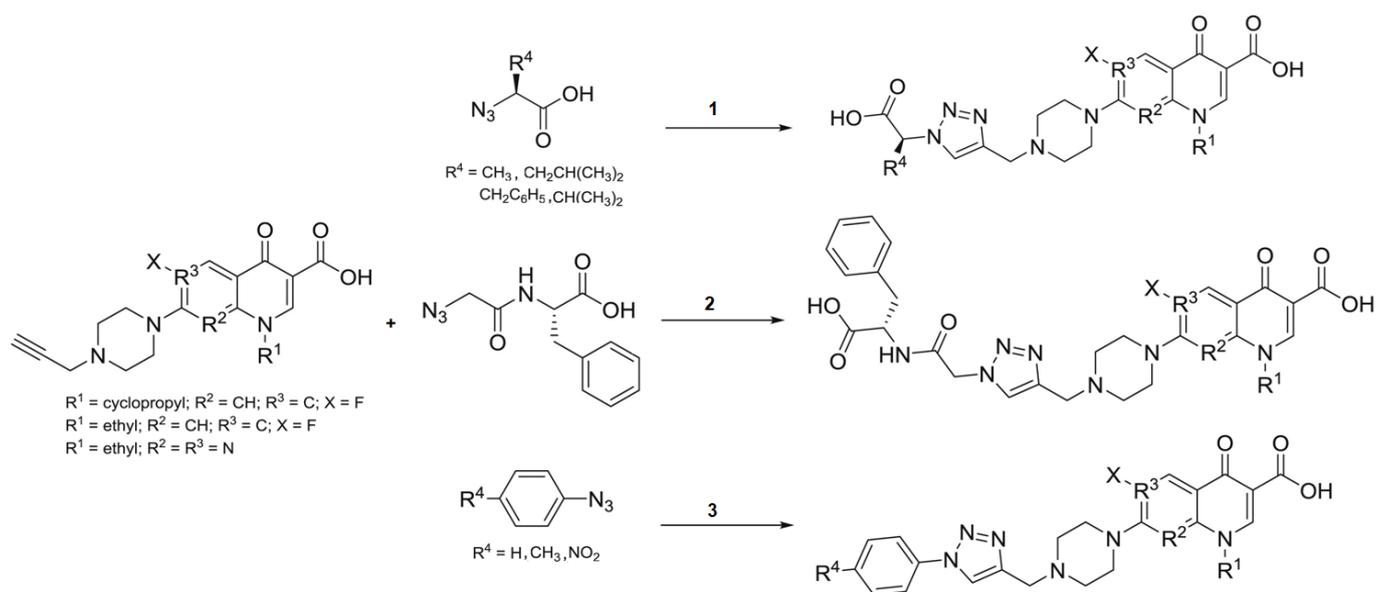
Les quinolones (**Figure 85**) sont des molécules connues par leur activité bactéricide et sont utilisées dans le traitement des infections nosocomiales contractées à la suite de la pose de cathéters urinaires, des infections osseuses, ainsi que dans le cas des infections sexuellement transmissibles tels que la blennorragie gonococcique causée par *Neisseria gonorrhoeae*.



**Figure 85: Structure de base des quinolones**

Cependant, la résistance à cette famille d'antibiotiques ne cesse d'augmenter chez de nombreuses souches microbiennes [152]. Le couplage de ces antibiotiques avec des dérivés 1,2,3-triazole a permis d'obtenir de nouvelles molécules avec des activités bactéricides supérieures à celle des trois antibiotiques de départ. Pour cela, les antibiotiques ont été propargylés, puis couplés à trois types de molécules azidées, des acides aminés, des peptides, et des aromatiques (**Figure 86**). L'utilisation d'acides aminés et de peptides peut augmenter la lipophilie des antibiotiques les rendant plus actifs.

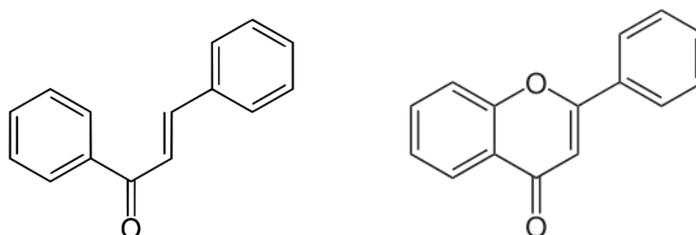
[152] E. Cambau and T. Guillard. Antibactériens agissant sur la synthèse et la conformation des acides nucléiques. *Rev. sci. tech. Off int. Epiz.* 31, **2012**, 65-76.



**Figure 86: Schéma de couplage de différentes molécules azidées aux antibiotiques; 1: couplage des acides aminés; 2: couplage des peptides; 3: couplage d'aryles [151]**

L'étude de l'activité antibactérienne des différentes molécules synthétisées a été réalisée contre deux bactéries à Gram positif, *Staphylococcus aureus*, et *Streptococcus pyogenes*, et trois bactéries à Gram négatif, *P. aeruginosa*, *E. coli*, *Salmonella typhimurium*. Les résultats ont montré que les molécules obtenues par couplage d'aryl-1,2,3-triazoles aux quinolones présentaient une activité antibactérienne supérieure à celle obtenue par couplage avec des acides aminés ou des peptides. Ces molécules présentent également une activité plus élevée que celle des antibiotiques de départ, vis-à-vis des souches bactériennes testées.

Dans une même approche, Kant et coll. [153] ont synthétisé des dérivés 1,2,3-triazolés de chalcone et de flavone (**Figure 87**).



**Figure 87: Structure de la chalcone et de la flavone**

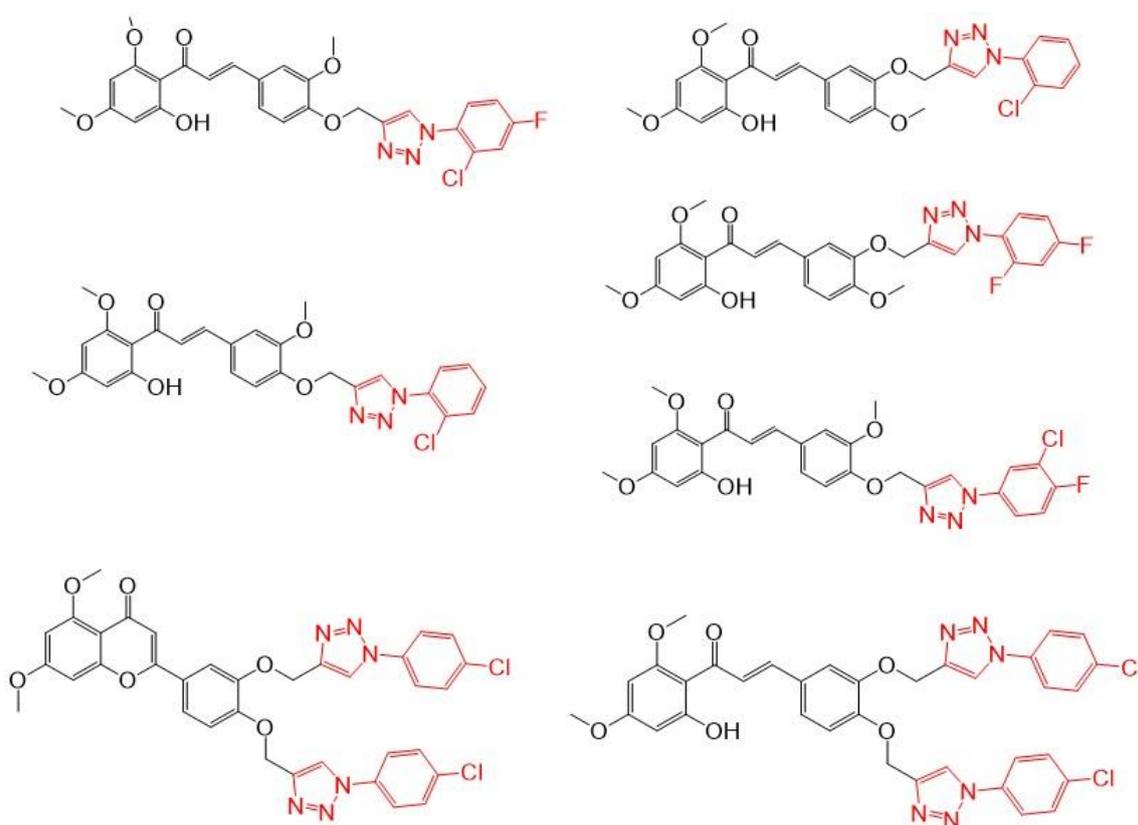
La chalcone est le noyau d'une classe de composés chimiques qui présente un large spectre d'activité, anticancéreuse, anti-inflammatoire et antibactérienne.

[153] R. Kant, D. Kumar, D. Agarwal, et al. Synthesis of newer 1,2,3-triazole linked chalcone and flavone hybrid compounds and evaluation of their antimicrobial and cytotoxic activities. *Eur. J. Med. Chem.* 113, **2016**, 34-49.

Les flavones quant à elles, sont des colorants végétaux qui possèdent également des propriétés antioxydantes, anticancéreuses et antibactériennes.

La synthèse de différentes molécules contenant des aryl-1,2,3-triazolés liés aux chalcones et aux flavones a été réalisée, puis leur activité antibactérienne a été testée vis-à-vis de deux bactéries à Gram positif, *S. aureus* et *E. faecalis* et quatre bactéries à Gram négatif, *E. coli*, *P. aeruginosa*, *Klebsiella pneumoniae* et *Shigella boydii*.

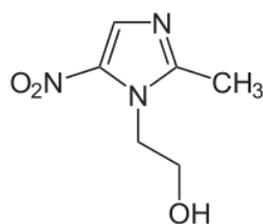
Parmi les vingt-cinq composés synthétisés, sept ont présenté une activité similaire au ciprofloxacine (**Figure 88**), un antibiotique utilisé comme contrôle. Les autres molécules ont été moins actives que ce dernier.



**Figure 88: Molécules possédant les meilleures activités antibactériennes [153]**

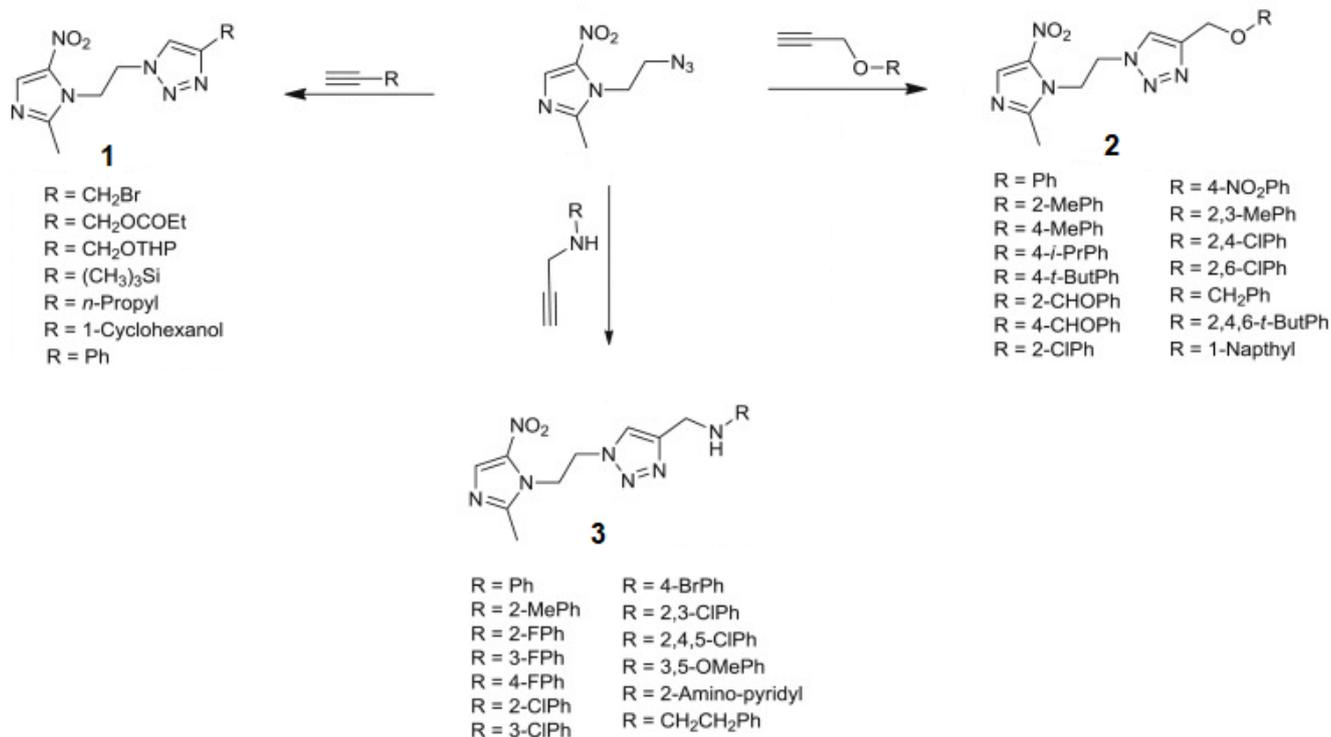
Negi et coll. [154] quant à eux, ont synthétisé des dérivés 1,2,3-triazolés de métronidazole (**Figure 89**), un antibiotique et un antiparasitaire souvent utilisé pour traiter les infections abdominales, vaginales et intestinales.

[154] B. Negi, D. Kumar, W. Kumbukgolla, et al. Anti-methicillin resistant *Staphylococcus aureus* activity, synergism with oxacillin and molecular docking studies of metronidazole-triazole hybrids. *Eur. J. Med. Chem.* 115, 2016, 426-437.



**Figure 89: Structure de métronidazole**

Le métronidazole a été azidé puis couplé à différentes molécules propargylées afin de former les dérivés 1,2,3-triazolés (**Figure 90**).



**Figure 90: Schéma de synthèse des dérivés de métronidazole [154]**

L'activité antibactérienne des molécules synthétisées a été évaluée contre trente souches de *S. aureus* résistantes à la méticilline (SARM) et insensibles au métronidazole. L'oxacilline, un antibiotique qui présente une activité antibactérienne contre les souches étudiées, a été utilisé comme référence.

Les résultats ont montré que tous les composés synthétisés présentent une activité contre l'une ou l'autre des souches de SARM avec une concentration minimale inhibitrice (CMI) de 64 µg/mL. Le composé **2** avec le substituant 2,4-dichlorophényle a présenté la meilleure activité. Avec une CMI de 4 µg/mL, il est actif contre neuf souches de SARM, tandis qu'à cette

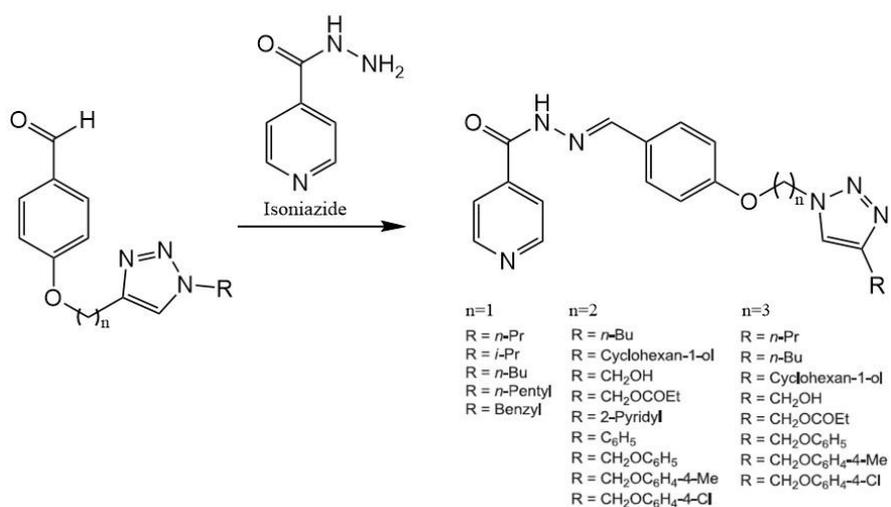
concentration, l'oxacilline de référence ne présente aucune activité. Elle ne présente d'activité qu'à partir d'une CMI de 16 µg/mL contre une seule souche.

Par ailleurs, les 1,2,3-triazoles couplés à des antibactériens se sont révélés efficaces contre *Mycobacterium tuberculosis*, une bactérie spécifique responsable de la tuberculose. Elle présente la propriété d'acido-alcool-résistance liée à la structure de sa paroi cellulaire. Elle a une croissance très lente (2 à 3 semaines) par rapport aux autres bactéries.

Kumar et coll. [155] se sont intéressés à l'isoniazide, un antibiotique utilisé pour le traitement de la tuberculose depuis 1950 [156].

Les souches bactériennes résistantes à cet antibiotique deviennent courantes, avec l'émergence de cas de tuberculose causées par des souches de *Mycobacterium tuberculosis* multi résistantes, en particulier chez les personnes infectées par le VIH.

Les auteurs ont synthétisé différents dérivés 1,2,3-triazolés de l'isoniazide (**Figure 91**), ils ont par la suite évalué leur activité antimicrobienne contre *Mycobacterium tuberculosis*.



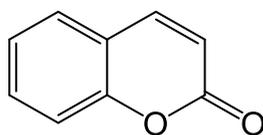
**Figure 91: Schéma de synthèse des dérivés 1,2,3-triazolés de l'isoniazide [155]**

Le composé portant le substituant 4-chlorophényloxyméthyle (R=CH<sub>2</sub>OC<sub>6</sub>H<sub>4</sub>-4-Cl), est le dérivé le plus actif, il est deux fois plus actif que l'isoniazide. Les autres composés ont une activité similaire à ce dernier.

[155] D. Kumar, Beena, G. Khare, et al. Synthesis of novel 1,2,3-triazole derivatives of isoniazid and their in vitro and in vivo antimycobacterial activity evaluation. *Eur. J. Med. Chem.* 81, **2014**, 301-313.

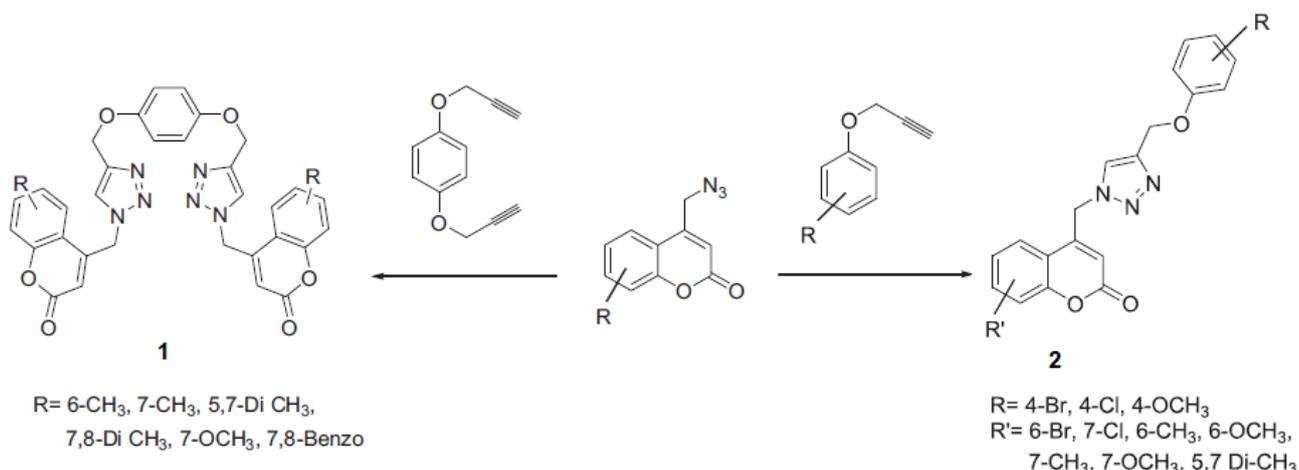
[156] F. Brossier. Mechanisms of action and resistance to INH, a first-line antituberculous drug. *J. Anti. Infect.* 13, **2011**, 217-227.

Dans une même approche, Anand et coll. [157] ont synthétisé plusieurs dérivés 1,2,3-triazolés de la coumarine (**Figure 92**), une molécule naturelle connue pour ses propriétés antibactériennes [158], dont l'utilisation a entraîné des résistances chez certaines bactéries comme *E. coli* et *Mycobacterium tuberculosis* [159,160].



**Figure 92: Structure de la coumarine**

L'activité antimicrobienne des composés synthétisés (**Figure 93**) a été étudiée sur *Mycobacterium tuberculosis*. Les résultats microbiologiques ont montré que le bis-coumarinyl-triazole **1** a été plus actif que le mono-coumarinyl-triazole **2**.



**Figure 93: Schéma de synthèse de dérivés 1,2,3-triazolés de la coumarine; 1: Bis-coumarinyl-triazole; 2: Mono-coumarinyl-triazole [157]**

La nature du substituant « R » sur le phényle influence l'activité des molécules élaborées. En effet, le bis-coumarinyl-triazole portant le groupement méthyle a présenté la meilleure activité, elle est supérieure à l'activité du pyrazinamide, un médicament utilisé pour traiter la tuberculose.

[157] A. Anand, R. J. Naik, H. M. Revankar, et al. A click chemistry approach for the synthesis of mono and bis aryloxy linked coumarinyl triazoles as anti-tubercular agents. *Eur. J. Med. Chem.* 105, **2015**, 194-207.

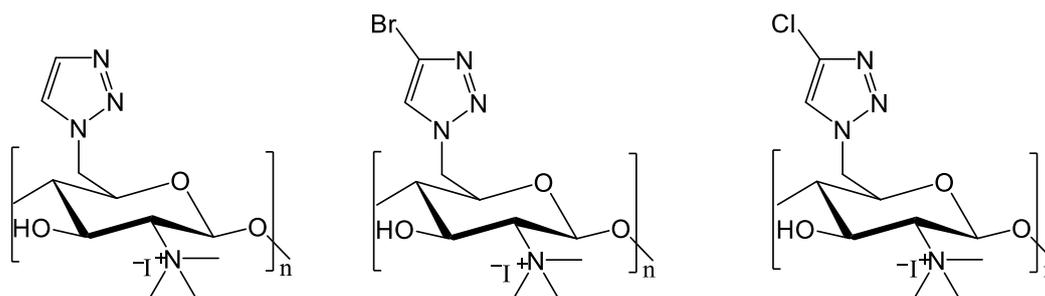
[158] S. M. De Souza, F. M. Delle, A. J. Smania. Antibacterial activity of coumarins. *Z Naturforsch C.* 60, **2005**, 693-700.

[159] A. Contreras, A. Maxwell. *GyrB* mutations which confer coumarin resistance also affect DNA supercoiling and ATP hydrolysis by *Escherichia coli* DNA gyrase. *Mol. Microbiol.* 6, **1992**, 1617-1624.

[160] A. Fillion, A. Pantel, N. Veziris et al. Fluoroquinolone and drug-resistant tuberculosis. *La Lettre de l'Infectiologue.* Tome XXVII - n° 1 - janvier-février **2012**.

Son activité est également supérieure à celle de deux antibiotiques bactéricides, la streptomycine et le ciprofloxacine.

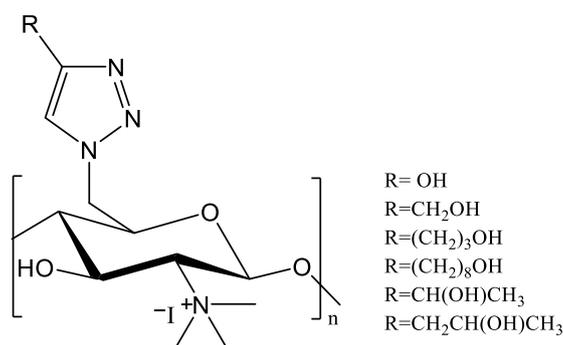
Les dérivés 1,2,3-triazolés ont également été couplés au chitosan pour améliorer son activité antimicrobienne. C'est ainsi que Li et coll. [161] ont synthétisé trois dérivés du chitosan, l'un contenant un triazole non substitué, l'autre contenant un triazole substitué par un atome de brome et le troisième contenant un triazole substitué par un atome de chlore (**Figure 94**).



**Figure 94: Dérivés 1,2,3-triazolés de chitosan [161]**

L'activité antifongique du chitosan non modifié ainsi que des trois dérivés 1,2,3-triazolés synthétisés, a été évaluée sur trois champignons communs menaçant les plantes, *Colletotrichum Lagenarium*, *Fusarium oxysporum. Sp. cucumebrium* et *Fusarium oxysporum f. sp. niveum*. Le chitosan non modifié présente une activité antifongique vis-à-vis des trois champignons testés avec des taux d'inhibition de la croissance de 30%, 15% et 24% respectivement. Les trois dérivés 1,2,3-triazolés présentent une activité antifongique avec un taux d'inhibition supérieur à 80%.

Dans une autre étude, Li et coll. [162] ont synthétisé d'autres dérivés de chitosan contenant le 1,2,3-triazole substitué par des alcools de longueurs de chaîne différentes (**Figure 95**).



**Figure 95: Dérivés de chitosan contenant du triazole substitué par des alcools [162]**

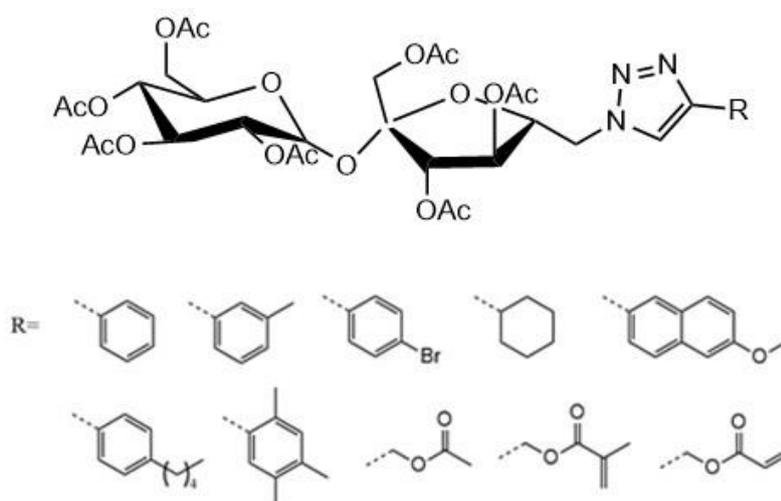
[161] Q. Li, W. Tan, C. Zhang, et al. Synthesis of water soluble chitosan derivatives with halogeno-1,2,3-triazole and their antifungal activity. *Int. J. Biol. Macromol.* 91, **2016**, 623–629.

[162] Q. Li, W. Tan, C. Zhang, et al. Novel triazolyl-functionalized chitosan derivatives with different chain lengths of aliphatic alcohol substituent: Design, synthesis, and antifungal activity. *Carbohydrate Res.* 418, **2015**, 44-49.

L'évaluation de l'activité antimicrobienne contre *Phomopsis asparagi* et *Colletotrichum lagenarium*, montre que les dérivés du chitosan synthétisés présentent une activité supérieure à celle du chitosan non modifié et celle du chitosan protoné. L'activité de ces dérivés augmente avec une augmentation de la longueur de la chaîne alkyle du substituant.

### I.1.2.2. Utilisation du triazole pour développer de nouvelles molécules antimicrobiennes à partir des substrats inactifs.

Le triazole et ces dérivés ont également été utilisés pour apporter des propriétés antibactériennes à des substrats inactifs. Petrova et coll. [163] ont synthétisé des dérivés 1,2,3-triazolés de saccharose (**Figure 96**). Le fragment saccharose grâce à ses hydroxyles peut améliorer la solubilité dans l'eau et augmenter l'interaction entre le récepteur et le substrat pour la reconnaissance moléculaire.



**Figure 96: Différents dérivés 1,2,3-triazolés de saccharose [163]**

Les activités antibactérienne et antifongique des différents composés ont été évaluées sur des bactéries et des champignons impliqués dans la contamination clinique et agroalimentaire, comme *S. aureus*, *B. cereus*, *L. monocytogenes*, *P. aeruginosa*, *Salmonella typhimurium*, *E. coli*, *Aspergillus fumigatus*...

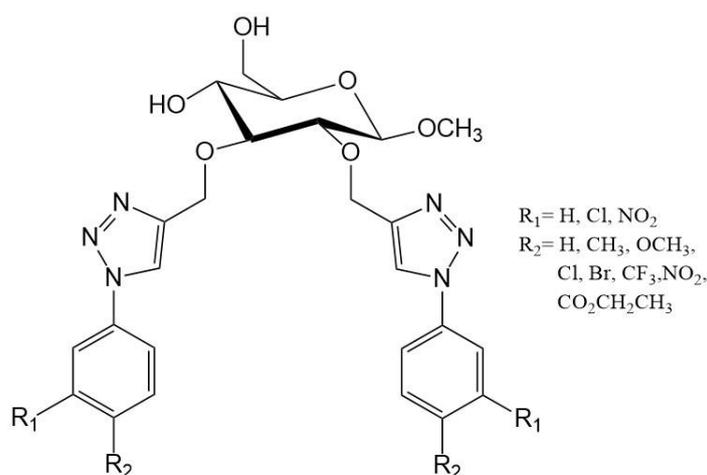
Tous les composés synthétisés ont montré une activité antimicrobienne vis-à-vis des souches testées, supérieure à celle de deux antibiotiques, la streptomycine, utilisée pour traiter par exemple la tuberculose et l'endocardite infectieuse, et l'ampicilline, utilisé pour traiter les

[163] K. T. Petrova, T. M. Potewar, P. Correia-da-Silva, et al. Antimicrobial and cytotoxic activities of 1,2,3-triazole-sucrose derivatives. *Carbohydrate Res.* 417, **2015**, 66–71.

infections des voies respiratoires et urinaires. Leurs activités sont également supérieures à deux fongicides, le bifonazole et le ketoconazole.

Le dérivé portant le substituant pentyle sur le phényle est le plus actif contre les différentes souches bactériennes testées, tandis que le composé portant le brome sur le phényle est le composé antifongique le plus actif.

Zhang et coll. [164] quant à eux ont synthétisé des dérivés 1,2,3-triazolés de D-glucose (**Figure 97**). L'activité antimicrobienne de ces composés a été évaluée sur trois bactéries à Gram négatif, *E. coli*, *P. aeruginosa* et *B. proteus*, deux bactéries à Gram positif, *S. aureus* et *B. subtilis*, une levure *Candida albicans* et un champignon *Aspergillus fumigatus*.



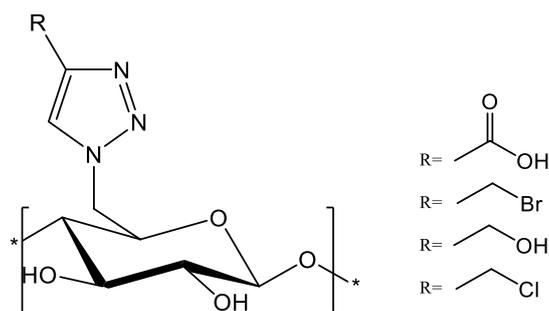
**Figure 97: Différents dérivés 1,2,3-triazolés de D-Glucose [164]**

Le composé portant un chlore en méta par rapport au triazole, possède une activité élevée contre *S. aureus* avec une CMI de 27,8 µg/mL, en comparaison avec un antibiotique bactériostatique, le chloramphénicol, qui a une CMI de 1590 µg/mL. Le composé portant un chlore en position *méta* et *para* des cycles benzéniques est quatre fois plus actif que le chloramphénicol sur *E. coli*. La nature des substituants sur les aryles influence l'activité des dérivés élaborés lors de cette étude.

Dans la même optique, Tan et coll. [165] ont élaboré de nouveaux dérivés de l'amidon 1,2,3-triazolés avec différents substituants sur le cycle triazole (**Figure 98**).

[164] H. Z. Zhang, J. J. Wei, K. V. Kumar, et al. Synthesis and biological evaluation of novel D-glucose-derived 1,2,3-triazoles as potential antibacterial and antifungal agents. *Med. Chem. Res.* 24, **2015**, 182–196.

[165] W. Tan, Q. Li, H. Wang, et al. Synthesis, characterization, and antibacterial property of novel starch derivatives with 1,2,3-triazole. *Carbohydr. Polym.* 142, **2016**, 1-7.



**Figure 98: Différents dérivés 1,2,3-triazolés d'amidon [165]**

L'activité antibactérienne des composés synthétisés a été évaluée contre *E. coli* et *S. aureus*. Le composé portant la fonction acide carboxylique a montré la meilleure activité contre les deux souches testées, suivie du composé avec le chlorométhyle. Le composé portant le bromométhyle est le moins actif.

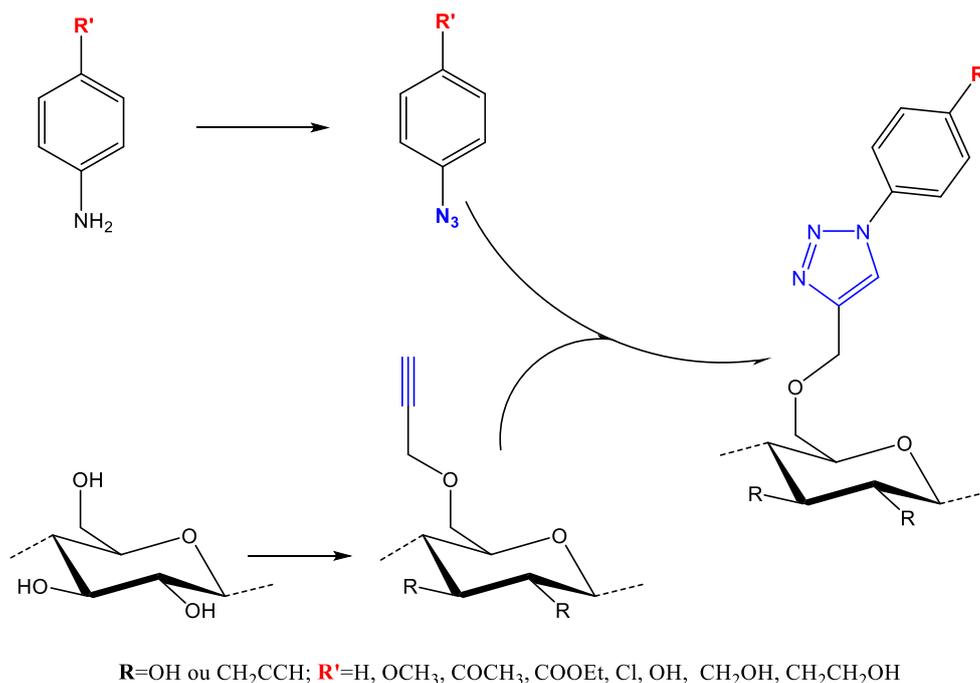
Comme le montre cette étude bibliographique, les dérivés 1,2,3-triazolés présentent une activité antibactérienne prometteuse. De plus, ils sont très utilisés contre les bactéries résistantes aux antibiotiques conventionnels. Nous nous sommes donc orientés vers l'élaboration d'un papier antibactérien contenant le motif aryl-1,2,3-triazole.

## II. Préparation de différents aryltriazoles supportés sur la pâte kraft

Les matériaux 1,2,3-triazolés ont été élaborés par greffage de molécules aromatiques azidées différemment substituées, sur des fibres de pâte kraft propargylée. Les matériaux développés n'acquièrent leur potentiel antimicrobien qu'après greffage des azido-aryles par réaction de cycloaddition de Huisgen, formant ainsi des aryltriazoles fixés sur les fibres de pâte Kraft.

### II.1. Stratégie de synthèse

La stratégie mise en œuvre au cours de ces travaux est présentée sur la **figure 99**. Dans un premier temps, on procède à la synthèse de l'azido-aryle et de la pâte Kraft propargylée avant de procéder à leur couplage, par réaction de cycloaddition de Huisgen (CuAAC).

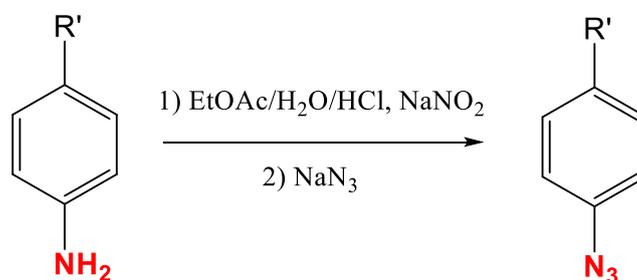


**Figure 99: Schéma général de synthèse de matériaux 1,2,3-triazolés**

Nous avons choisi de greffer des molécules aromatiques azidées portant différents substituants en position *para* du groupement azoture. La nature du substituant sur la partie aromatique peut être à l'origine d'effets biologiques différents, comme nous l'avons vu dans l'étude bibliographique.

## II.2. Synthèse des dérivés azidés

Les différents dérivés azidés ont été synthétisés à partir de l'amine aromatique commerciale correspondante (**Figure 100**), en utilisant le mode opératoire décrit par Cheng et coll. [166].



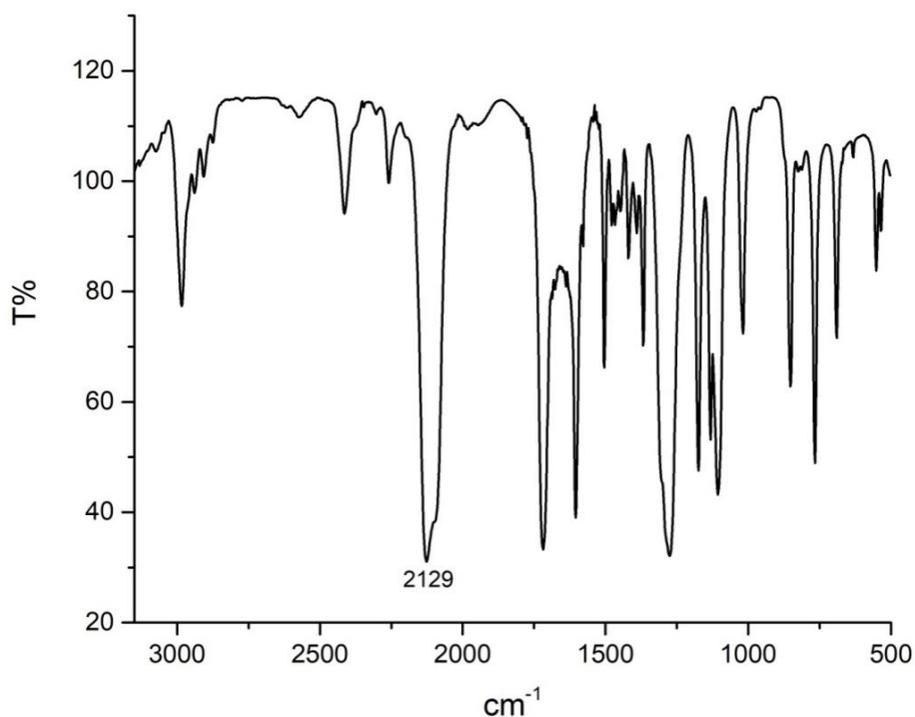
**Figure 100: Schéma de synthèse des azido-aryles**

[166] H. Cheng, J. Wan, M.I. Lin, et al. Design, synthesis and in vitro biological evaluation of 1 H 1,2,3 triazole - 4-carboxamide derivatives as new anti influenza A agents targeting virus nucleoprotein, *J. Med. Chem.* 55, **2012**, 2144-2153.

L'amine aromatique est solubilisée dans un mélange acétate d'éthyle/eau/acide chlorhydrique 37%, puis mise à réagir à 0°C avec du nitrite de sodium (2éq.) afin de former le sel de diazonium, intermédiaire réactionnel. Par la suite, l'azoture de sodium (2éq.) est ajouté au mélange, afin de former le produit azidé par substitution nucléophile sur aromatique.

Le produit obtenu est ensuite extrait par l'acétate d'éthyle, puis la fraction organique est lavée avec une solution saturée de NaHCO<sub>3</sub> et à l'eau. Après séchage de la phase organique sur MgSO<sub>4</sub> et évaporation du solvant, les produits azidés sont récupérés avec des rendements variants entre 84 et 100%.

L'analyse par spectroscopie infrarouge IR des différents produits révèle la présence d'une bande aux alentours de 2100 cm<sup>-1</sup>, correspondant à la fréquence de vibration d'élongation des liaisons N=N, caractéristique du groupement azoture. La **figure 101** représente un exemple de spectre infrarouge.



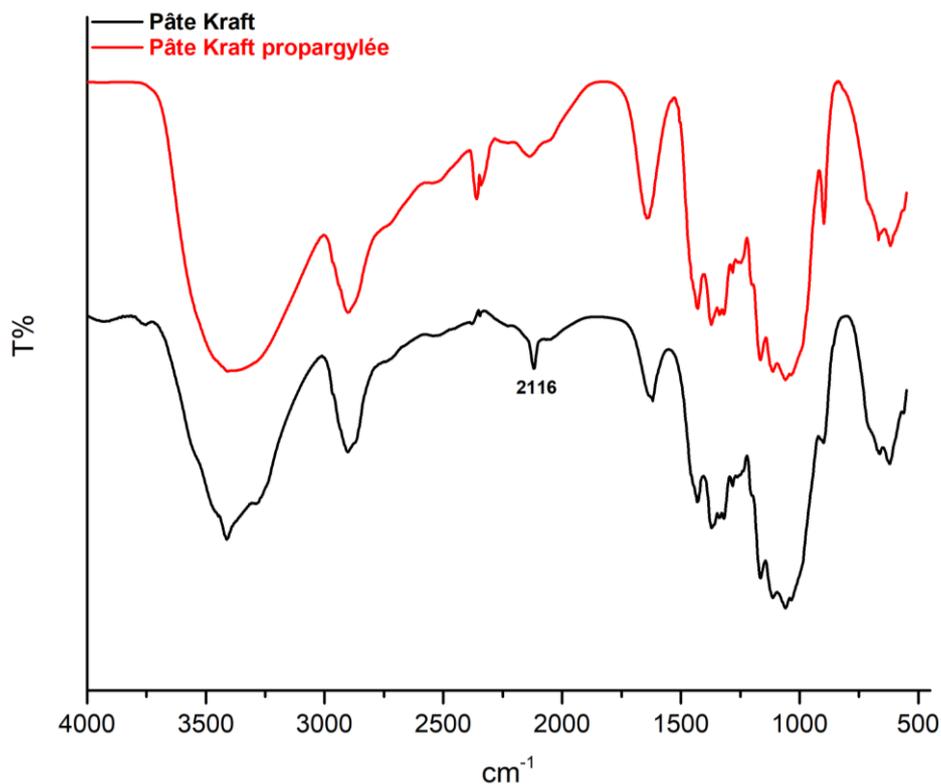
**Figure 101: Spectre IR de l'azidobenzène**

L'analyse des spectres RMN <sup>1</sup>H, montrent la disparition des protons issus du groupement amine (-NH<sub>2</sub>) et confirme la structure des molécules synthétisées. Les différents déplacements et la forme des signaux sont décrits dans la partie expérimentale.

### II.3. Préparation de la pâte kraft propargylée

La propargylation des fibres de pâte Kraft a été réalisée dans le système NaOH/H<sub>2</sub>O, suivant les travaux réalisés par Elchinger et coll. [167] et modifié par Lepetit et coll. [168]. Pour cela, les fibres sont dispersées dans une solution de NaOH (3éq. par UAG) pendant 20 min. Cette étape permet le gonflement des fibres cellulosiques et la rupture des liaisons hydrogène activant ainsi les fonctions alcool. Le bromure de propargyle est ensuite ajouté (10 éq. par UAG). Après 4 jours de réaction, sans agitation, par simple imbibition, les fibres sont lavées avec l'eau chaude et l'éthanol chaud puis séchées. Le produit est obtenu, sous la forme de fibres blanches, avec un rendement massique de 105 %.

L'analyse par spectroscopie infrarouge IR (**Figure 102**) révèle la présence d'une bande à 2116 cm<sup>-1</sup>, correspondant à la fréquence de vibration d'élongation de la triple liaison du propargyle.



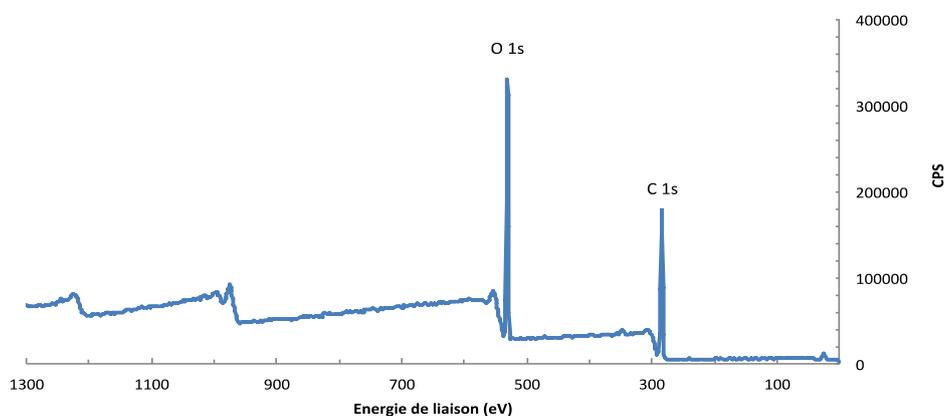
**Figure 102: Spectre IR de la pâte Kraft non modifiée et la pâte kraft propargylée**

[167] P. H. Elchinger, H. Awada, C. Zerrouki, et al. Kraft Pulp–Starch Covalent Linking: A Promising Route to a New Material. *Ind. Eng. Chem. Res.* 53, **2014**, 7604–7610.

[168] A. Lepetit, R. Drolet, B. Tolnai, et al. Alkylation of microfibrillated cellulose – A green and efficient method for use in fiber-reinforced composites. *Polymer.* 126, **2017**, 48-55.

L'analyse par spectroscopie photoélectronique X (XPS) montre la présence d'atome d'oxygène à 532 eV (O1s) et de carbone à 285 eV (C1s) (**Figure 103**). Cependant, l'analyse de la surface basée sur les signaux du carbone et de l'oxygène peut être faussée par des contaminations de surface. Il a été montré que les contaminants présents à la surface des fibres de cellulose contiennent du carbone, ce qui conduit à un désaccord entre la vraie composition élémentaire des fibres de cellulose et celle obtenue par analyse XPS [169,170].

Afin de corriger l'incertitude apportée par les contaminations de surface, nous avons analysé les fibres celluloses de la pâte Kraft qui vont servir de référence. L'analyse XPS des fibres Kraft propargylées montre que le rapport C/O est plus important que celui de la référence, ce qui confirme le greffage du groupement propargyle (**tableau 11**). Un DS de 0,32 a été déterminé, en assimilant les fibres de pâte Kraft à des fibres de cellulose.



**Figure 103: Spectre XPS de la pâte kraft propargylée**

**Tableau 11 : Résultats d'analyses XPS de la pâte kraft non modifiée et la pâte kraft propargylée**

	C 1s	O 1s	C/O
<b>Pâte kraft</b>	59,6%	40,4%	1,47
<b>Pâte kraft propargylée</b>	62,55%	37,45%	1,67

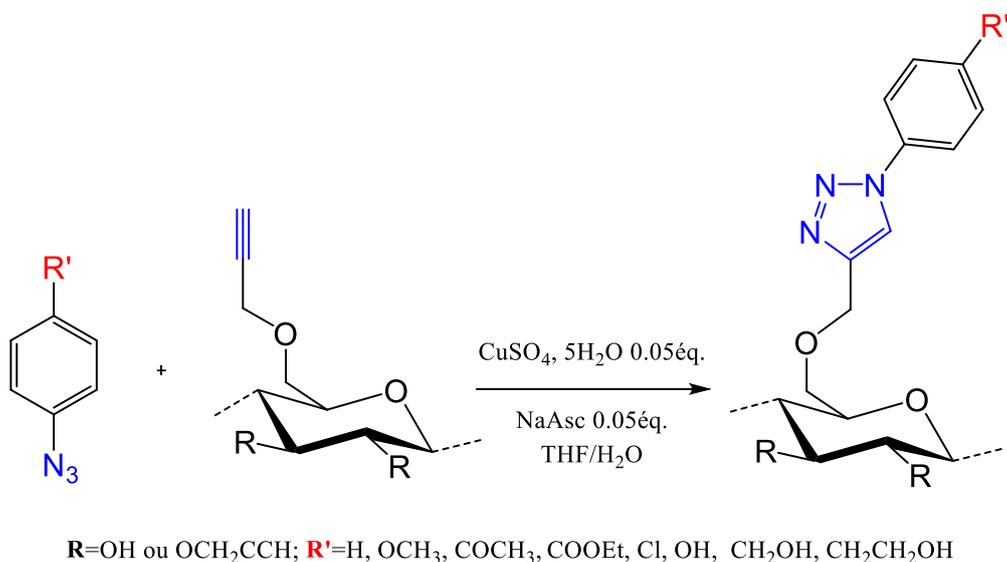
#### II.4. Réaction de cycloaddition entre la pâte Kraft propargylée et les dérivés azidés

Nous avons procédé à la fixation des azido-aryles synthétisés sur les fibres de pâte Kraft propargylées par réaction de cycloaddition de Huisgen. Pour cela, l'azido-aryle est mis à réagir

[169] D. Gilles, D. Gray. The surface analysis of paper and wood fibers by ESCA (electron spectroscopy for chemical analysis). I. Application to cellulose and lignin. *Cellulose Chem. Technol.* 12, **1978**, 9-23

[170] M.N. Belgacem, G. Czeremuskin, S. Sapiéha, et al. Surface characterization of cellulose fibres by XPS and inverse gas chromatography. *Cellulose.* 2, **1995**, 145–157.

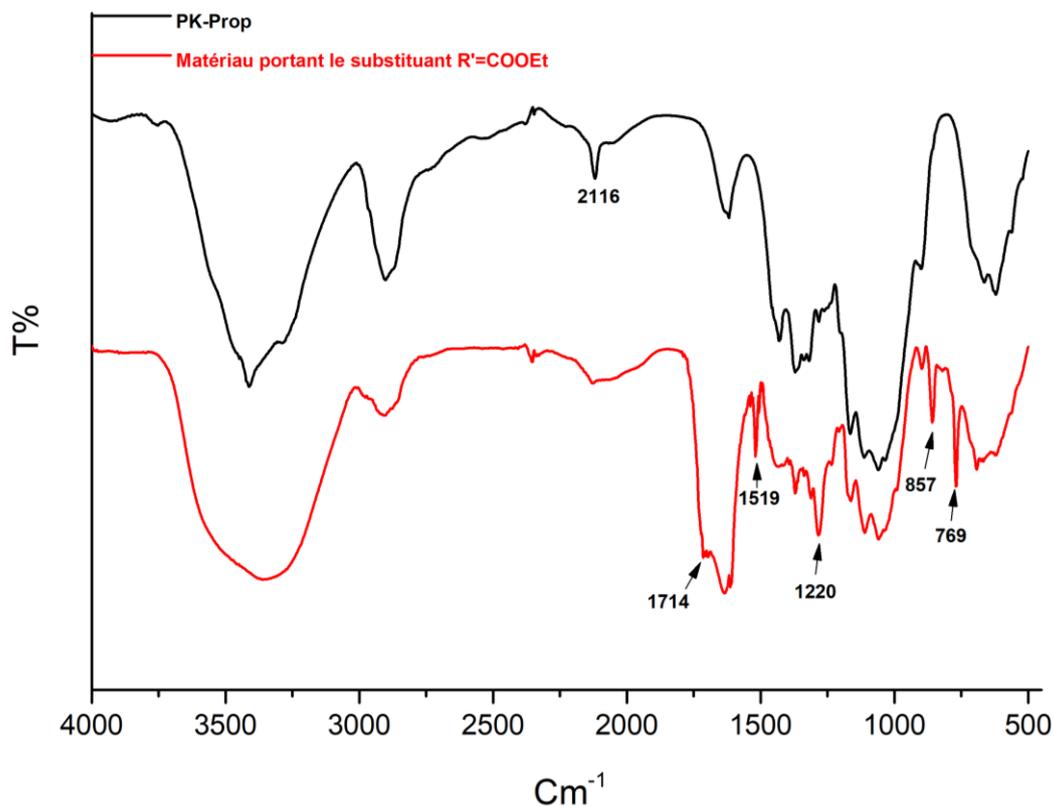
avec la pâte Kraft propargylée dans le THF, en présence de sulfate de cuivre (0,05 éq.) et d'ascorbate de sodium (0,1 éq.) (**Figure 104**).



**Figure 104: Schéma de greffage des azido-aryles sur la pâte kraft propargylée**

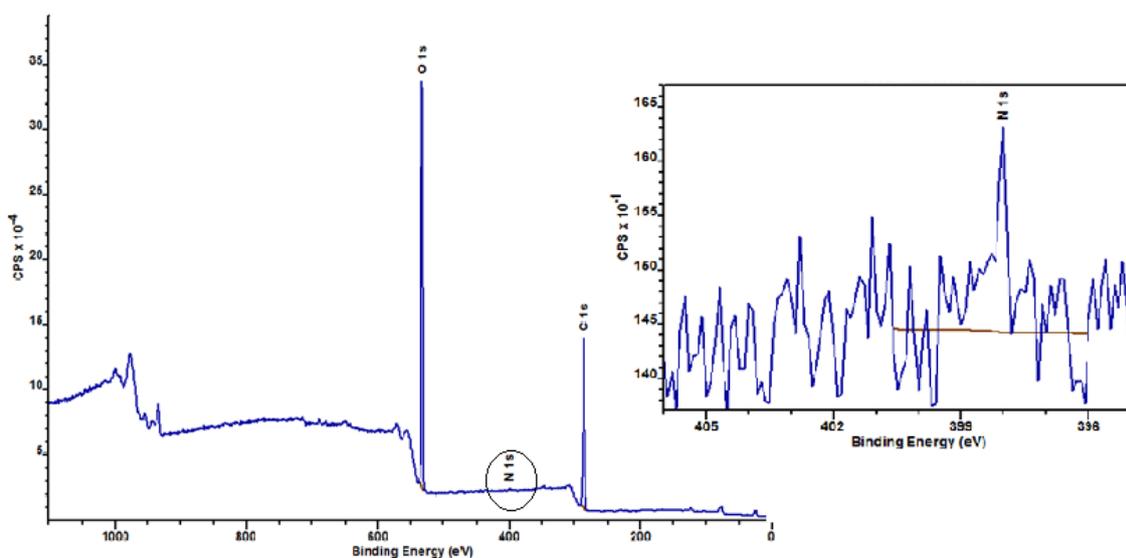
Après 3 jours de réaction à température ambiante et sous agitation magnétique, le mélange est filtré et la pâte Kraft modifiée obtenue est traitée au THF, pour éliminer le dérivé azidé libre, lavée à l'eau chaude et l'éthanol chaud, puis séchée à 60°C. Les fibres sont obtenues avec des rendements massiques de l'ordre de 120%.

L'analyse par spectroscopie IR des matériaux obtenus montre l'apparition des bandes caractéristiques des aryltriazoles greffés sur les fibres de pâte kraft avec la disparition quasi-totale de la bande caractéristique du groupement propargyle. La **figure 105** montre l'exemple du spectre IR du matériau portant le substituant éthoxycarbone ( $\text{R}'=\text{COOEt}$ ). En comparaison avec le spectre des fibres de pâte Kraft propargylée, on observe la disparition de la bande caractéristique du groupement propargyle avec l'apparition des bandes caractéristiques du groupement  $\text{COOEt}$  à  $1714\text{ cm}^{-1}$  et  $1220\text{ cm}^{-1}$  ainsi que les bandes caractéristiques du triazole à  $1519\text{ cm}^{-1}$ ,  $857\text{ cm}^{-1}$  et  $769\text{ cm}^{-1}$ .



**Figure 105: Spectre IR de la pâte Kraft propargylée et du matériau portant le substituant éthoxycarbonyle (R'=COOEt)**

L'analyse par XPS montre la présence d'atomes d'oxygène à 532,31 eV ( $\text{O}_{1s}$ ), de carbone à 285,81 eV ( $\text{C}_{1s}$ ) et d'azote à 399,31 eV ( $\text{N}_{1s}$ ) (**Figure 106**).



**Figure 106: Spectre XPS du matériau portant le substituant hydroxyle (R'=OH)**

**Tableau 12: Résultats d'analyses XPS de la pâte Kraft propargylée et du matériau portant le substituant hydroxyle (R'=OH)**

	C 1s	O 1s	N 1s
<b>Pâte Kraft propargylée</b>	62,55%	37,45%	-
<b>Matériau portant le substituant hydroxyle (R'=OH)</b>	63.25%	32.9%	3.85%

L'apparition des pics correspondant à l'atome d'azote sur les spectres confirme le greffage des azido-aryles. Toujours en assimilant la pâte Kraft à des fibres de cellulose, l'analyse a permis de déterminer un DS de l'ordre de 0,2 pour les différents matériaux obtenus.

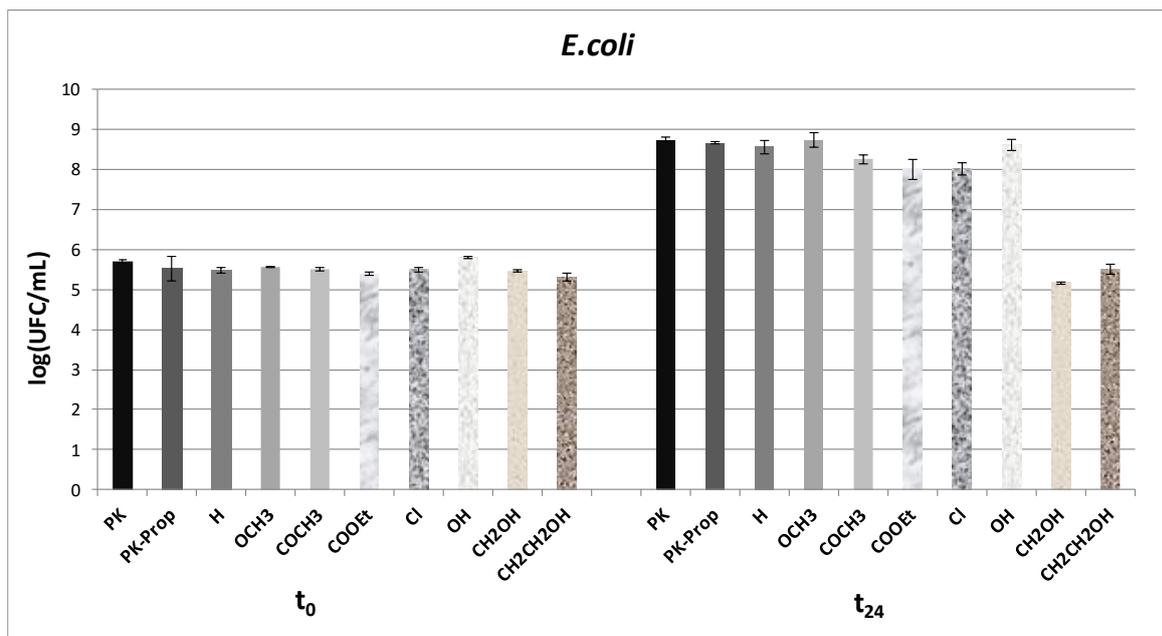
## II.5. Evaluation de l'activité microbiologique des matériaux de pâte Kraft 1,2,3-triazolés

Afin d'évaluer l'activité antibactérienne des différents matériaux élaborés, des feuilles ont été préparées à partir de ces derniers et des tests microbiologiques ont été effectués sur ces feuilles. Comme dans la première partie, les tests microbiologiques ont été réalisés, sur *S. aureus* CIP 76.25 et *E. coli* CIP 54.8T.

L'évaluation de l'activité antibactérienne des matériaux obtenus a été réalisée comme précédemment, en utilisant la méthode basée sur la norme AATCC100. Les tests ont été réalisés quatre fois.

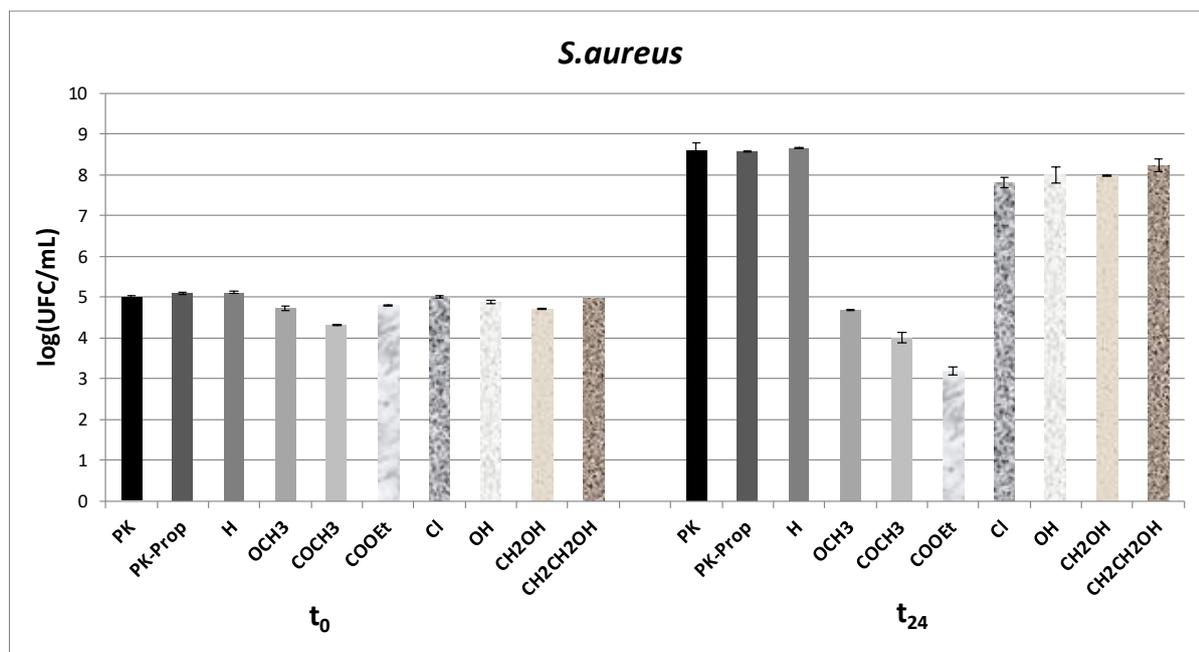
Au cours de ces tests, nous avons utilisé comme contrôles la pâte Kraft (PK) et la pâte Kraft propargylée (PK-Prop). Ces contrôles ne présentent aucune activité antimicrobienne vis-à-vis des deux souches testées. En effet, après 24 heures de contact, une croissance bactérienne de l'ordre de 3 log par rapport à la référence  $t_0$  est observée.

Pour *E. coli* (**Figure 107**), les matériaux élaborés portant les substituants hydroxyméthyle (R'=CH<sub>2</sub>OH) et hydroxyéthyle (R'=CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>OH), ont montré un effet bactériostatique après 24h de contact. Pour les autres matériaux modifiés, aucune activité n'a été observée.



**Figure 107: Activité antibactérienne des matériaux élaborés contre *E. coli* à t<sub>0</sub> et t<sub>24</sub>**

Pour *S. aureus* (Figure 108), un effet bactériostatique a été observé pour les matériaux portant les substituants méthoxyle (R'=OCH<sub>3</sub>) et acétyle (R'=COCH<sub>3</sub>). Pour le matériau portant le substituant éthoxycarbone (R'=COOEt), un effet bactéricide a été observé avec un taux d'inhibition de la croissance bactérienne de 45%. Les autres matériaux modifiés ne présentent pas d'activité antibactérienne.



**Figure 108: Activité antibactérienne des matériaux élaborés contre *S. aureus* à t<sub>0</sub> et t<sub>24</sub>**

En parallèle, nous avons évalué l'activité antibactérienne des azido-aryles libres, afin de déterminer l'effet biologique de chaque substrat ayant permis de concevoir ces nouveaux matériaux. Pour cela, nous avons procédé à la détermination de la CMI des différents azido-aryles. Nous avons utilisé la méthode de micro dilution conformément au document M07-A10 (2015) [171].

Une suspension bactérienne à  $10^6$  UFC/mL a été préparée puis inoculée dans du milieu nutritif TS, avec des solutions d'azido-aryles à des concentrations allant de 1,9  $\mu\text{g/mL}$  à 2 mg/mL. Après 24h à 37°C, la CMI a été déterminée en observant la plus faible concentration d'azido-aryles qui inhibe la croissance bactérienne.

Les résultats des tests montrent que les différentes molécules azidées libres, ne présentent aucune activité antibactérienne même à une concentration de 2mg/mL. Cela indique que les molécules que nous avons greffées sur la pâte kraft n'acquièrent leurs potentiels antibactériens qu'après greffage.

## II.6. Etude de l'activité antibactérienne des matériaux 1,2,3-triazolés en fonction du temps

En se basant sur les résultats obtenus sur les deux souches bactériennes, nous avons poursuivi notre étude par l'évaluation de l'influence du temps de contact entre les matériaux et les bactéries, sur l'activité antibactérienne. Pour cela, un nouveau protocole a été mis en place, basé sur la norme AATCC100.

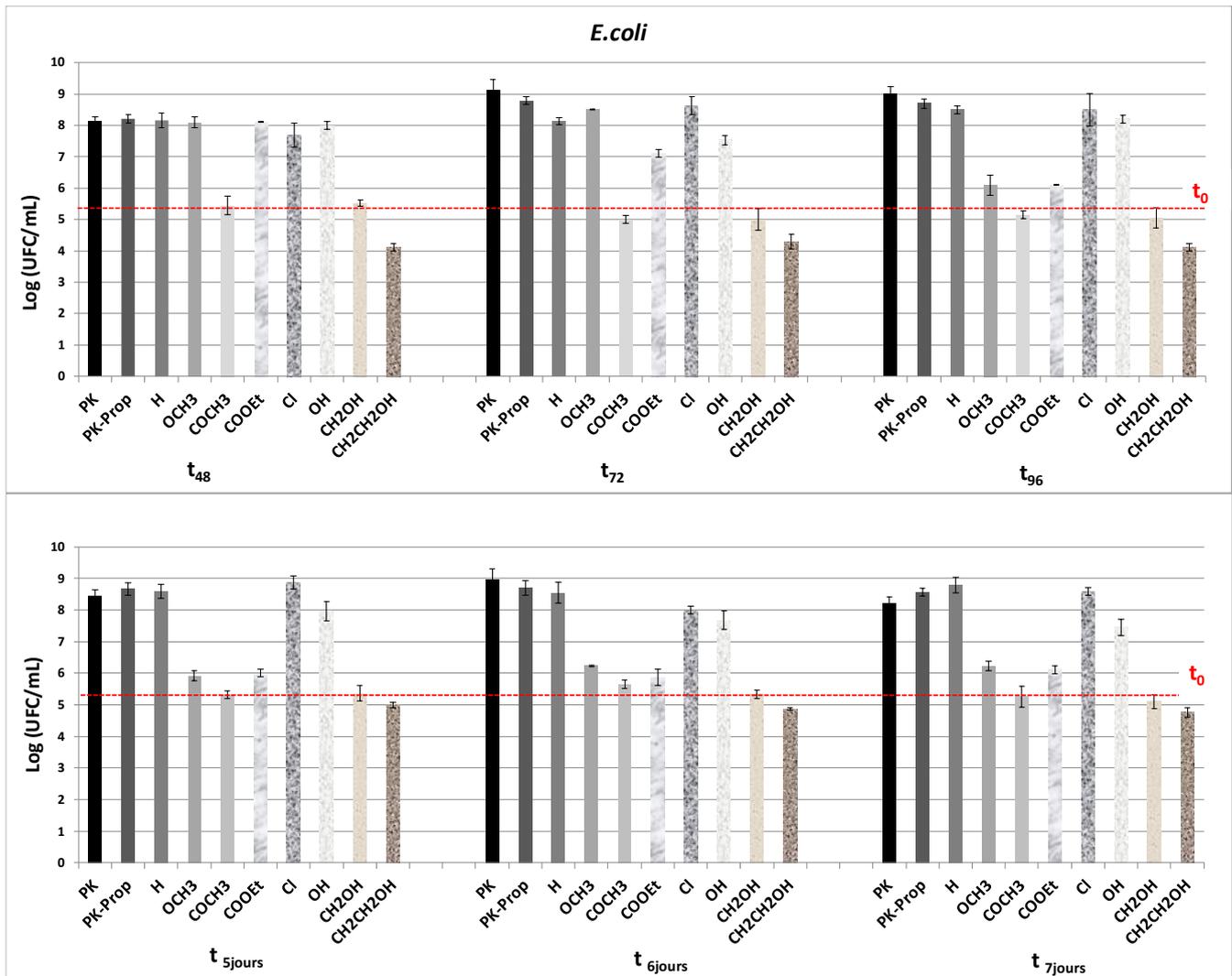
Une suspension bactérienne (50  $\mu\text{L}$ ) à une concentration de  $2 \times 10^6$  UFC/ml ont été déposés sur 14 disques du même échantillon. Comme précédemment, deux disques ont été traités directement après le dépôt des bactéries pour dénombrer ces dernières à  $t_0$ . Les 12 autres disques ont été incubés pendant 24 heures à 37°C. Parmi ces 12 disques, deux disques ont été récupérés et traités pour compter les bactéries à  $t_{24}$ . Sur les 10 disques restants, 50  $\mu\text{L}$  de milieu nutritif (TS) sont déposés puis incubés à 37°C pendant 24 heures ( $t_{48}$ ). Ceci est répété encore 5 fois pour obtenir le nombre de bactéries à  $t_{72}$ ,  $t_{96}$ ,  $t_{5j}$ ,  $t_{6j}$  et  $t_{7j}$ . La même procédure expérimentale a été appliquée aux contrôles (PK et PK-Prop).

Pour les deux souches testées, *E. coli* et *S. aureus*, les contrôles (PK et PK-Prop) ne présentent aucune activité antimicrobienne quel que soit le temps de contact (**Figure 109** et **110**).

---

[171] M07A10- Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically; Approved standard – teh- edition. (2015) Vol 32. No 2.

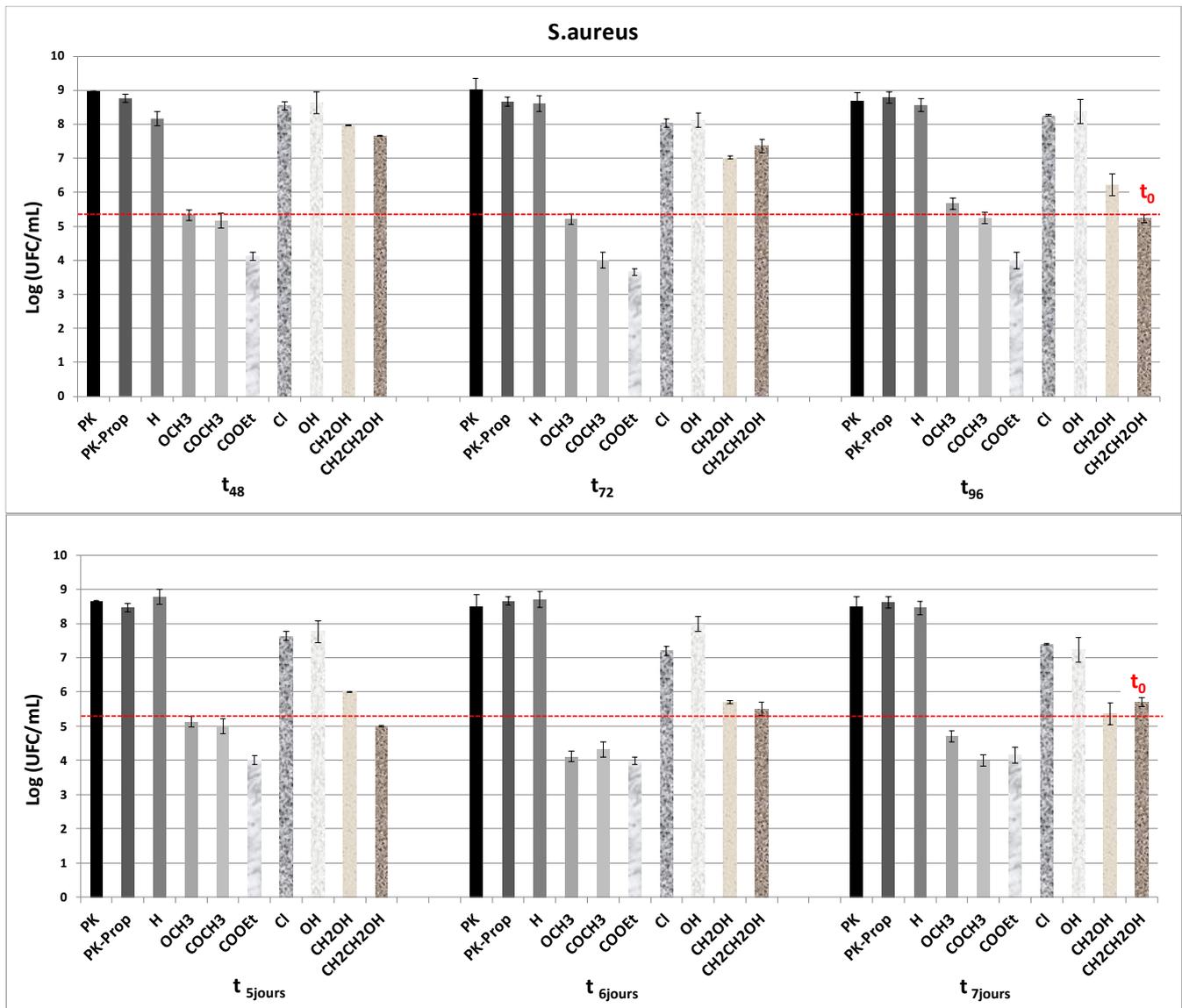
Pour *E. coli*, l'activité bactériostatique des matériaux portant les substituants hydroxyméthyle ( $R'=CH_2OH$ ) et hydroxyéthyle ( $R'=CH_2CH_2OH$ ), observée à  $t_{24}$ , a été maintenue après 7 jours de contact. Le matériau portant le substituant acétyle ( $R'=COCH_3$ ) a présenté une activité bactériostatique après 48h de contact. Tandis que pour les matériaux portant les substituants méthoxyle ( $R'=OCH_3$ ) et éthoxycarbonyle ( $R'=COOEt$ ), une activité bactériostatique a été observée après 96h de contact. Les matériaux portant les substituants  $R'=H, Cl$  et  $OH$ , ne présentent aucune activité antibactérienne quel que soit le temps de contact.



**Figure 109: Croissance bactérienne de *E. coli* en présence de la pâte kraft, de la pâte kraft propargylée et des différents matériaux élaborés de  $t=48h$  à  $t=7j$**

Pour *S. aureus*, l'activité bactériostatique des matériaux portant les substituants méthoxyle ( $R'=OCH_3$ ), acétyle ( $R'=COCH_3$ ), ainsi que l'activité bactéricide du matériau portant le substituant éthoxycarbonyle ( $R'=COOEt$ ) a été maintenue pendant 7 jours. Un effet bactériostatique a été observé pour les matériaux portant les substituants hydroxyméthyle ( $R'=CH_2OH$ ) et

hydroxyéthyle (R'=CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>OH) après 96 h de contact. Les matériaux portant les substituants R'= H, Cl et OH, ne présentent aucune activité antibactérienne quel que soit le temps de contact.



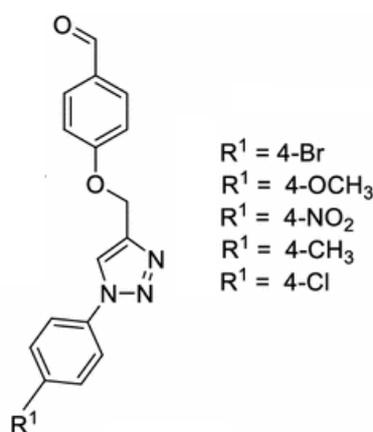
**Figure 110: Croissance bactérienne de *S. aureus* en présence de la pâte kraft, de la pâte kraft propargylée et des différents matériaux élaborés de t=48h à t=7j**

Lors de cette étude, nous avons développé de nouveaux matériaux antibactériens en greffant des azido-aryles sur la pâte kraft propargylée, formant ainsi l'aryltriazole sur les fibres de pâte Kraft. Parmi les huit matériaux élaborés, cinq matériaux ont présenté une activité antibactérienne. Après 24h de contact, les matériaux portant les substituants méthoxyle, acétyle et éthoxycarbone ont été actifs contre *S. aureus* tandis que les matériaux portant les substituants hydroxyméthyle et hydroxyéthyle ont été actifs contre *E. coli*. Cette étude met clairement en avant l'influence de la nature du substituant de l'aryle sur l'activité antibactérienne.

L'étude de l'influence du temps de contact sur l'activité antibactérienne a mis en évidence que certains matériaux demandent des temps de contact supérieurs à 24h pour atteindre une activité bactériostatique contre les souches bactériennes testées. Il est important de noter qu'après 96 h de contact, les cinq matériaux ont présenté une activité bactériostatique sur les deux souches bactériennes.

L'absence d'une activité antibactérienne pour les substrats de départ (PK-propargylée et les azido-aryles) montrent que l'effet antibactérien des matériaux développés lors de cette étude, résulte du motif aryl-1,2,3-triazole formé sur la pâte Kraft.

Il est décrit dans la littérature que les triazoles ont une action sur les membranes cellulaires [172] en inhibant la biosynthèse de l'alcool isoprénoïde C-55, nécessaire pour la synthèse de la paroi cellulaire bactérienne [173]. Le triazole peut également interagir avec des lipides dans les membranes cellulaires, modifiant leur orientation et provoquant des fuites [174]. Lorsque le noyau 1,2,3-triazole est couplé à un aryle, ce dernier contribue à l'activité antibactérienne. En effet, Lal et coll. [175] ont synthétisé une série d'analogues de 4 - ((1-benzyl-1*H*-1,2,3-triazol-4-yl) méthoxy) benzaldéhyde (**Figure 111**) puis ils ont testé leur activité antibactérienne.



**Figure 111: Les différents dérivés triazolés synthétisés [175]**

Les tests microbiologiques ont montré que le composé portant le substituant méthoxyle ( $R^1 = \text{OCH}_3$ ) est le plus actif.

[172] D. Kumar, Beena, G. Khare, et al. Synthesis of novel 1,2,3-triazole derivatives of isoniazid and their in vitro and in vivo antimycobacterial activity evaluation. *Eur. J. Med. Chem.* 81, **2014**, 301-313.

[173] H. Cheng, Y. Xie, L. Francisco, et al. Antibiofilm effect enhanced by modification of 1,2,3-triazole and palladium nanoparticles on polysulfone membranes. *6*, **2016**, DOI: 10.1038/srep24289

[174] M. C. Floros, J. F. Bortolatto, O. Bastia, et al. Antimicrobial Activity of Amphiphilic Triazole-Linked Polymers Derived from Renewable Sources. *ACS Biomater. Sci. Eng.* 2, **2016**, 336-343.

[175] K. Lal, P. Yadav, A. Kumar. Synthesis, characterization and antimicrobial activity of 4-((1-benzyl/phenyl-1*H*-1,2,3-triazol-4-yl) methoxy) benzaldehyde analogues. *Med. Chem. Res.* 25, **2016**, 644-652.

Pour comprendre le mode d'action de ce composé, une étude d'amarrage a été effectuée sur le site actif de l'ADN gyrase B, de *E. coli*. L'ADN gyrase B est un enzyme essentiel à la réplication du chromosome bactérienne. Les logiciels d'amarrage recherchent les positions et les orientations les plus probables de molécules en interaction avec la cible. Les résultats ont montré que le cycle triazole et le cycle phényle directement liés au triazole sont impliqués dans les interactions  $\pi$ -alkyle avec un résidu d'acide aminé, l'isoleucine (Ile78). Cela indique que le composé étudié peut inhiber avec succès l'ADN gyrase B via ces interactions.

Dans notre cas, on ne peut pas associer l'effet antibactérien observé uniquement au 1,2,3-triazole car, trois matériaux 1,2,3-triazolés parmi les huit étudiés, ne présentent aucun effet antibactérien, il s'agit des matériaux portant un hydrogène, un chlore et un hydroxyle en position *para* du phényle. Cela indique que le substituant de l'aryle influe sur l'activité antibactérienne. Cette influence a été mentionnée dans plusieurs études [175, 176, 177]. Cependant, la relation structure/activité des aryltriazoles n'est pas clairement élucidée dans la littérature. Cela nous permet de supposer que l'effet antibactérien des aryltriazoles greffés sur la pâte Kraft, est un effet membranaire résultant d'interaction entre le substituant sur l'aryle avec la paroi cellulaire ou la paroi bactérienne, facilitant l'action du noyau 1,2,3-triazole. Des études complémentaires sont à réaliser pour comprendre et déterminer le mode d'action des matériaux élaborés lors de cette étude.

Les matériaux que nous avons développés présentent des propriétés antibactériennes intéressantes, il bloque la croissance des bactéries limitant leur prolifération. Néanmoins, après 24 h de contact, aucun de ces matériaux n'est actif sur les deux souches à la fois. Nous avons donc poursuivi l'étude par la préparation de mélanges de matériaux, l'un ayant une activité contre *E. coli* et l'autre ayant une activité contre *S. aureus* à  $t_{24}$  puis nous avons procédé à l'évaluation de leur activité antibactérienne.

## II.7. Activité antibactérienne des mélanges des matériaux 1,2,3-triazolés

Différents mélanges contenant 50% d'un matériau ayant une activité contre *E. coli* à  $t_{24}$  et 50% d'un matériau ayant une activité contre *S. aureus* à  $t_{24}$  ont été élaborés, afin d'obtenir un matériau homogène, les différents mélanges préparés sont présentés sur le **Tableau 13**.

---

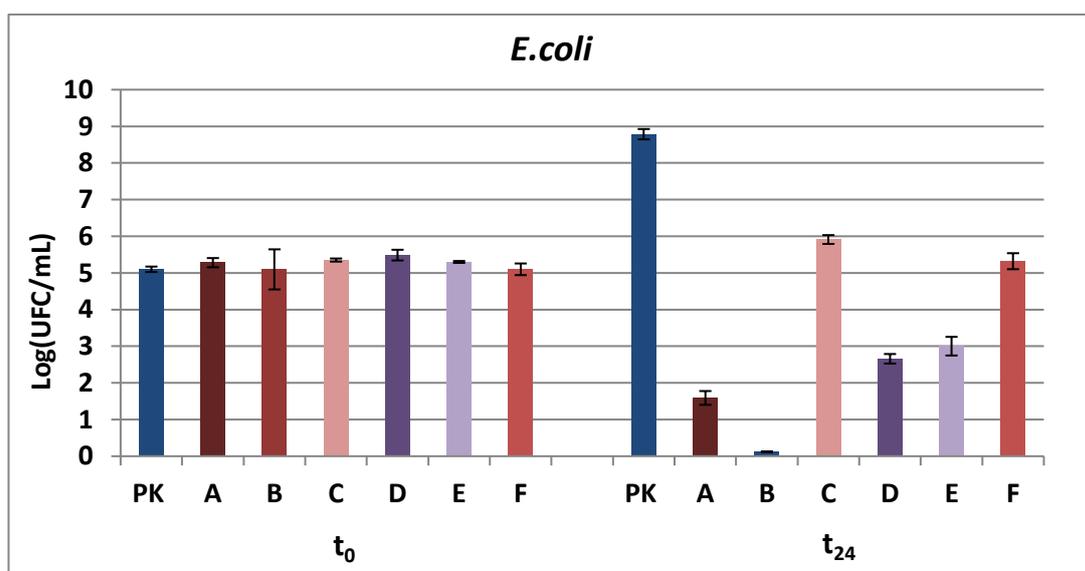
[176] K. Yadav, K. Lal, P. Rani, et al. Efficient synthesis and antimicrobial evaluation of 2-((1-substituted-1H-1,2,3-triazol-4-yl)-1-naphthaldehydes and their oxime derivatives. *Med. Chem. Res.* 26, **2017**, 1469–1480

[177] V. Shinde, P. Mahulikar, P. C. Mhaske, et al. Synthèse et évaluation biologique de nouveaux dérivés de 2-aryl-4 - ((4-aryl-1 H -1,2,3-triazol-1-yl) méthyl) thiazole. *Res. Chem. Intermed.* 44, **2018**, 1247-1260.

**Tableau 13: Les différents mélanges préparés à partir de matériaux triazolés**

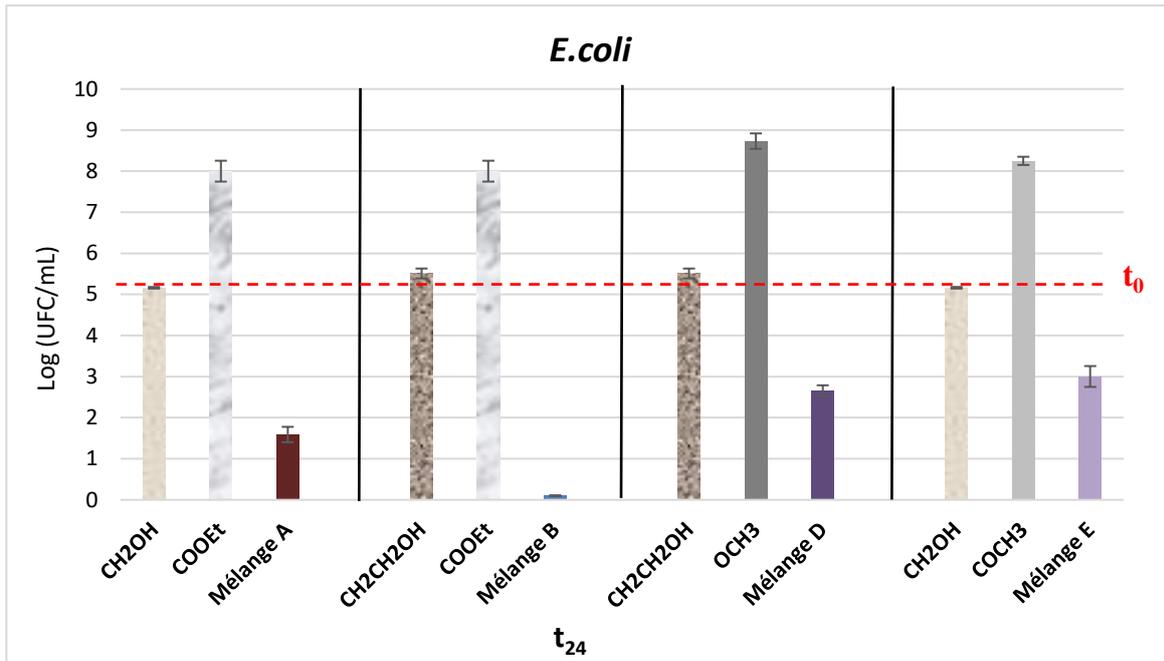
Mélange	Substituant porté par l'aryle (R')	
<b>A</b>	CH <sub>2</sub> OH	COOEt
<b>B</b>	CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> OH	COOEt
<b>C</b>	CH <sub>2</sub> OH	OCH <sub>3</sub>
<b>D</b>	CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> OH	OCH <sub>3</sub>
<b>E</b>	CH <sub>2</sub> OH	COCH <sub>3</sub>
<b>F</b>	CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> OH	COCH <sub>3</sub>

La **figure 112** présente les résultats des tests obtenus pour les différents mélanges contre *E. coli*. De manière surprenante, on observe un effet bactéricide pour les mélanges **A**, **B**, **D** et **E** avec des taux d'inhibition de 70%, 100%, 52% et 45% respectivement et un effet bactériostatique pour les mélanges **C** et **F**.



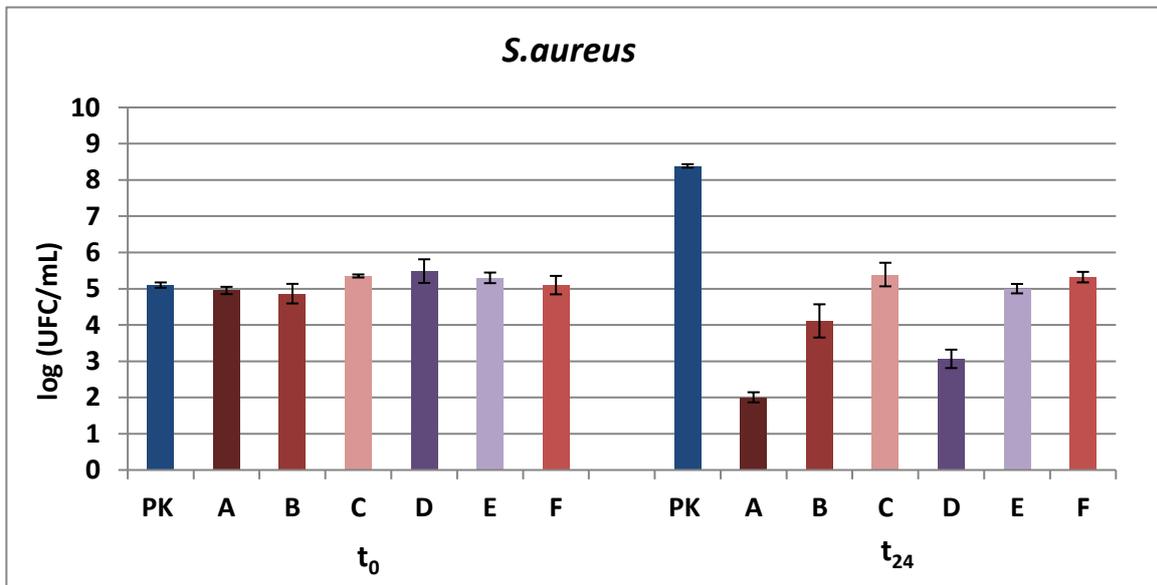
**Figure 112: Activité antibactérienne des mélanges contre *E. coli***

Comme le montre la **figure 113**, à partir de deux matériaux, l'un ayant une activité bactériostatique et l'autre n'ayant aucune activité contre *E. coli*, nous avons obtenu des matériaux bactéricides avec des taux d'inhibition allant jusqu'à 100% dans le cas du mélange **B**.



**Figure 113: Résultats détaillés de l'activité des mélanges de matériaux triazolés contre *E. coli***

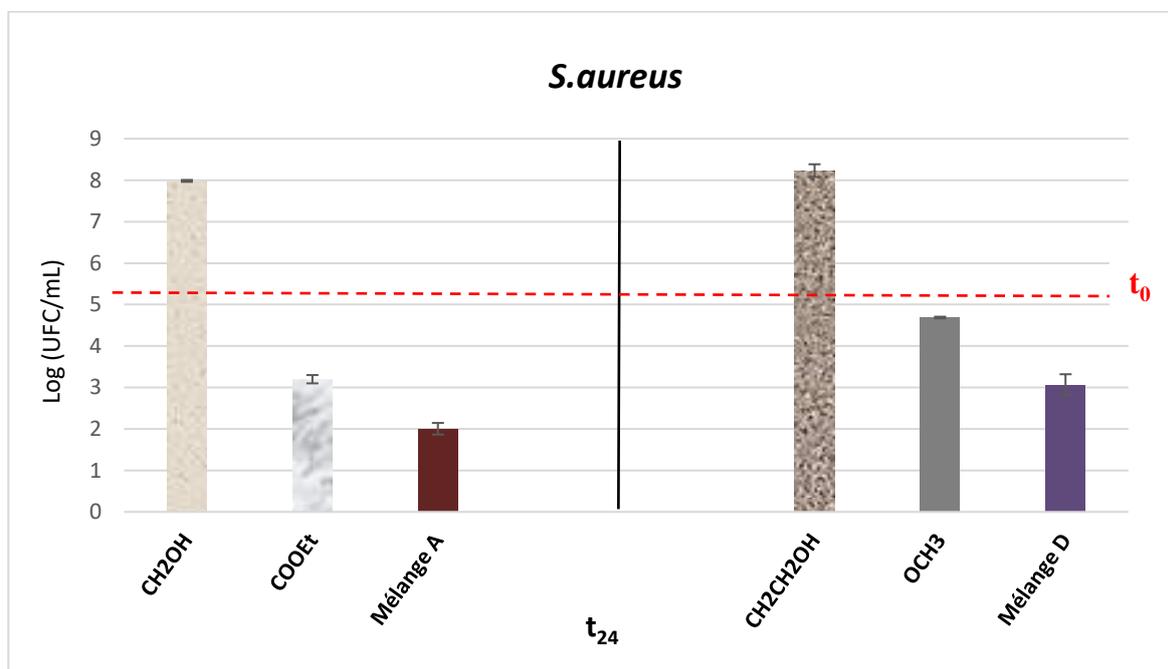
Pour *S. aureus* (Figure 114), une meilleure activité a également été observée par rapport à l'activité des matériaux de départ. En effet, les mélanges A, B et D ont présenté une activité bactéricide avec des taux d'inhibition de 60%, 10% et 45% respectivement. Les mélanges B, C, E et F quant à eux, ont présenté une activité bactériostatique.



**Figure 114: Activité antibactérienne des mélanges contre *S. aureus***

Le matériau A qui présente un effet bactéricide avec un taux d'inhibition de 60% est obtenu en mélangeant deux matériaux, le premier ne présente aucune activité antibactérienne contre *S.*

*aureus* et le deuxième étant bactéricide avec un taux d'inhibition de 45%. Quant au matériau bactéricide **D** (45% d'inhibition), il a été obtenu en mélangeant un matériau bactériostatique et un matériau inactif (**Figure 115**).



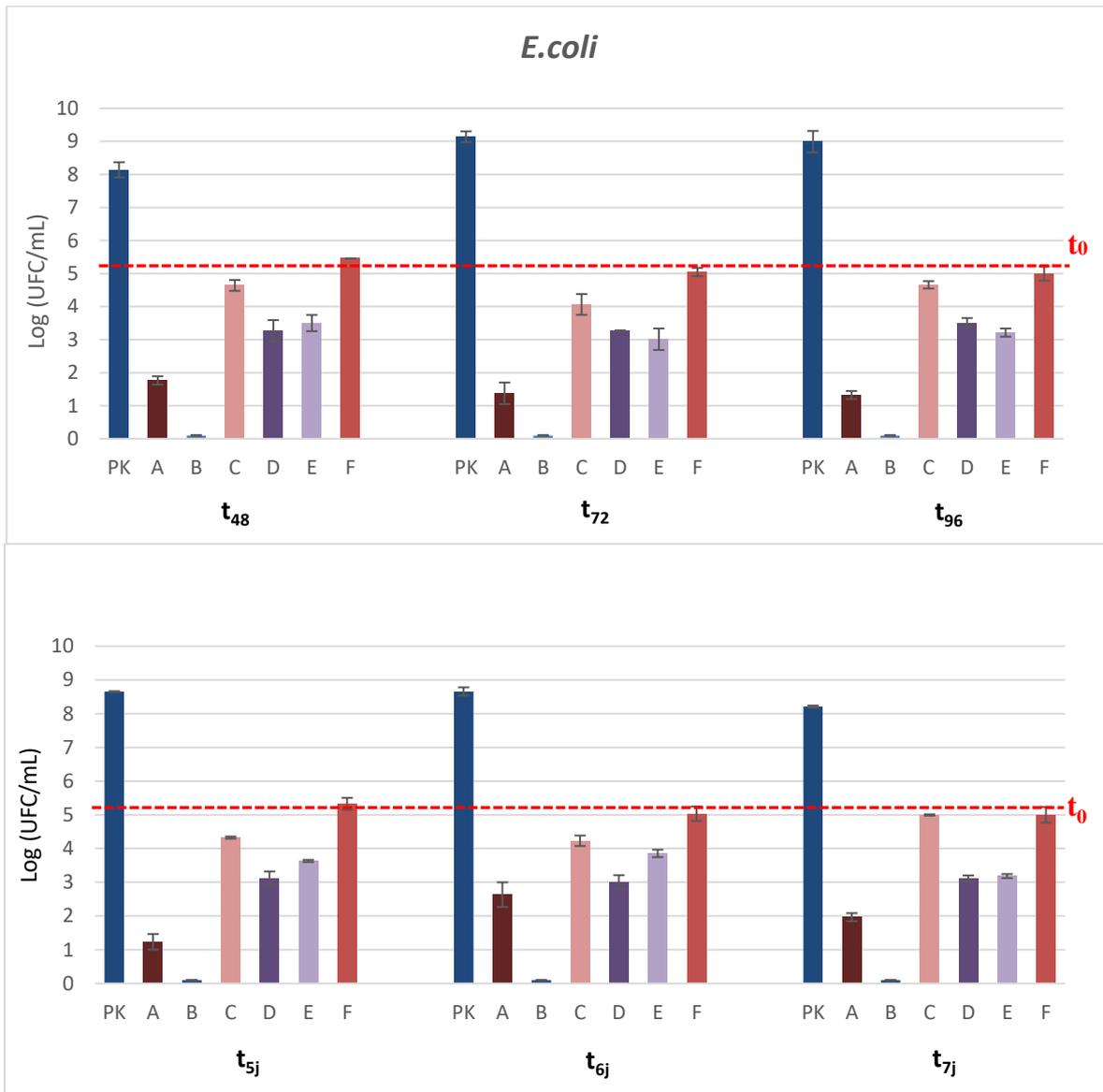
**Figure 115: Résultats détaillés de l'activité des mélanges de matériaux triazolés contre *S. aureus***

Grâce à cette étude, nous avons développé un matériau **A** possédant une activité bactéricide avec un taux d'inhibition de près de 60% vis-à-vis des deux souches bactériennes testées.

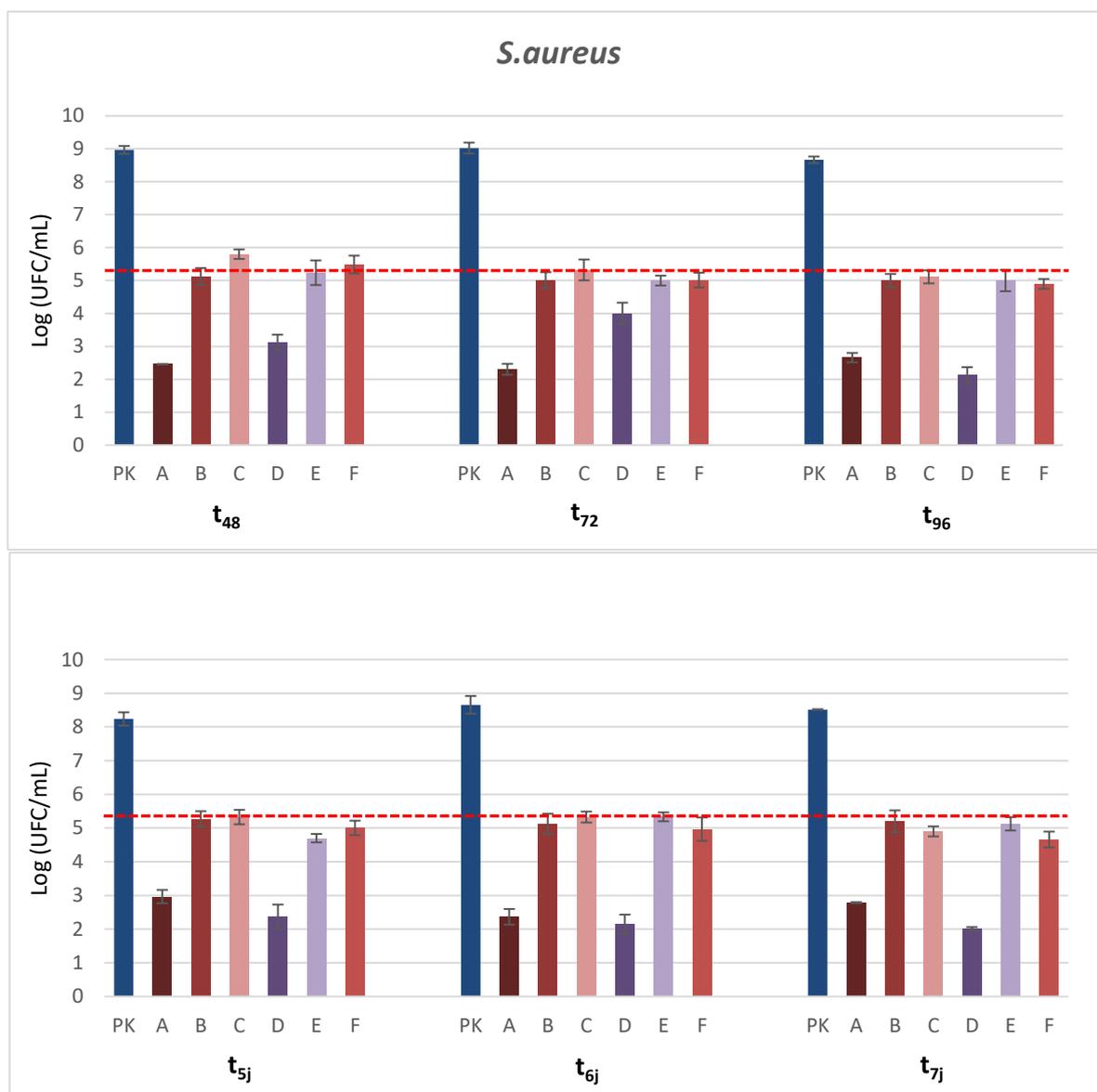
Nous avons complété cette étude par l'évaluation de l'activité des différents mélanges de matériaux 1,2,3-triazolés sur 7 jours, afin de vérifier si les activités observées après 24h de contact seront maintenues durant une plus longue période.

## **II.8. Etude de l'activité antibactérienne des différents mélanges de matériaux 1,2,3-triazolés en fonction du temps**

Les résultats des tests de l'activité antibactérienne des différents mélanges en fonction du temps sont présentés sur les **Figures 116 et 117**. Pour les deux souches bactériennes, l'activité observée à  $t_{24}$  a été maintenue durant les 7 jours de l'étude pour les différents mélanges.



**Figure 116: Croissance bactérienne de *E. coli* en présence de différents mélanges de matériaux triazolés de  $t=48h$  à  $t=7j$**



**Figure 117: Croissance bactérienne de *S. aureus* en présence de différents mélanges de matériaux triazolés de t=48h à t=7j**

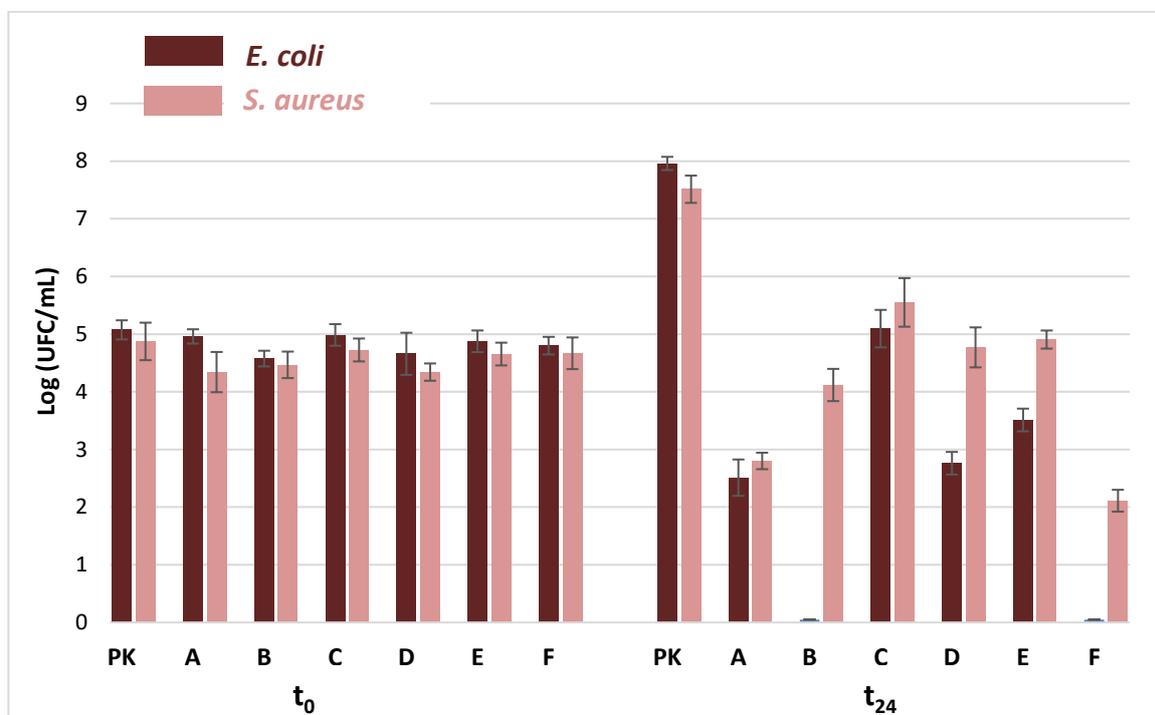
Ces résultats indiquent qu'il y a un effet de synergie entre un matériau bactériostatique et un autre inactif pour conduire à un matériau bactéricide.

L'étude de la littérature montre que l'association de deux molécules actives peut entraîner quatre types d'interactions: Indifférente, additive, synergique ou antagoniste. Dans le premier cas, l'activité d'une molécule n'est pas affectée par la présence de l'autre. Dans le cas d'interaction additive, l'effet de l'association est égal à la somme des effets de chaque molécule étudiée séparément. L'interaction la plus recherchée est la synergique, où l'effet de l'association est significativement supérieur à la somme des activités de chaque molécule étudiée séparément. En réalité, ce n'est pas toujours le cas, l'association des deux molécules peut diminuer l'effet de l'une ou l'autre des molécules. On parle d'une interaction antagoniste.

En plus de ces interactions, où les deux molécules ont chacune une action antibactérienne, il existe des associations qui sont synergiques dans leur action, alors que l'un des composés n'a pas d'action sur la bactérie [178]. En antibiothérapie, c'est le cas par exemple de l'effet de l'association de  $\beta$ -lactamine-inhibiteur de  $\beta$ -lactamase. Dans notre cas, nous avons obtenu le même effet synergique avec le mélange de deux matériaux, l'un actif contre la bactérie et l'autre inactif. A notre connaissance, la synergie entre deux dérivés 1,2,3-triazolés n'a pas été décrite dans la littérature.

## II.9. Etude de l'activité antibactérienne des matériaux 1,2,3-triazolés sur un mélange de bactéries, *E. coli* et *S. aureus*

Par la suite, nous avons testé l'activité antibactérienne des différents mélanges de matériaux triazolés sur un mélange de bactéries *E. coli* et *S. aureus*. Pour ce faire, nous avons préparé comme décrit précédemment, une solution contenant  $10^5$  UFC de chaque bactérie puis nous avons déposé 50  $\mu$ L de cette suspension sur trois disques du même échantillon. Comme nous l'avons précisé précédemment, les colonies de *E. coli* et celles de *S. aureus* sont visuellement différentes, nous avons dénombré les colonies de chaque bactérie à  $t_0$  et à  $t_{24}$ . Les résultats sont présentés sur la **figure 118**.



**Figure 118: Activité antibactérienne des différents matériaux (A, B, C, D, E et F) sur un mélange de *E. coli* et *S. aureus***

[178] É. Denes and N. Hidri. Antibiotic synergy and antagonism. *Antibiotic*. 11, 2009, 106-115.

En présence d'un mélange des deux bactéries, *E. coli* et *S. aureus*, l'activité antibactérienne des matériaux **A**, **B**, **C**, **D** et **E** est comparable à celle obtenue contre les deux bactéries *E. coli* et *S. aureus*, chacune testée séparément. Dans le cas de *E. coli*, on observe une activité bactéricide pour les matériaux **A**, **B**, **D** et **E**, et bactériostatique pour le matériau **C**. Pour le matériau **F**, nous avons observé un effet bactéricide avec un taux d'inhibition de 100%. En effet, on passe d'un effet bactériostatique dans le cas de *E. coli* quand elle est testée séparément, à un effet bactéricide quand elle est testée en mélange avec *S. aureus*.

Dans le cas de *S. aureus*, nous observons une activité bactéricide pour les matériaux **A** et **B**, et une activité bactériostatique pour les matériaux **C**, **D** et **E** équivalente à l'activité observée quand les bactéries sont testées séparément. Pour le matériau **F**, nous avons observé un effet bactéricide avec un taux d'inhibition de 55%. Là encore, on passe d'un effet bactériostatique quand *S. aureus* est testée séparément, à un effet bactéricide quand elle est testée en mélange avec *E. coli*.

Ces résultats indiquent que les matériaux pourraient inhiber la croissance bactérienne et empêcher leur prolifération même quand les deux bactéries sont en communauté. Dans le cas du mélange **F**, l'activité augmente, elle devient bactéricide vis-à-vis des deux bactéries en communauté.

## II.10. Conclusion

Nous avons développé dans cette partie de la thèse, de nouveaux matériaux bioactifs à partir de deux substrats inactifs, la pâte Kraft propargylée et des azido-aryles. Parmi les huit matériaux élaborés, et après 24h de contact, deux possèdent une activité bactériostatique vis-à-vis de *E. coli*, il s'agit des matériaux portant les substituants hydroxyméthyle et hydroxyéthyle, et deux autres matériaux possèdent une activité bactériostatique vis-à-vis de *S. aureus*, il s'agit des matériaux portant les substituants méthoxyle et acétyle. Le cinquième matériau portant le substituant éthoxycarbonyle présente un effet bactéricide (45% d'inhibition) contre *S. aureus*.

En étudiant l'activité antibactérienne des différents matériaux élaborés sur 7 jours, nous avons observé qu'après 96h, les cinq matériaux ( $R' = \text{CH}_2\text{OH}$ ,  $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{OH}$ ,  $\text{OCH}_3$ ,  $\text{COCH}_3$ , et  $\text{COOEt}$ ) possèdent une activité antibactérienne vis-à-vis des deux souches bactériennes à la fois.

L'étude de l'activité antibactérienne de mélange de matériaux, l'un ayant une activité contre *E. coli* et l'autre une activité contre *S. aureus* après 24h de contact, a montré un effet synergique. Nous avons développé des matériaux bactéricides avec des taux d'inhibition allant jusqu'à 100% contre *E. coli* à partir d'un matériau bactériostatique, et un autre inactif contre la même souche.

En testant l'activité des différents matériaux sur un mélange des deux souches, *E. coli* et *S. aureus*, on observe une nette amélioration de l'activité antibactérienne dans le cas du matériau **F**, présentant un effet bactériostatique contre *E.coli* et *S.aureus* lorsqu'elles sont testées séparément. L'activité passe à 100% d'inhibition pour *E. coli* et à 55% contre *S. aureus* quand elles sont en communauté. Pour les autres matériaux (**A**, **B**, **C**, **D** et **E**), l'activité antibactérienne dans le cas de mélange de deux souches est comparable à celle observée lorsque chaque bactérie est testée séparément.

Nous avons poursuivi ce travail par l'étude du transfert des greffage des azido-aryles sur les fibres de pâte thermomécanique, toujours dans le but d'élargir le champs d'application des matériaux élaborés.

### III. De la pâte Kraft à la pâte thermomécanique

Le transfert du greffage des azidoaryles sur la pâte thermomécanique a commencé par l'étude du transfert de la réaction de propargylation sur des fibres de pâte thermomécanique.

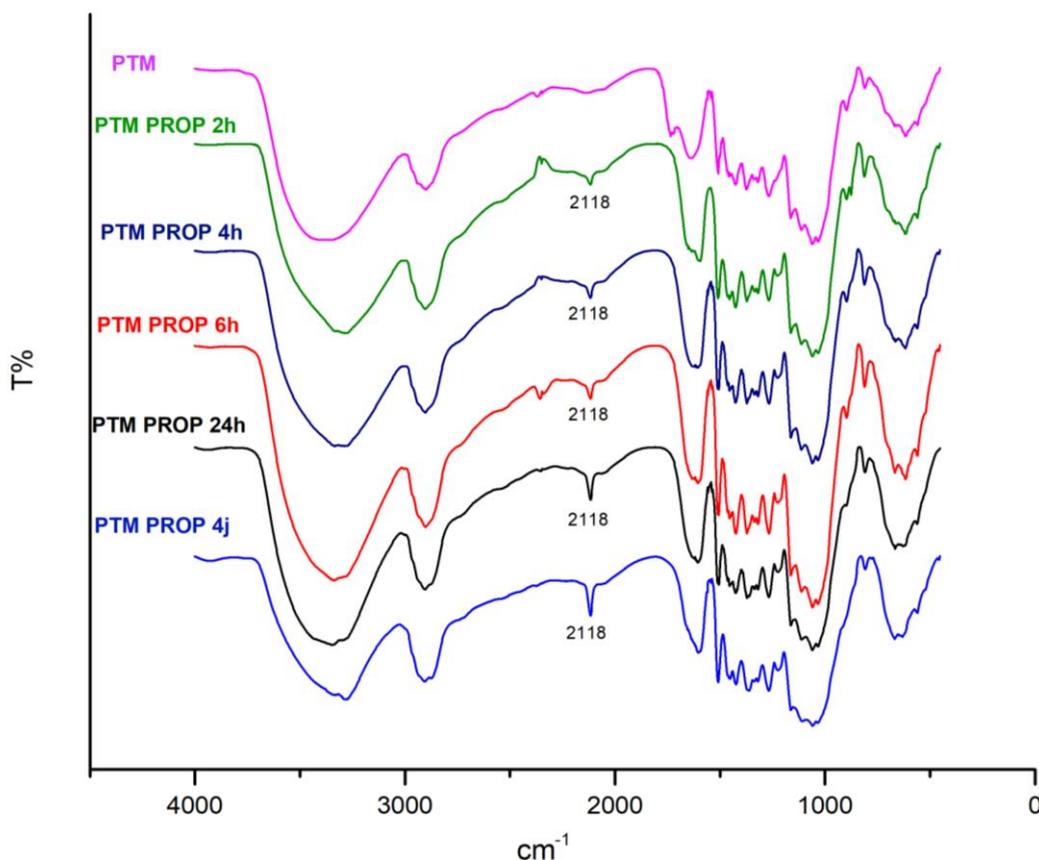
#### III.1. Propargylation des fibres de pâte thermomécanique

Les fibres de pâte thermomécanique ont été dispersées dans une solution de NaOH pendant 20 min comme décrit précédemment dans le cas de la pâte Kraft. Après l'ajout du bromure de propargyle, le milieu réactionnel réagit à température ambiante, sans agitation, pendant différents temps de réaction allant de 2h à 4j. Les fibres propargylées sont obtenues avec des rendements massiques qui augmentent avec l'augmentation du temps de réaction, allant de 100% jusqu'à 107 % après 24h de réaction. Au-delà de 24h, ce rendement ne varie pas (**Tableau 14**).

**Tableau 14: Conditions opératoires et rendements massiques de la propargylation de la pâte thermomécanique**

Essais	Temps de réaction	Rendement massique
1	2h	100%
2	4h	101%
3	6h	101%
4	24h	107%
5	4j	107,5%

Les fibres de pâte thermomécanique obtenues ont été analysées par spectroscopie infrarouge (**Figure 119**). L'analyse montre l'apparition d'une bande à  $2118\text{ cm}^{-1}$  caractéristique de l'élongation de la triple liaison du groupement propargyle. L'intensité de cette bande augmente en fonction du temps, ce qui témoigne de l'augmentation du taux du greffage du propargyle au cours du temps. Une augmentation importante de la bande caractéristique de la triple liaison est observée à 24h et 4j.



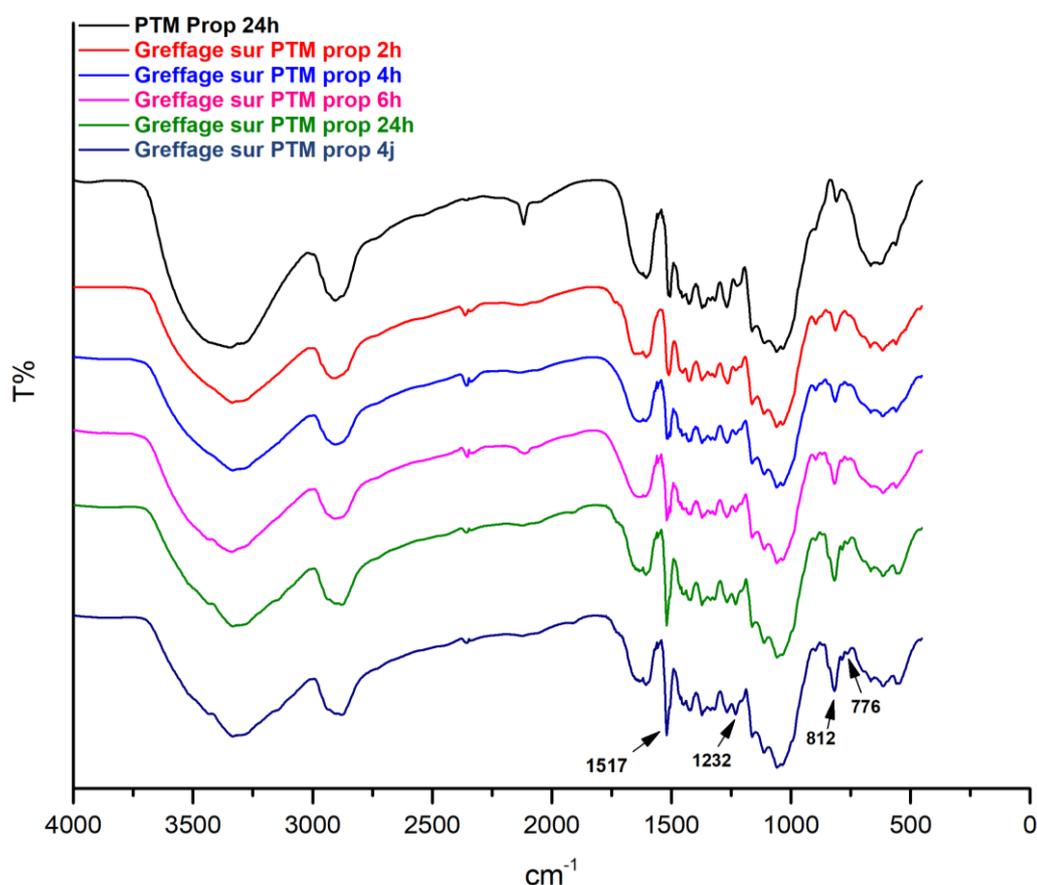
**Figure 119: Spectre IR de la pâte thermomécanique non modifiée (PTM) et propargylée (PTM PROP) après 2h, 4h, 6h, 24h et 4j de réaction**

### III.2. Réaction de cycloaddition entre les fibres de pâte thermomécanique propargylées et les azido-aryles portant les substituants hydroxyéthyle et éthoxycarbonyle

Nous avons réalisé le greffage des azido-aryles sur les fibres de pâte thermomécanique, toujours par réaction de cycloaddition de Huisgen catalysée par le cuivre I. Pour cela, nous avons commencé par le greffage de deux azido-aryles, un portant le substituant éthoxycarbonyle ( $R' = \text{COOEt}$ ) qui présente une activité contre *S. aureus* dans le cas du greffage sur les fibres de pâte Kraft à  $t_{24}$ , et le deuxième portant le substituant hydroxyéthyle ( $R' = \text{CH}_2\text{CH}_2\text{OH}$ ) présentant une activité contre *E. coli* à  $t_{24}$  lorsqu'il est greffé sur les fibres de pâte Kraft.

Les greffages sont réalisés sur les différents pâte thermomécaniques propargylées obtenues en fonction du temps de réactions. Après 72h de réaction, les matériaux greffés élaborés sont lavés avec le THF, l'eau et l'éthanol puis séchés à 60°C.

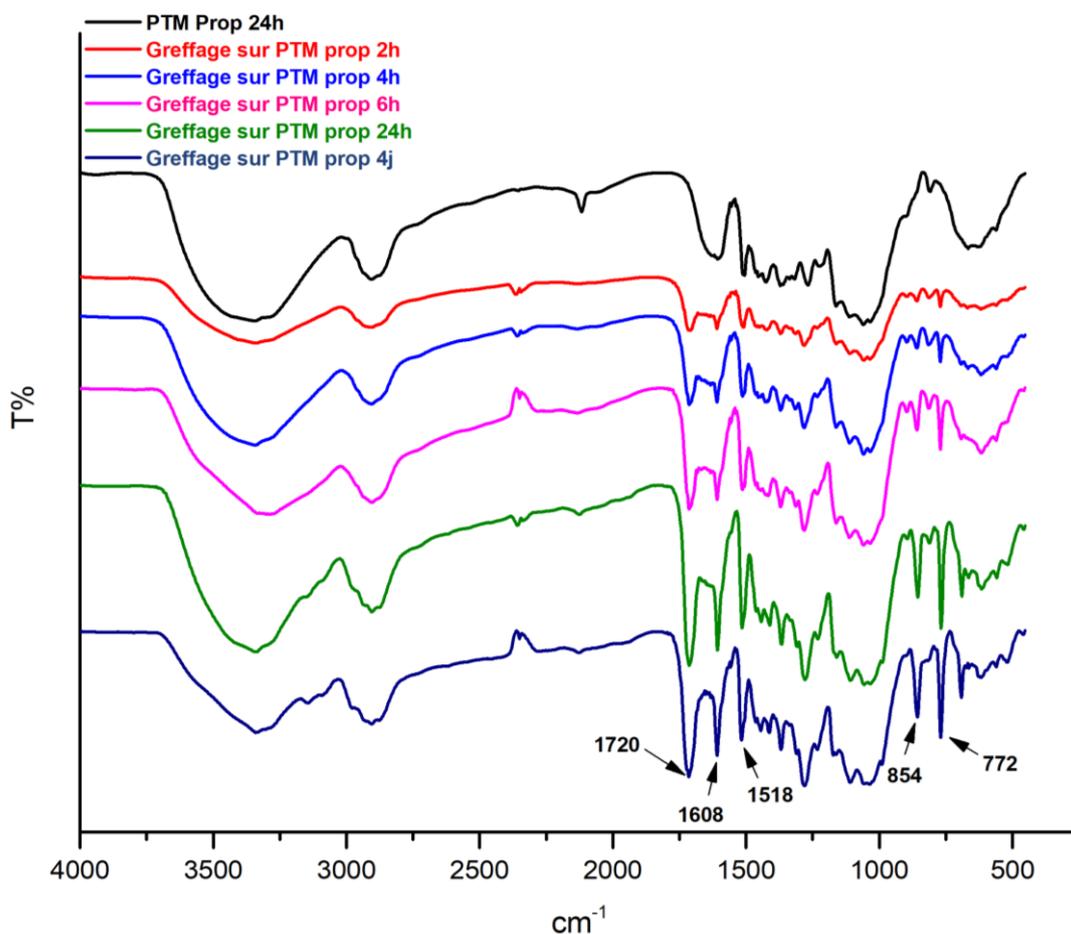
L'analyse par spectroscopie infrarouge des matériaux portant le substituant hydroxyéthyle montre la disparition de la bande caractéristique du groupement propargyle à 2118  $\text{cm}^{-1}$ . Les bandes caractéristiques du triazole sont situées au même endroit que les principales bandes d'absorption présentes sur le spectre de la pâte thermomécanique non modifiée. Cependant, l'intensité de la bande à 1517  $\text{cm}^{-1}$  et à 812  $\text{cm}^{-1}$  caractéristiques du triazole, augmente sur les spectres de la pâte thermomécanique après couplage confirmant ainsi le greffage (**Figure 120**).



**Figure 120: Spectre IR de la pâte thermomécanique propargylée après 24h et les matériaux portant le substituant hydroxyéthyle obtenus par greffage sur la pâte thermomécanique propargylée après 2h, 4h, 6h, 24h et 4j de réaction**

Pour les matériaux portant le substituant éthoxycarbonyle, l'analyse par spectroscopie IR montre également la disparition de la bande caractéristique du groupement propargyle à 2118  $\text{cm}^{-1}$  et l'augmentation de l'intensité des bandes caractéristiques du triazole à 1518  $\text{cm}^{-1}$ , 854  $\text{cm}^{-1}$  et 772

$\text{cm}^{-1}$ , ainsi que l'apparition d'une bande à  $1715 \text{ cm}^{-1}$  (C=O) caractéristique du groupement COOEt, confirmant le greffage (**Figure 121**).



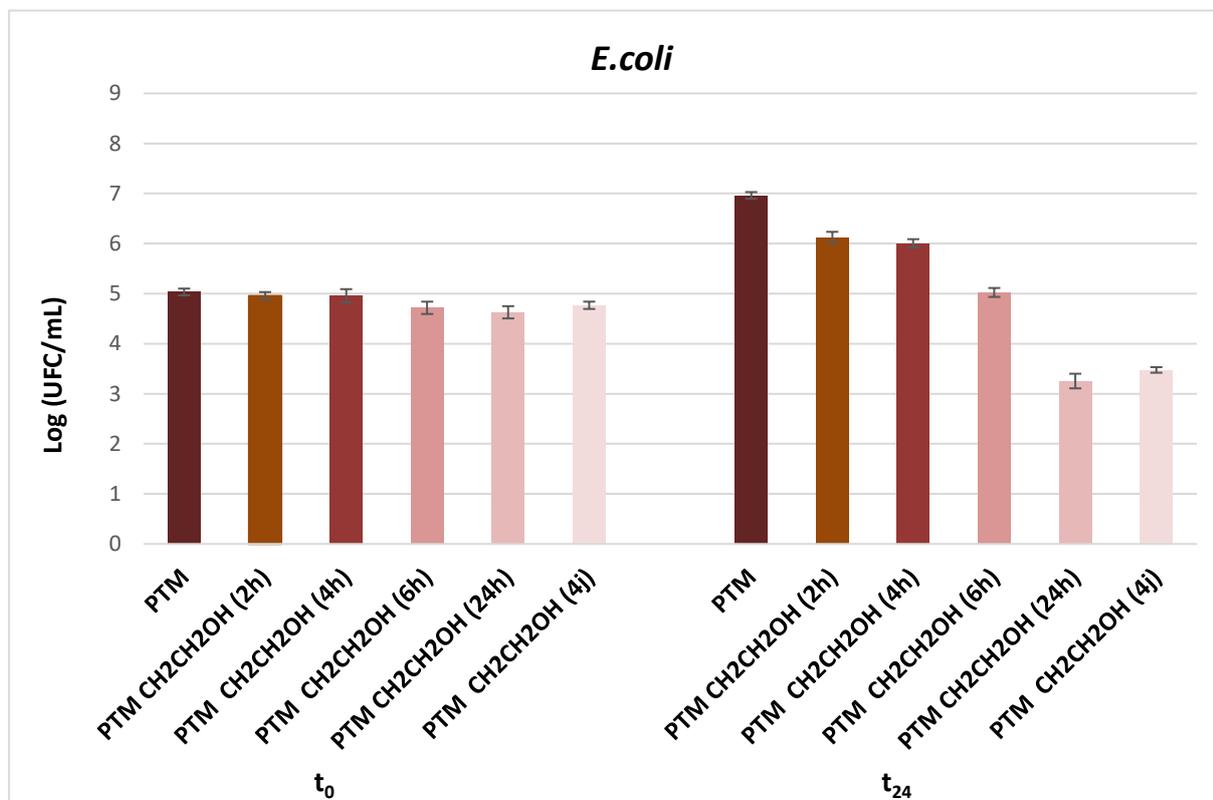
**Figure 121: Spectre IR de la pâte thermomécanique propargylée après 24h et les matériaux portant le substituant éthoxycarbonyle obtenus par greffage sur la pâte thermomécanique propargylée après 2h, 4h, 6h, 24h et 4j de réaction**

### III.3. Evaluation de l'activité antibactérienne des matériaux PTM 1,2,3-triazolés portant les substituants hydroxyéthyle et éthoxycarbonyle

A la suite de l'obtention des matériaux élaborés ( $\text{R}'=\text{COOEt}$  et  $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{OH}$ ), nous avons évalué leurs activités antibactériennes contre *E. coli* et *S. aureus*, afin de déterminer la variation de l'activité en fonction du taux de greffage et donc du degré de propargylation.

Pour *E. coli* (**Figure 122**), les matériaux portant le substituant hydroxyéthyle obtenus en greffant l'azido-aryle sur la pâte thermomécanique propargylée pendant 2h et 4h ne présentent pas d'activité antibactérienne. Pour le matériau greffé sur la pâte thermomécanique propargylée pendant 6h, un effet bactériostatique a été observé. Dans le cas des matériaux greffés sur la pâte thermomécanique propargylée pendant 24h et 4j, un effet bactéricide est obtenu avec des taux

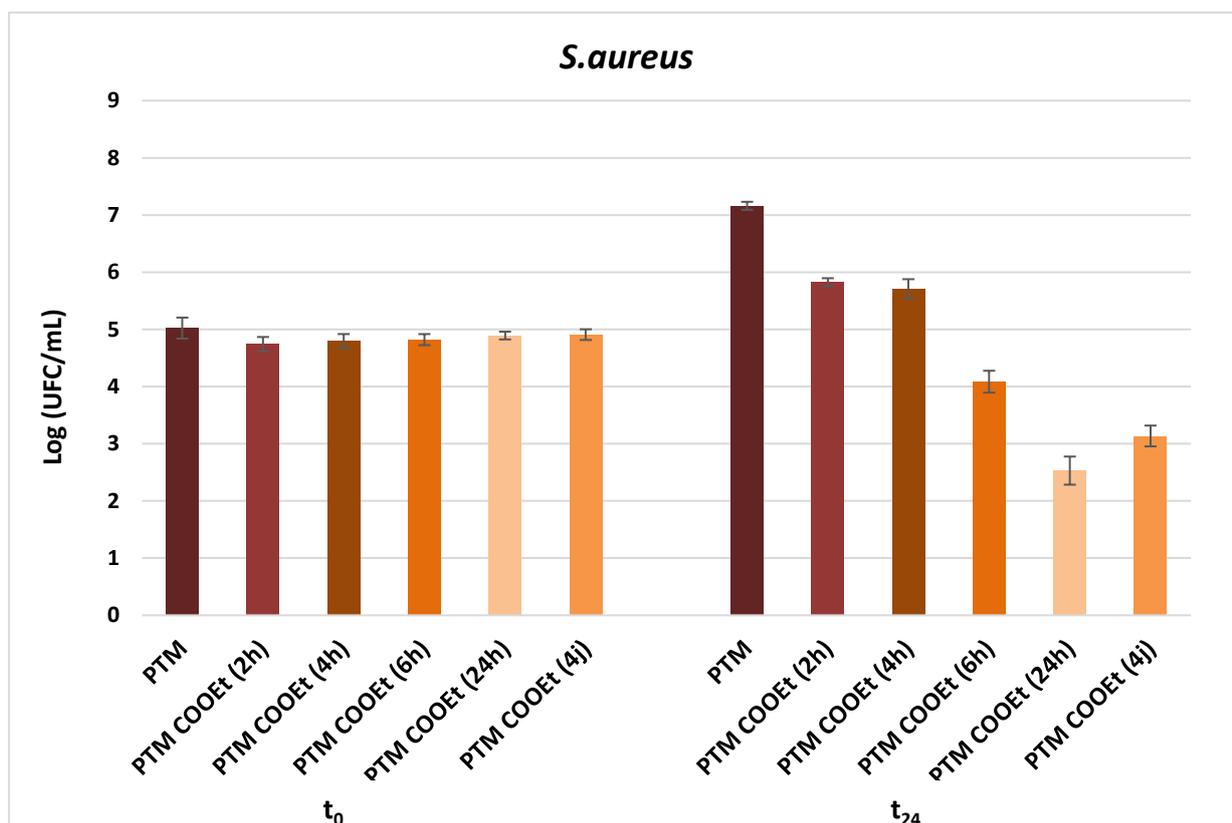
d'inhibition de 30% et 27% respectivement. Cela montre que l'activité des matériaux élaborés augmente avec l'augmentation du taux de propargylation et donc du taux de greffage.



**Figure 122: Activité antibactérienne contre *E. coli* de la pâte thermomécanique (PTM) et des matériaux portant le substituant hydroxyéthyle obtenus par greffage sur la pâte thermomécanique propargylée pendant 2h, 4h, 6h, 24h et 4j**

Pour *S. aureus*, les différents matériaux élaborés portant le substituant hydroxyéthyle, ne présentent aucune activité antibactérienne à t<sub>24</sub> quel que soit le taux de greffage.

Les matériaux portant le substituant éthoxycarbonyle obtenus en greffant l'azido-aryle sur la pâte thermomécanique propargylée pendant 2h et 4h ne présentent pas d'activité antibactérienne contre *S. aureus* (Figure 123). Une croissance de 1 log a été observée par rapport à la référence t<sub>0</sub>. Pour le matériau greffé sur la pâte thermomécanique propargylée pendant 6h, 24h et 4j, un effet bactéricide a été observé avec des taux d'inhibition de 18%, 55% et 40% respectivement. Ces matériaux, ne présentent aucune activité antibactérienne contre *E. coli*, quel que soit le taux de greffage.



**Figure 123: Activité antibactérienne contre *S. aureus* de la pâte thermomécanique (PTM), les matériaux portant le substituant éthoxycarbone obtenus par greffage sur la pâte thermomécanique propargylée pendant 2h, 4h, 6h, 24h et 4j**

Les résultats obtenus dans le cas des matériaux portant les substituants hydroxyéthyle ( $R'=\text{CH}_2\text{CH}_2\text{OH}$ ) et éthoxycarbone ( $\text{COOEt}$ ), obtenus après greffage sur la pâte thermomécanique propargylée pendant 24h, ont présenté la meilleure activité vis-à-vis de *E. coli* et de *S. aureus*.

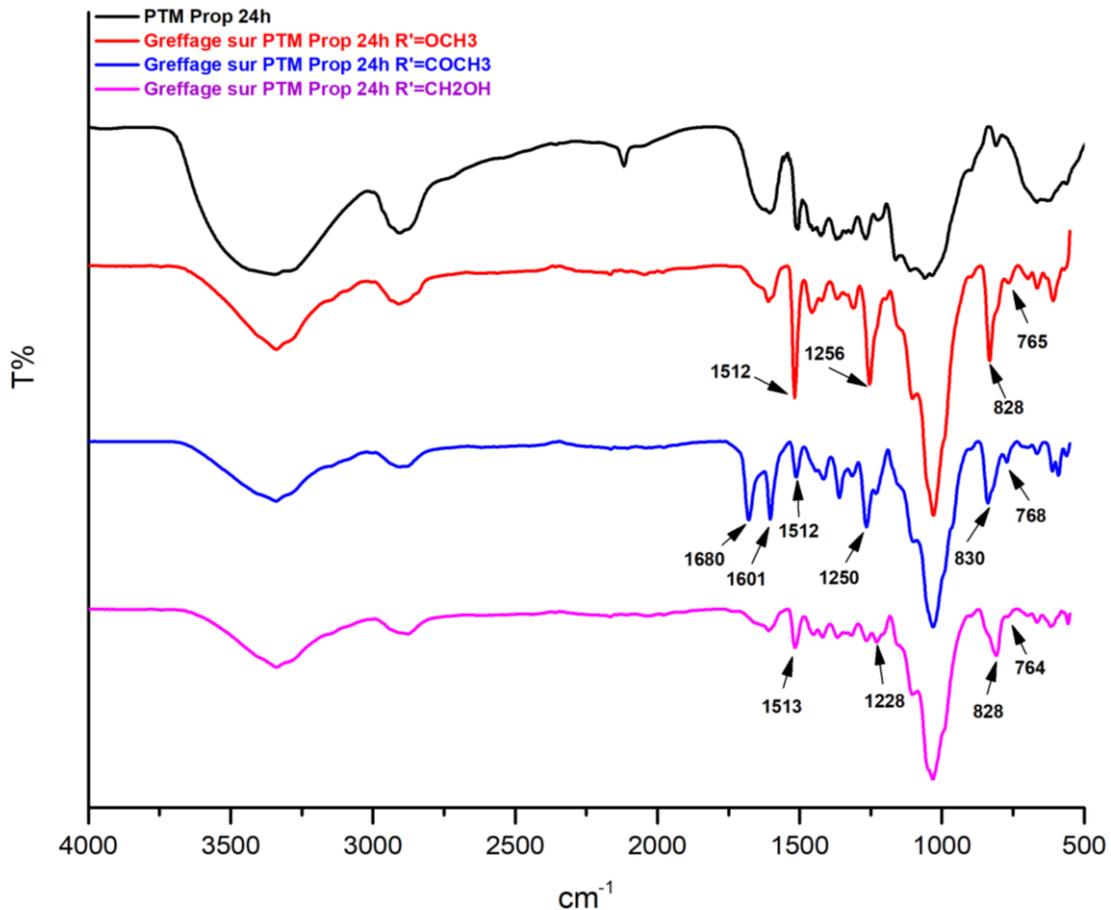
Par conséquent, nous avons poursuivi le travail par le greffage des différents azido-aryles sur la pâte thermomécanique obtenue après 24h de propargylation.

### III.4. Elaboration et évaluation biologique des matériaux portant les substituants hydroxyméthyle, méthoxyle et acétyl

#### III.4.1. Elaboration des matériaux

Les trois azido-aryles portant les substituants méthoxyle, acétyl et hydroxyméthyle, qui ont montrés une activité antibactérienne lors du greffage sur la pâte Kraft à  $t_{24}$ , ont été greffés sur la pâte thermomécanique.

Les matériaux obtenus sont caractérisés par spectroscopie IR (**Figure 124**). Pour les trois matériaux élaborés, on observe les bandes caractéristiques du triazole vers  $1512\text{ cm}^{-1}$ ,  $828\text{ cm}^{-1}$  et  $764\text{ cm}^{-1}$  ainsi que du substituant porté sur l'aryle, à  $1256\text{ cm}^{-1}$  pour le méthoxy, et à  $1680\text{ cm}^{-1}$ ,  $1601\text{ cm}^{-1}$  et  $1250\text{ cm}^{-1}$  pour l'acétyle.



**Figure 124: Spectre IR de la pâte thermomécanique propargylée après 24h et des matériaux portant les substituants méthoxy, acétyle et hydroxyméthyle**

Comme dans le cas de la PTM greffée avec les huiles essentielles, pour quantifier les motifs triazoles fixés, nous nous sommes tournés vers l'analyse élémentaire (Tableau 15). Là aussi, nous avons déterminé un taux de greffage en nombre de millimoles de molécules greffées par gramme de matériaux obtenus.

**Tableau 15: Résultats d'analyses élémentaires des matériaux 1,2,3-triazolés à base de pâte Kraft et pâte thermomécanique**

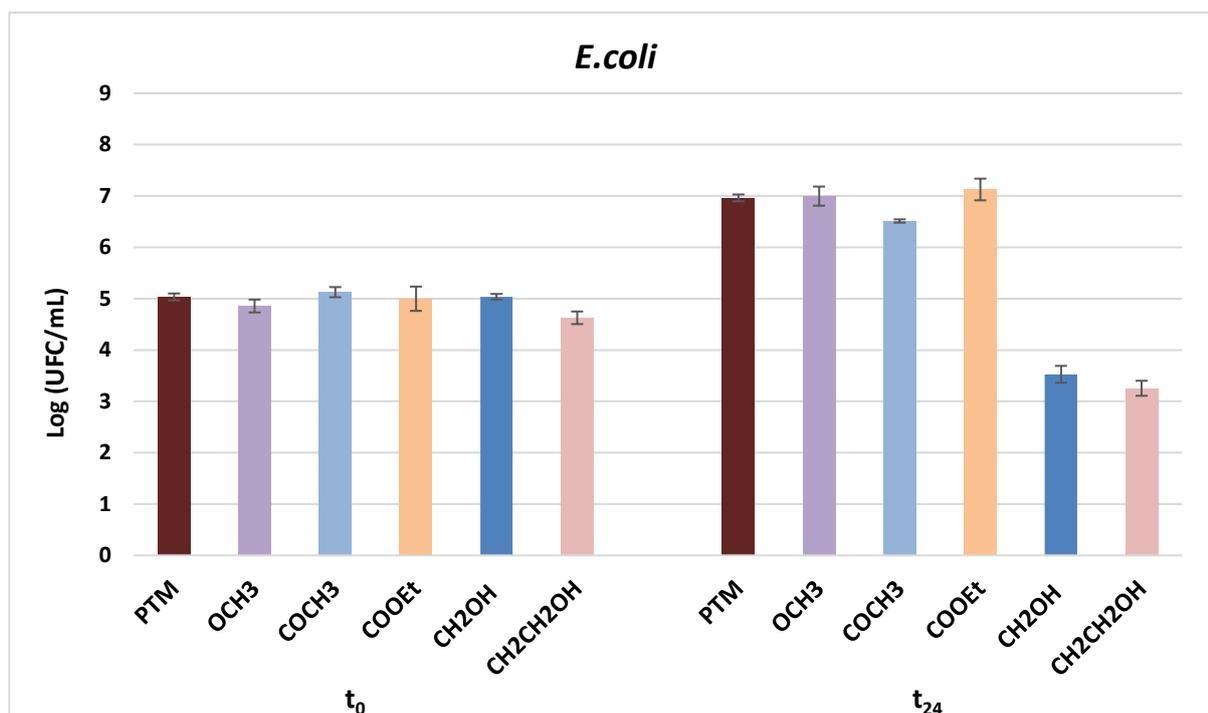
	Masse (mg)	%N	%C	%H	Taux de greffage (mmol/g)
PK-OCH <sub>3</sub>	1,549	5,58	52,96	5,59	<b>1,4</b>
PK-COCH <sub>3</sub>	1,31	5,38	63,188	5,48	<b>1,3</b>
PK-COOEt	1,918	5,1	47,04	5,72	<b>1,3</b>
PK-CH <sub>2</sub> OH	1,564	5,79	54,32	5,45	<b>1,4</b>
PK-CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> OH	1,489	5,5	55,20	5,84	<b>1,3</b>
PTM-OCH <sub>3</sub>	1,306	6,49	62,97	5,63	<b>1,6</b>
PTM-COCH <sub>3</sub>	1,387	6,56	59,99	5,47	<b>1,6</b>
PTM-COOEt	1,389	7,04	59,58	5,68	<b>1,7</b>
PTM-CH <sub>2</sub> OH	1,333	7,03	62,045	5,55	<b>1,7</b>
PTM-CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> OH	1,72	6,4	50,23	5,75	<b>1,5</b>

Le taux de greffage calculé dans le cas de la pâte thermomécanique est de l'ordre de 1,6 mmol/g, il est supérieur au taux obtenu dans le cas de la pâte Kraft qui est de l'ordre de 1,3 mmol/g.

Les taux de greffage des azido-aryles dépendent du degrés de propargylation. Il semble que la propargylation de la PTM en 24h, conduit à des degrés de fonctionnalisation supérieurs à ceux obtenus dans le cas de la pâte Kraft en 3 jours. Cette réaction étant réalisée en milieu basique, la formation de phénolates de la lignine dans le cas de la PTM, la favorise donc conduit, après cycloaddition, à des taux de greffage supérieurs.

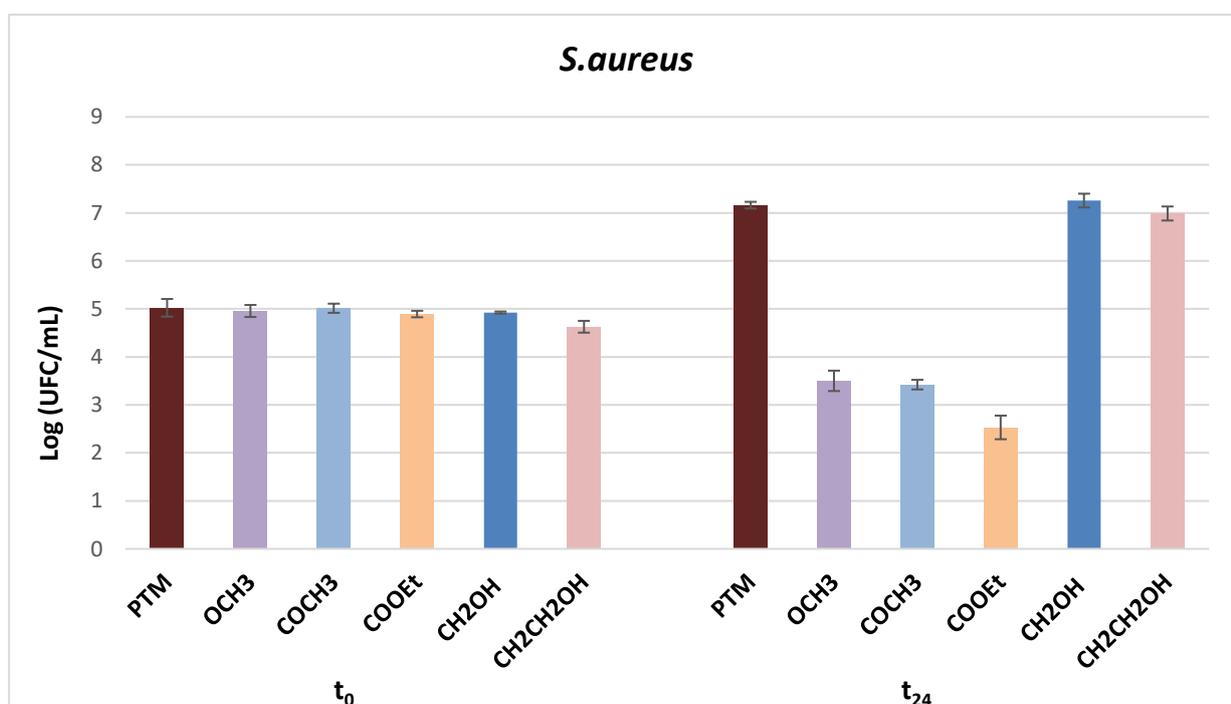
### III.4.2. Evaluation biologique

L'évaluation de l'activité antibactérienne des différents matériaux obtenus a été réalisée. Pour *E. coli* (**Figure 125**), les matériaux portant les substituants méthoxyle et acétyle ne présentent aucune activité antibactérienne. Pour le matériau portant le substituant hydroxyméthyle, un effet bactéricide a été observé avec un taux d'inhibition de 30%.



**Figure 125: Activité antibactérienne de la pâte thermomécanique (PTM) et des différents matériaux triazolés contre *E. coli***

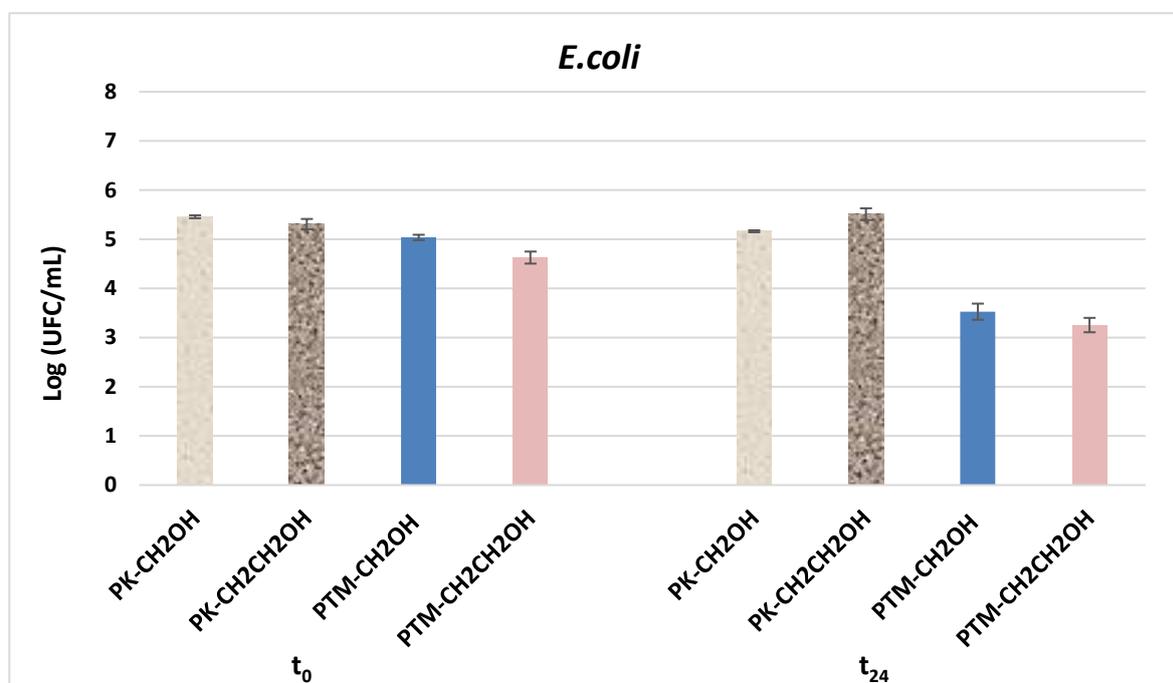
Pour *S. aureus* (Figure 126), le matériau portant le substituant hydroxyméthyle ne présente aucune activité antibactérienne. Pour les matériaux portant les substituant méthoxyle et acétyle, un effet bactéricide a été observé avec des taux d'inhibition de 30% et 33% respectivement.



**Figure 126: Activité antibactérienne de la pâte thermomécanique (PTM) et des différents matériaux triazolés contre *S. aureus***

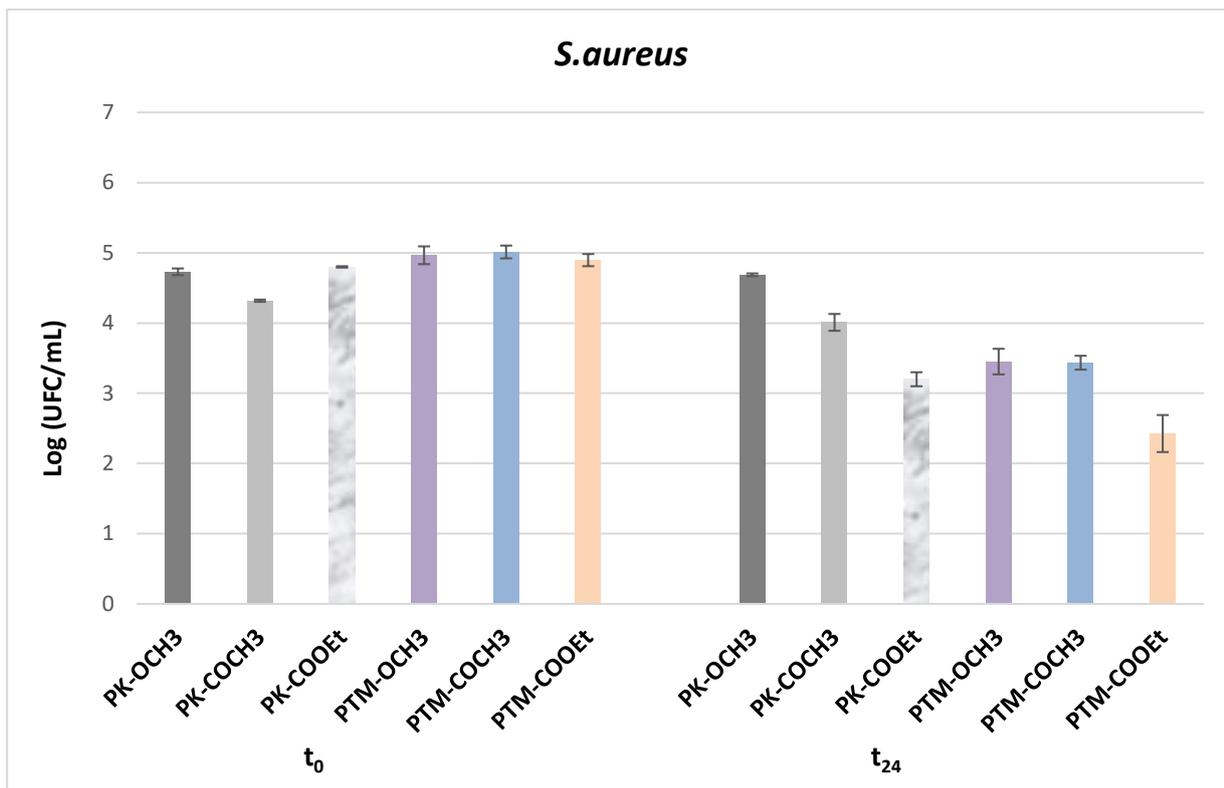
### III.5. Conclusion

Nous avons étudié le transfert des greffages de cinq azido-aryles portant les substituants méthoxyle, acétyle, éthoxycarbonyle, hydroxyméthyle et hydroxyéthyle ( $R' = \text{OCH}_3, \text{COCH}_3, \text{COOEt}, \text{CH}_2\text{OH}$  et  $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{OH}$ ) sur les fibres de pâte thermomécanique. Les matériaux élaborés présentent une activité antibactérienne supérieure à celle des matériaux obtenus à partir des fibres de pâte Kraft, vis-à-vis des deux souches bactériennes, *E. coli* et *S. aureus*. En effet, pour les matériaux portant les substituants hydroxyméthyle et hydroxyéthyle, on passe d'un effet bactériostatique contre *E. coli* dans le cas des greffages sur la pâte Kraft, à un effet bactéricide dans le cas de greffage sur la pâte thermomécanique avec un taux d'inhibition de 30% (**Figure 127**).



**Figure 127: Comparaison de l'activité antibactérienne entre les matériaux triazolés portant les substituant hydroxyméthyle et hydroxyéthyle obtenus par greffage sur la pâte Kraft et sur la pâte thermomécanique contre de *E. coli***

Pour *S. aureus*, les matériaux à base de pâte thermomécanique portant les substituants méthoxyle et acétyle, présentent un effet bactéricide avec des taux d'inhibition de 30% et 33% respectivement, là encore, on passe d'un effet bactériostatique dans le cas des greffages sur la pâte Kraft, à un effet bactéricide dans le cas des greffages sur la pâte thermomécanique. Pour le matériau portant le substituant éthoxycarbonyle, on remarque une amélioration de l'effet bactéricide, on passe d'un taux d'inhibition de 45% à un taux d'inhibition de 55% (**Figure 128**).



**Figure 128: Comparaison de l'activité antibactérienne entre les matériaux triazolés portant les substituants méthoxyle, acétyle et éthoxycarboxyle obtenus par greffage sur la pâte Kraft et sur la pâte thermomécanique contre de *S. aureus***

L'amélioration de cette activité peut être expliquée par un taux de greffage plus important dans le cas de la pâte thermomécanique. En effet, comme dans le cas des greffages des composés d'huile essentielle, en présence de soude, les polyphénols de la lignine contenue dans la pâte thermomécanique, réagissent rapidement, conduisant à des phénolates nucléophiles. La réaction de substitution nucléophile permettant le greffage du propargyle est donc favorisée. Cela conduit à un taux de propargylation plus important et donc un taux de greffage plus élevé que dans le cas de la pâte Kraft composée majoritairement de cellulose.

## Conclusion générale

Au cours de ces travaux de thèse, nous nous sommes intéressés à de nouveaux matériaux lignocellulosiques actifs obtenus par greffage covalent de petites molécules sur des fibres de pâte à papier, dans le but de développer de nouvelles voies de valorisation de la biomasse.

Dans une première partie, deux biocides naturels, le thymol et le carvacrol, ont été greffés sur des fibres de pâte Kraft par l'intermédiaire d'un lien triazine.

L'évaluation microbiologique des matériaux élaborés a montré un effet bactériostatique du matériau obtenu après greffage du thymol, sur les deux souches bactériennes testées, *E. coli* et *S. aureus*, alors que le second matériau portant le carvacrol n'a un effet bactériostatique que vis-à-vis d'*E. coli*. Ces matériaux bloquent donc la croissance bactérienne ce qui empêche la colonisation des surfaces des matériaux et la formation de biofilms.

Un effet de synergie entre le thymol et le carvacrol lorsqu'ils sont greffés sur support a été montré ce qui à notre connaissance, n'a jamais été mentionné dans la littérature. L'activité antibactérienne est passé d'un effet bactériostatique à un effet bactéricide pour certains mélanges. A noter que les matériaux élaborés inhibent la croissance bactérienne et empêchent leur prolifération même quand les deux bactéries sont en communauté.

Ces résultats nous ont amené à transférer le procédé de greffage sur la pâte thermomécanique. Les matériaux élaborés présentent une meilleure activité que celle obtenue dans le cas de la pâte Kraft. De plus, pour *S. aureus*, le matériau PTM-Triazine-Carvacrol présente un effet bactériostatique, alors que dans le cas de la pâte Kraft, il ne présentait pas d'activité.

Dans la deuxième partie nous avons poursuivi notre étude en élaborant un papier actif par greffage de molécules inactives. L'originalité de ce travail réside dans le fait que le motif « aryltriazole » qui apporte l'activité antibactérienne, est construit par réaction de cycloaddition catalysée, entre les fibres de pâte à papier propargylées et des azido-aryles différemment substitués. Le choix de cette réaction se justifie car elle est simple à mettre en œuvre, réalisable en milieux aqueux, à température ambiante et sans formation de produits secondaires.

De plus, le lien triazole formé possède une stabilité à l'hydrolyse acide ou basique ainsi qu'aux conditions oxydatives et réductrices. Il s'avère également, relativement stable aux dégradations métaboliques, ce qui augmente la durée de vie des matériaux obtenus.

L'utilisation de différents substituants portés par l'aryle a permis de mettre en évidence l'influence de la nature de ces substituants sur l'activité antibactérienne des matériaux élaborés.

En effet, cinq matériaux sur huit, ont montré une activité antibactérienne après 24h de contact ( $t_{24}$ ) contre l'une ou l'autre des souches étudiées. Deux d'entre eux ont présenté une activité bactériostatique contre *E. Coli* et deux autres contre *S. aureus*. Un cinquième matériau a présenté une activité bactéricide avec un taux d'inhibition de 45% contre *S. aureus*.

Il est important de noter qu'après 96 h de contact, les cinq matériaux ont présenté une activité bactériostatique sur les deux souches bactériennes.

Nous avons poursuivi l'étude par la préparation et l'évaluation de l'activité de mélanges de matériaux, l'un ayant une activité contre *E. coli* et l'autre ayant une activité contre *S. aureus* à  $t_{24}$ , l'objectif étant d'obtenir un matériau actif contre les deux souches à  $t_{24}$ .

Cet objectif a été atteint car nous avons développé un matériau bactéricide contre les deux souches testées avec un taux d'inhibition de 60% montrant ainsi un effet de synergie entre les aryltriazoles supportés.

Le transfert sur la pâte thermomécanique a conduit à des matériaux bactéricides avec un taux d'inhibition de l'ordre de 35%, alors qu'ils sont bactériostatiques dans le cas de la pâte Kraft.

Ces travaux vont se poursuivre par l'étude de l'effet combiné de fibres modifiées actives pour obtenir des matériaux à large spectre d'activité. Par ailleurs, une étude des propriétés mécaniques des matériaux élaborés permettra l'orientation des applications industrielles auxquelles ils pourraient aboutir. Cela permettra de valoriser les différents matériaux obtenus au cours de ces travaux comme, par exemple, matériaux d'emballage, de construction ou encore comme membrane filtrante antibactérienne.



## **Chapitre 4**

### **Partie expérimentale**



## I. Matériels

### I.1. Réactifs et solvants

L'origine des réactifs et solvants utilisés au cours de ce travail est présentée dans les tableaux 16 et 17. Tous ces composés sont utilisés tels quels. La pureté indiquée est la pureté minimale garantie par le fournisseur.

**Tableau 16 : liste des solvants utilisés**

<b>Solvants</b>	<b>Pureté</b>	<b>Origine</b>
Acétate d'éthyle	100%	VWR Chemical
Dichlorométhane anhydre	99.7 %	Acros Organics
Tétrahydrofurane	> 99%	VWR Chemical

**Tableau 17 : Liste des réactifs utilisés**

<b>Réactifs</b>	<b>Pureté</b>	<b>Origine</b>
4-aminoacétophenone	99%	Alfa Aesar
4-aminobenzyl alcool	98%	Alfa Aesar
2(4-aminophenyl) éthanol	97%	Alfa Aesar
Aminophénol	98%	Alfa Aesar
Aniline	99%	Alfa Aesar
Anisidine	99%	Alfa Aesar
Ascorbate de sodium	98%	Aldrich
Azoture de sodium	99%	Alfa Aesar
Bromure de propargyle	80%	Alfa Aesar
Carvacrol	98%	Sigma Aldrich
Chloro-aniline	98%	Alfa Aesar
Chlorure cyanurique	98%	Alfa Aesar
Ethyl-4-aminobenzoate	98%	Alfa Aesar
N-Ethyldiisopropylamine	99%	Alfa Aesar
Hydroxyde de sodium	≥98%	VWR Chemical
Nitrite de sodium	99%	Sigma Aldrich
Sulfate de cuivre pentahydrate	98%	Sigma Aldrich
Thymol	98%	Alfa Aesar

## **I.2. Chromatographie**

### **I.2.1. Chromatographie sur couche mince (CCM) analytique**

Les plaques de silice (Kieselger 60 F254 de 0,2 mm d'épaisseur, Merck) sont employées pour la chromatographie sur couche mince. La révélation des plaques se fait par observation sous ultraviolet

Les divers éluant utilisés sont précisés après chaque protocole expérimental de synthèse.

### **I.2.2. Chromatographie sur couche mince préparative**

Les chromatographies sur couche mince préparative sont effectuées sur des plaques préparées au laboratoire à l'aide de 80g de silice (Kieselger 60 PF254 Merck) gélifiées par addition de 210 mL d'eau et déposée sur des plaques de verre (20 cm × 20 cm) avec 2 mm d'épaisseur, puis séchées à l'air libre et activée à 110 °C durant deux heures.

## **I.3. Analyses**

### **I.3.1. Spectroscopie de Résonance Magnétique Nucléaire (RMN)**

Les spectres de RMN  $^1\text{H}$  ont été réalisés sur un appareil Bruker DPX-400 avec une fréquence de 400 MHz. Les déplacements chimiques  $\delta$  sont exprimés en ppm, en prenant le tétraméthylsilane (TMS) comme étalon interne. Les constantes de couplage  $J$  sont données en Hertz (Hz).

### **I.3.2. Spectroscopie Infrarouge à Transformée de Fourier (FTIR)**

Les spectres infrarouges ont été réalisés avec un appareil Perkin Elmer 1000 sur des pastilles conditionnées au bromure de potassium (KBr). Un total de 16 scans est effectué pour chaque échantillon avec une résolution de  $0,1 \text{ cm}^{-1}$ . Les longueurs d'onde sont exprimés en  $\text{cm}^{-1}$ .

### **I.3.3. Spectroscopie de Masse**

L'analyse par spectroscopie de masse à ionisation par électrospray à haute résolution (HR MS-ESI) a été réalisés avec un spectromètre de masse maXis Q-TOF de Bruker, couplé à une chaîne RSLC Ultimate 3000 (Dionex)

### **I.3.4. Spectroscopie Photoélectronique X (XPS)**

L'analyse XPS a été réalisée en utilisant un spectromètre Kratos Axis Ultra qui fournissait des informations de composition élémentaire (pourcentage atomique) dans une profondeur de quelques nanomètres de la surface de l'échantillon. Elle mesure le nombre d'électrons émis dans un intervalle d'énergie en fonction de l'énergie de liaison des atomes. Trois mesures sont réalisées pour chaque échantillon en trois points différents.

Le DS des matériaux de pâte Kraft modifiée a été déterminé à partir des résultats XPS.

#### **- Calcul du DS des matériaux PK-Triazine-Thymol et PK-Triazine-Carvacrol**

Une unité Triazine-Thymol ou Triazine-Carvacrol (Triazine-CHE) étant constituée de 3 atomes d'azotes, elle peut être représentée par le pourcentage suivant :

$$\%[\text{Triazine} - \text{CHE}] = \frac{[\%N]}{3}$$

Une UAG est constituée de 5 atomes d'oxygène, donc une UAG peut être présentée par le pourcentage d'oxygène moins le pourcentage d'un oxygène apporté par l'unité Triazine-CHE, divisé par 5:

$$\%[\text{UAG}] = \frac{\%[\text{O}] - \%[\text{Triazine} - \text{CHE}]}{5}$$

Finalement, le DS s'obtient en divisant le pourcentage de l'unité Triazine-CHE par le pourcentage d'une UAG :

$$DS = \frac{\%[\text{Triazine} - \text{CHE}]}{\%[\text{AGU}]}$$

#### **- Calcul du DS de la pâte Kraft Propargylée**

Une UAG étant constituée de 5 atomes d'oxygène, elle peut être représentée par le pourcentage suivant :

$$\%[1 \text{ UAG}] = \frac{\%[\text{O}]}{5}$$

Une UAG est également constituée de 6 atomes de carbone, ces derniers pouvant être exprimés par le pourcentage suivant :

$$\%[C_{UAG}] = 6 \times \%[1 \text{ UAG}]$$

Le pourcentage d'atomes de carbone dans une unité propargyle est :

$$\%[C_{prop}] = \%[C] - \%[C_{UAG}]$$

Le pourcentage d'unité propargyle est :

$$\%[Prop] = \frac{\%[C_{prop}]}{3}$$

Finalement, le DS de la réaction de propargylation s'obtient en divisant le pourcentage d'unité propargyle par le pourcentage d'une UAG :

$$DS = \frac{\%[Prop]}{\%[1 \text{ UAG}]}$$

- **Calcul du DS des matériaux 1,2,3-triazolés**

Une unité aryltriazole étant constituée de 3 atomes d'azotes, elle peut être représentée par le pourcentage suivant :

$$\%[aryltriazole] = \frac{[\%N]}{3}$$

Une UAG est constituée de 5 atomes d'oxygène, donc une UAG peut être présentée par le pourcentage d'oxygène moins le pourcentage de nombre oxygène apporté par l'unité aryltriazole (nO) :

$$\%[UAG] = \frac{\%[O] - (nO \times \%[Aryl - triazole])}{5}$$

Finalement, le DS s'obtient en divisant le pourcentage de l'unité Triazine-CHE par le pourcentage d' UAG :

$$DS = \frac{\%[Aryl - triazole]}{\%[UAG]}$$

### **I.3.5. Microscopie Electronique à Balayage Environnemental (MEB Environnemental)**

L'analyse par MEB environnemental a été réalisée avec un microscope électronique à balayage (Quanta FEG-250 SEM) afin d'observer des échantillons de pâte Kraft non modifiée et modifiée en présence de bactéries après 24 h de contact. Ce microscope permet d'analyser des échantillons avec une humidité et une température contrôlée, qui sont des paramètres cruciaux pour les échantillons biologiques. Les échantillons ont été observés sans traitement préalable.

### **I.3.6. Analyses élémentaires**

Les analyses élémentaires sont effectuées à l'aide d'un analyseur élémentaire CHNS/O ThermoFisherScientific de série Flash Smart. Les échantillons sont placés dans des nacelles en étain puis pyrolysés à 930°C en présence d'oxygène et sous courant d'hélium. L'azote, le carbone, et l'hydrogène sont recombinaés pour donner du diazote, du dioxyde de carbone et de l'eau. Ces gaz sont ensuite séparés sur une colonne de chromatographie gazeuse (GC). Les analyses sont faites en duplicata. La viabilité des résultats est établie par le passage d'un étalon (Cystéine dans notre cas) au début et à la fin de l'analyse.

#### **- Calcul de taux de greffage (mol/g) pour les matériaux PTM-Triazine-Thymol et PTM-Triazine-Carvacrol (PTM-CHE):**

Dans un échantillon, la masse de l'azote peut être exprimé par l'équation suivante :

$$\text{Masse de l'azote} = \frac{\text{masse de l'échantillon} \times \%[N]}{100} (g)$$

Une unité Triazine-CHE étant constituée de 3 atomes d'azotes, le nombre de mole d'une unité Triazine-CHE est:

$$n (\text{Triazine} - \text{CHE}) = \frac{\text{Masse de l'azote}}{M(N) \times 3} (mol)$$

Le taux de greffage en mol/g est donc égal à :

$$\text{Taux de greffage} = \frac{n (\text{Triazine} - \text{CHE}) \times 1000}{\text{Masse de l'échantillon}} (mol/g)$$

## II. Tests microbiologiques

### II.1. Souches bactériennes

*Escherichia coli* CIP 54.8T (*E. coli*, Institut Pasteur Paris): naturellement présente dans l'intestin des êtres humains et de certains ruminants, elle est responsable de toxi-infections alimentaires collectives (TIAC) et d'infections urinaires. C'est un bacille Gram négatif de la famille des Entérobactéries (*Enterobacteriaceae*).

*Staphylococcus aureus* CIP7625 (*S. aureus*, Institut Pasteur Paris): responsable d'infections cutané-muqueuses, elle est fréquemment impliquée dans les infections nosocomiales. C'est un coque Gram positif de la famille des Micrococcacées (*Micrococcaceae*) capable de s'organiser sous forme de biofilms.

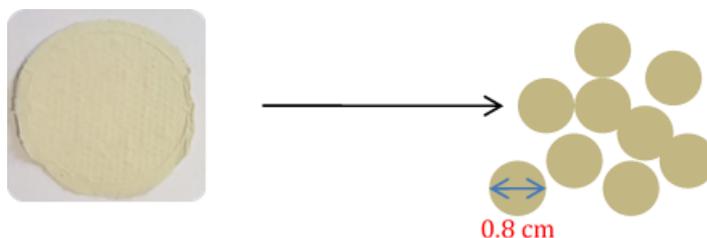
### II.2. Milieux de culture

Les souches bactériennes sont mises en culture dans un milieu **Trypticase soja (TS)**, peptone de caséine 17,0 g/L ; peptone de farine de soja 3,0 g/l ; D (+) - glucose 2,5 g/L ; chlorure de sodium 5,0 g/L ; phosphate dipotassique 2,5 g/L ; pH  $7,3 \pm 0,2$ ). C'est un milieu riche qui convient à l'isolement, la culture de différentes souches bactériennes. Avant utilisation, le milieu est stérilisé par autoclavage pendant 15 min à 121°C. Le gélose Trypticase soja a été utilisé comme milieu de culture solide pour l'isolement et le dénombrement des bactéries.

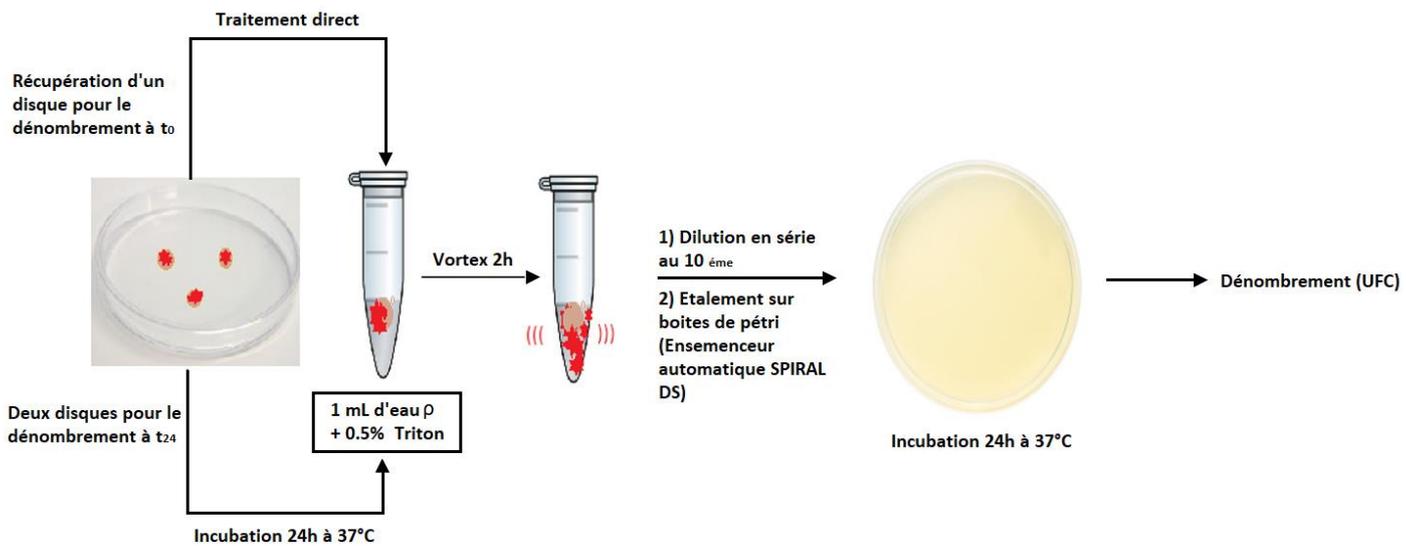
### II.3. Méthode d'évaluation de l'activité antibactérienne

L'activité antibactérienne a été évaluée en utilisant une méthode basée sur la norme AATCC100 « Assessment of Antibacterial Finishes on Textile Materials ». C'est une méthode utilisée pour évaluer quantitativement l'activité antimicrobienne des textiles/tissus après 24 heures de contact.

A partir du matériau à tester, des feuilles sont préparées puis découpées en disques de 8mm de diamètre. L'ensemble des disques est pasteurisé à 70°C.



Sur 3 disques du même échantillon, 50  $\mu\text{L}$  d'une suspension bactérienne à  $2 \times 10^6$  UFC/mL est déposés, soit  $10^5$  UFC (Unité Formant Colonie). Directement après le dépôt, un disque est récupéré puis agité vigoureusement pendant 2 heures, ensuite à partir du surnageant, des dilutions en série au  $10^{\text{ème}}$  sont effectués puis ensemencés sur boîtes de Pétri à l'aide d'un ensemenceur automatique de boîtes de Pétri (SPIRAL DS®) dont le seuil de sensibilité est de 30 à  $10^7$  UFC/mL). Après 24 heures à  $37^\circ\text{C}$ , un dénombrement des colonies est effectué ( $t_0$ ). Les deux disques restants sont laissés à  $37^\circ\text{C}$ . Après 24 heures de contact, ces disques sont récupérés et traités de la même manière que le disque à  $t_0$ .



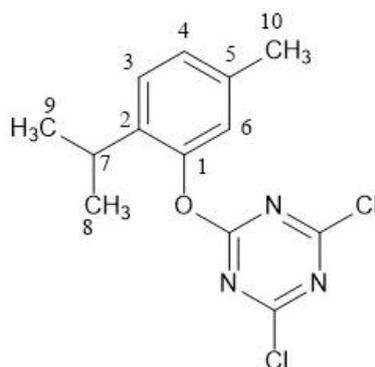
### III. Synthèses

#### III.1. Elaboration d'un papier bioactif par greffage de biocides naturels

##### III.1.1. Monosubstitution de la triazine par le Thymol et le Carvacrol

A une solution de thymol ou de carvacrol (1 mmol) et de N-éthyl-diisopropylamine DIPEA (1 éq., 170  $\mu$ L) dans du dichlorométhane anhydre (4 mL), 1,05 mmol de chlorure cyanurique sont ajoutés à  $-40^{\circ}\text{C}$ . La réaction est suivie par CCM. Une fois la réaction terminée (5 min), le mélange est dilué avec du dichlorométhane (20 mL) et la phase organique est lavée avec de l'eau (10 mL) puis séchée sur  $\text{MgSO}_4$ . L'élimination du solvant par évaporation sous vide a donné un produit brut, qui a été purifié par Chromatographie sur couche mince préparative, en utilisant du chloroforme/éther de pétrole (1/1) comme éluant.

**Triazine-Thymol** : Huile jaune, Rendement = 79%;  $R_f$  : 0,59 (Chloroforme/éther de pétrole, 1/1, V/V).

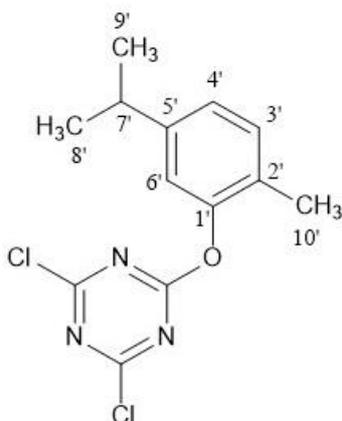


$^1\text{H RMN}$  ( $\text{DMSO-d}_6$ ) :  $\delta$ ppm = 1,15 (d,  $J=7,4$  Hz, H8 et H9) ; 2,3 (s, H10) ; 3,01 (sept,  $J=7,3$  Hz; H7) ; 6,99 (sé, H6) ; 7,08 (dd,  $J=2,5$  Hz,  $J=8,1$  Hz, H4) ; 7,25 (d,  $J=8,2$  Hz, H3).

IR ( $\text{cm}^{-1}$ ): 2965 (=C-H), 1520 (N=C), 1402 (C-H,  $\text{CH}_3$ ), 1260 (C-O), 820 (C-Cl).

MS (ESI)  $m/z$  :  $\text{C}_{13}\text{H}_{13}\text{ON}_3\text{Cl}_2$  : 298,05, 300,05 et 302,05 [ $\text{M} + \text{H}$ ] $^+$ .

**Triazine-Carvacrol** : Cristaux blancs ; Rendement = 68% ;  $R_f$  : 0,65 (Chloroforme/éther de pétrole, 1/1, V/V);  $T_f$  = 81°C.



$^1\text{H}$  RMN (DMSO- $d_6$ ) :  $\delta$ ppm= 1,19 (d,  $J=6,9$  Hz,  $\text{H}8'$  et  $\text{H}9'$ ) ; 2,11 (s,  $\text{H}10'$ ) ; 2,88 (sept,  $J=6,95$  Hz,  $\text{H}7'$ ) ; 7,08 (dd,  $J=1,65$  Hz and  $J=9,05$  Hz,  $\text{H}4'$ ) ; 7,23 (sé,  $\text{H}6'$ ) ; 7,25 (d,  $J= 9,10$  Hz,  $\text{H}3'$ ).

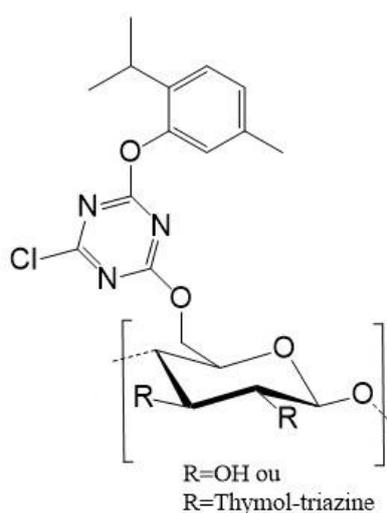
IR ( $\text{cm}^{-1}$ ): 2981 (=C-H), 1521 (N=C), 1404 (C-H,  $\text{CH}_3$ ), 1278 (C-O), 821 (C-Cl).

MS (ESI)  $m/z$  :  $\text{C}_{13}\text{H}_{13}\text{ON}_3\text{Cl}_2$  : 298,05, 300,05 et 302,05 $[\text{M} + \text{H}]^+$ .

### III.1.2. Greffage du thymol-triazine et du carvacrol-triazine sur les fibres de pâte à papier

Les fibres de pâte à papier (1 g) ont été mises en suspension dans une solution de NaOH à 0,5 M (40 mL). Le mélange a été agité pendant 24h, à température ambiante, entraînant une dispersion des fibres dans la solution de NaOH. 9,25 mmol de triazine-thymol ou de triazine-carvacrol préalablement solubilisés dans du dichlorométhane (30 mL) ont ensuite été ajoutés. Après 48 h à température ambiante sous agitation magnétique, le mélange a été filtré et lavé avec du dichlorométhane (2 x 50 mL), de l'eau (2 x 50 mL) et de l'éthanol (2 x 50 mL), puis séché à 60 ° C.

**PK-Triazine-Thymol** : Rendement massique : 101%.



IR (cm<sup>-1</sup>): 3405 (OH), 2908 (=C-H), 1577 (C = N), 1160 (C-O), 1066 (C-O-C), 823 (C-Cl),

XPS (eV): 533,15 (O1s: 35,9%), 286,74 (C1s, 62,8%), 399,20 (N1s, 1,4%), DS = 0,07.

Analyse élémentaire : m=0,807mg ; N : 0.35% ; C : 41,94%, H : 5.95%, taux de greffage = 0,08 mmol/g

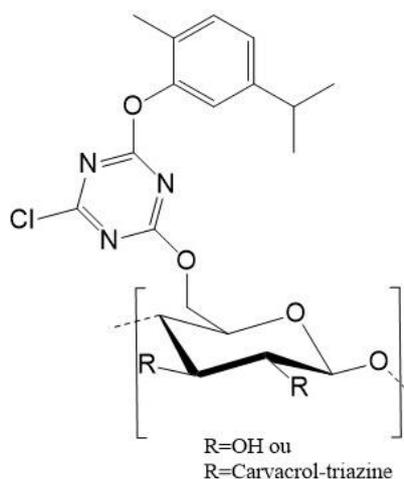
**PTM-Triazine-Thymol** : Rendement massique : 99%

IR (cm<sup>-1</sup>): 3286 (OH), 2904 (=C-H), 1577 (C=N), 1164 (C-O), 1050 (C-O-C), 823 (C-Cl).

XPS (eV): 532,93 (O1s: 30,5%), 286,14 (C1s, 65,18%), 399,09 (N1s, 4,03%), 200,55 (Cl2p, 0,18).

Analyse élémentaire: m=0,822, N: 2,1131% ; C: 46,3913% ; H : 5,4862% ; taux de greffage = 0,5 mmol/g.

**PK-Triazine-Carvacrol** : Rendement massique : 101%.



IR ( $\text{cm}^{-1}$ ): 3410 (OH), 2902 (=C-H), 1524 (C = N), 1164 (C-O), 1064 (C-O-C), 826 (C-Cl).

XPS (eV): 533,09 (O1s: 35,4%), 286,70 (C1s, 63,1%), 399,26 (N1s, 1,5%), DS = 0,07.

Analyse élémentaire: m = 1,518 mg, N : 0,45 % ; C : 41,2 % ; H : 5,9 %, taux de greffage = 0,1 mmol/g.

**PTM-Triazine-Carvacrol** : Rendement massique : 99%

IR ( $\text{cm}^{-1}$ ): 3276 (OH), 2914 (=C-H), 1575 (C=N), 1160 (C-O), 1066 (C-O-C), 820 (C-Cl).

XPS (eV): 532,59 (O1s: 26,72%), 284,84 (C1s, 67,65%), 398,79 (N1s, 5,04%), 197,76 (Cl2p, 0,38).

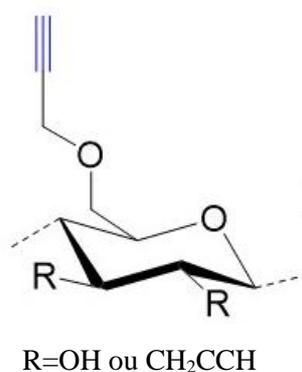
Analyse élémentaire: m = 0,936 mg, N : 2,66 % ; C : 46,27 % ; H : 5,42 %, taux de greffage = 0,63 mmol/g.

## III.2. Elaboration de nouveaux matériaux bioactifs portant un aryltriazole

### III.2.1. Propargylation des fibres de pâte à papier

Les fibres de pâte à papier (10g) ont été mises en suspension dans une solution de NaOH (153 mL, 7,4 g), le mélange a été agité pendant 15 minutes à température ambiante conduisant à une dispersion de la pâte à papier. 58 ml de bromure de propargyle (616,8 mmol, 10 éq. / UAG) ont ensuite été ajoutés. Le milieu réactionnel est homogénéisé puis maintenu à température ambiante, sans agitation. Après 96 heures, le mélange a été filtré et lavé avec de l'eau chaude (2x400 mL) et de l'éthanol chaud (2x400 mL). Le produit a été séché à 60 ° C.

**Pâte Kraft propargylée** : Rendement massique = 105%.



IR (cm<sup>-1</sup>): 3430 (OH), 2900 (CH), 2116 (C≡C), 1166 (C-O), 1056 (C-O-C).

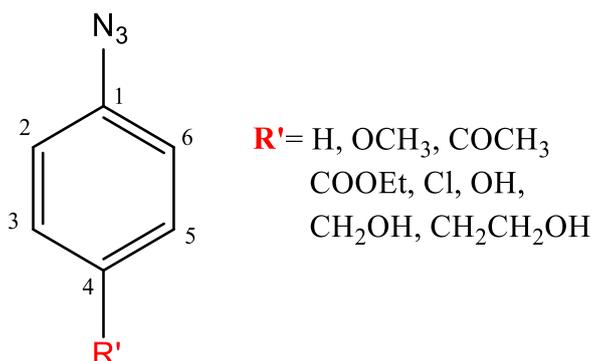
XPS (eV): 532 (O1s, 37,45%), 285 (C1s, 62,55%). DS = 0,32.

**Pâte thermomécanique propargylée** : Rendement massique = (2h de réaction :100%) ; (4h de réaction : 101%) ; (6h de réaction :101%), (24h de réaction :107%), (4j de réaction :107,5%).

XPS (eV): 532,62 (O1s, 30,31%), 285,44 (C1s, 68,7%), 399,71 (N1s, 0,99).

IR (cm<sup>-1</sup>): 3332 (OH), 2908 (C-H), 2118 (C≡C), 1160 (C-O), 1060 (C-O-C); (Figure 120).

### III.2.2. Synthèse des dérivés azidoaryles



A une solution d'arylamine (44 mmol) dans de l'acétate d'éthyle (80 mL) et de l'eau (10 mL), 24 mL d'acide chlorhydrique à 37% sont ajoutés à 0°C. Le mélange réactionnel est agité pendant 15 minutes avant l'ajout goutte à goutte du nitrite de sodium (88 mmol, 2éq.) préalablement solubilisé dans de l'eau (15 mL). La solution est ensuite agitée pendant 30 min avant l'addition goutte à goutte d'azoture de sodium (88 mmol, 2éq.) préalablement solubilisé dans de l'eau (15 mL). Une fois l'addition terminée, la réaction est agitée pendant 30 minutes supplémentaires. Le mélange réactionnel est dilué avec de l'eau (80 mL) puis la phase aqueuse est extraite avec de l'acétate d'éthyle (2 x 80 mL) et la phase organique est lavée avec une solution saturée de NaHCO<sub>3</sub> (80 mL), puis avec de l'eau (80 mL) et séchée sur MgSO<sub>4</sub>. L'évaporation du solvant sous vide a donné des produits bruts qui seront utilisés pour l'étape suivante, sans purification.

**R'=H** : Rendement=82%.

IR (cm<sup>-1</sup>): 3065 (=C-H), 2129 (-N<sub>3</sub>), 1594 (C = C).

<sup>1</sup>H RMN (DMSO-d<sub>6</sub>): δppm = 7,03 (m, 2H aromatiques); 7,13 (tt, J = 7,4 Hz et J = 0,9 Hz, H4), 7,35 (m, 2H aromatiques).

**R'=OCH<sub>3</sub>**: Rendement= 86%.

IR (cm<sup>-1</sup>): 3058 (=C-H), 2966 (C-H, CH<sub>3</sub>), 2107 (-N<sub>3</sub>), 1581 (C = C), 1027 (C-O).

<sup>1</sup>H RMN (DMSO-d<sub>6</sub>): δppm=3,79 (s, OCH<sub>3</sub>); 6,88 (m, 2H aromatiques); 6,96 (m, 2H aromatiques).

**R'=COCH<sub>3</sub>**: Rendement=99%

IR (cm<sup>-1</sup>): 2926 (C-H, CH<sub>3</sub>), 2128 (-N<sub>3</sub>), 1702 (C = O), 1597 (C = C).

<sup>1</sup>H RMN (DMSO-d<sub>6</sub>): δppm = 2,58 (s, COCH<sub>3</sub>); 7,1 (m, 2H aromatiques); 7,97 (m, 2H aromatiques).

**R'=COOEt**: Rendement=94%.

IR (cm<sup>-1</sup>): 2984 (C-H, CH<sub>3</sub>), 2126 (-N<sub>3</sub>); 1715 (C = O); 1604 (C = C).

<sup>1</sup>H RMN (DMSO-d<sub>6</sub>): δppm=4,3 (q, J = 7,09 Hz, COOCH<sub>2</sub>HCH<sub>3</sub>); 1,32 (t, J=7,12 Hz, COOCH<sub>2</sub>HCH<sub>3</sub>); 7,04 (m, 2H aromatiques), 8,04 (m, 2H aromatiques).

**R'=Cl**: Rendement = 96%.

IR (cm<sup>-1</sup>): 2133 et 2095 (-N<sub>3</sub>); 1637 (C = C), 824 (C-Cl).

<sup>1</sup>H RMN (DMSO-d<sub>6</sub>): δppm=7,15 (m, 2H aromatiques); 7,46 (m, 2H aromatiques).

**R'=OH**: Rendement=90% ;

IR (cm<sup>-1</sup>): 3433 (OH), 2115 (-N<sub>3</sub>), 1632 (C = C).

<sup>1</sup>H RMN (DMSO-d<sub>6</sub>): δppm=9,49 (s, OH); 6,08 (m, 2H aromatiques); 6,92 (m, 2H aromatiques).

**R'=CH<sub>2</sub>OH**: Rendement=84%.

IR (cm<sup>-1</sup>): 3445 (OH), 2110 (-N<sub>3</sub>), 1633 (C = C).

<sup>1</sup>H RMN (DMSO-d<sub>6</sub>): δppm=5,19 (t, J=4,6 Hz, CH<sub>2</sub>OH); 4,47 (d, J=4,4 Hz, CH<sub>2</sub>OH); 7,07 (m, 2H aromatiques), 7,35 (m, 2H aromatiques).

**R'=CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>OH**: Rendement=81%.

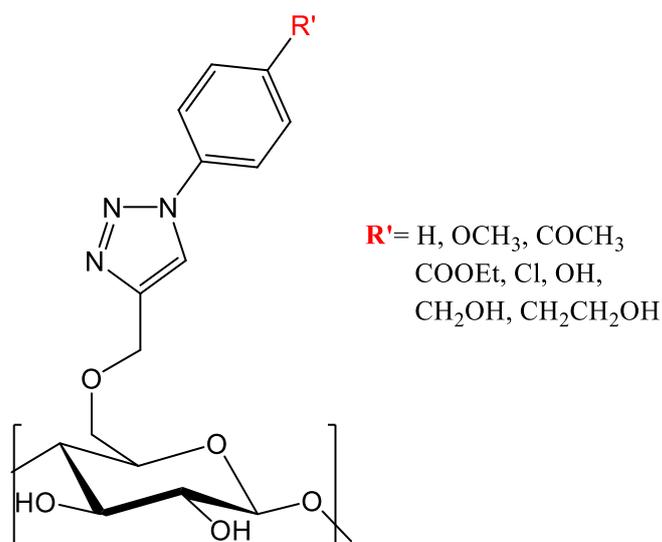
IR (cm<sup>-1</sup>): 3348(OH), 2120 (-N<sub>3</sub>), 1638 (C = C).

<sup>1</sup>H RMN (DMSO-d<sub>6</sub>): δppm=4,61 (t, J=4,2 Hz, CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>OH); 3,58 (td, J=5,6 et J=4,4 Hz, CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>OH), 2,70 (t, J=5,6 Hz, CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>OH), 6,97 (m, 2H aromatiques); 7,2 (m, 2H aromatiques).

### III.2.3. Greffage des azido-aryles sur les fibres de pâte à papier propargylées

11,5 mmoles d'azido-aryle sont solubilisés dans du THF (40 mL) puis des fibres de pâte à papier propargylées (1 g) sont ajoutée. Ensuite, le sulfate de cuivre pentahydraté (0,05 éq., 0,29 mmol) et l'ascorbate de sodium (0,1 éq., 0,58 mmol) dissous dans un minimum d'eau sont introduits. Après 72 heures à température ambiante et sous agitation, les fibres modifiées sont lavées avec du THF (2 x 50 mL), de l'eau (2 x 50 mL) et de l'éthanol (2 x 50 mL), puis séchées à 60 ° C.

#### PK-Aryltriazone :



$R' = \text{H}$ : Rendement massique = 120%.

IR ( $\text{cm}^{-1}$ ): 3334 (Alcool), 1511, 810 et 774 (Triazole).

XPS (eV): 531,31 (O1s: 35,65%), 285,81 (C1s: 59,55%), 399,31(N1s: 4,5%); DS= 0,2.

$R' = \text{OCH}_3$ : Rendement massique = 121%.

IR ( $\text{cm}^{-1}$ ) 3339 (Alcool), 1518, 832 et 762 (Triazole).

XPS (eV): 531,21 (O1s: 36,05%), 286,82 (C1s: 59,65), 399,51(N1s: 4,4%); DS= 0,2.

Analyse élémentaire: m= 1,549 mg, N : 5,58 % ; C : 52,96 % ; H : 5,59 % , taux de greffage = 1,4 mmol/g.

$R' = \text{COCH}_3$  : Rendement massique = 120,4%.

IR ( $\text{cm}^{-1}$ ): 3338 (Alcool), 1517, 840 et 769 (Triazole), 1680 et 1266 ( $\text{COCH}_3$ ).

XPS (eV): 531,00 (O1s: 35,85%), 285,01 (C1s: 59,85%), 399,31(N1s: 4,3%); DS= 0,2.

Analyse élémentaire: m= 1,31 mg, N : 5,38 % ; C : 63,19 % ; H : 5,48 % , taux de greffage = 1,3 mmol/g.

***R'*=COOEt** : Rendement massique = 120,3%.

IR (cm<sup>-1</sup>) : 3337 (Alcool), 1518, 857 et 767 (Triazole), 1712 et 1278 (COOEt).

XPS (eV): 532,31 (O1s: 35,85%), 285,81 (C1s: 59,85%), 399,21(N1s: 4,3%); DS= 0,2.

Analyse élémentaire: m= 1,918 mg, N : 5,1 % ; C : 47,04 % ; H : 5,72%, taux de greffage = 1,3 mmol/g

***R'*=Cl** : Rendement massique = 120%.

IR (cm<sup>-1</sup>) : 3335 (Alcool), 1520, 850 et 760 (Triazole).

XPS (eV): 531,11 (O1s: 36,4%), 285,31 (C1s: 59,4%), 399,11(N1s: 4,2%); DS= 0,2.

***R'*=OH**: Rendement massique = 120 %.

IR (cm<sup>-1</sup>): 3334 (Alcool), 1520, 836 et 757 (Triazole);

XPS (eV): 531,00 (O1s: 32,9%), 285,01 (C1s: 63,2%), 399,11 (N1s: 4,0%); DS= 0,2.

***R'*=CH<sub>2</sub>OH** : Rendement massique = 120.5%.

IR (cm<sup>-1</sup>): 3334 (Alcool), 1520, 811 et 760 (Triazole), 1234 (CH<sub>2</sub>OH).

XPS (eV): 531,20 (O1s: 36,06%), 285,00 (C1s: 58,9), 399,00 (N1s: 4,5%); DS= 0,2.

Analyse élémentaire: m= 1,564 mg, N : 5,79 % ; C : 54,32 % ; H : 5,45 %, taux de greffage = 1,4 mmol/g

***R'*=CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>OH**: Rendement massique = 120 %.

IR (cm<sup>-1</sup>): 3335 (Alcool), 1519, 818 et 757 (Triazole), 1234 (CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>OH).

XPS (eV): 531,02 (O1s: 36,4%), 285,10 (C1s: 59,4), 399,00 (N1s: 4,2%); DS= 0,2.

Analyse élémentaire: m= 1,489 mg, N : 5,5 % ; C : 55,20 % ; H : 5,84 %, taux de greffage = 1,3 mmol/g

### **PTM-Aryltriazole :**

***R'*=OCH<sub>3</sub>**: Rendement massique = 117%%.

IR (cm<sup>-1</sup>) 3331 (Alcool), 1512, 828 et 765 (Triazole), 1256 (OCH<sub>3</sub>)

Analyses élémentaire: : m= 1,306 mg, N : 6,49 % ; C : 62,97 % ; H : 5,63 %, taux de greffage = 1,6 mmol/g

***R'*=COCH<sub>3</sub>** : Rendement massique = 115%.

IR (cm<sup>-1</sup>): 3330 (Alcool), 1512, 830 et 768 (Triazole), 1680 et 1250 (COCH<sub>3</sub>).

Analyses élémentaires : m= 1,387 mg, N : 6,56 % ; C : 59,99 % ; H : 5,47 %, taux de greffage = 1,6 mmol/g

***R'*=COOEt** : Rendement massique = 117%.

IR (cm<sup>-1</sup>) : 3330 (Alcool), 1518, 854 et 772 (Triazole), 1720 et 1608 (COOEt).

Analyses élémentaires : m= 1,389 mg, N: 7,04 % ; C: 59,99 % ; H: 5,47 %, taux de greffage = 1,7 mmol/g

***R'*=CH<sub>2</sub>OH** : Rendement massique = 118%.

IR (cm<sup>-1</sup>): 3332 (Alcool), 1513, 828 et 764 (Triazole), 1228 (CH<sub>2</sub>OH)

Analyses élémentaires : m= 1,333 mg, N: 7,03 % ; C: 62,05 % ; H: 5,55 %, taux de greffage = 1,7 mmol/g

***R'*=CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>OH**: Rendement massique = 117,5 %.

IR (cm<sup>-1</sup>): 3332 (Alcool), 1517, 812 et 772 (Triazole), 1232 (CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>OH).

Analyses élémentaires : m= 1,72 mg, N: 6,4 % ; C: 50,23 % ; H: 5,75 %, taux de greffage = 1,5 mmol/g



## PUBLICATIONS SCIENTIFIQUES

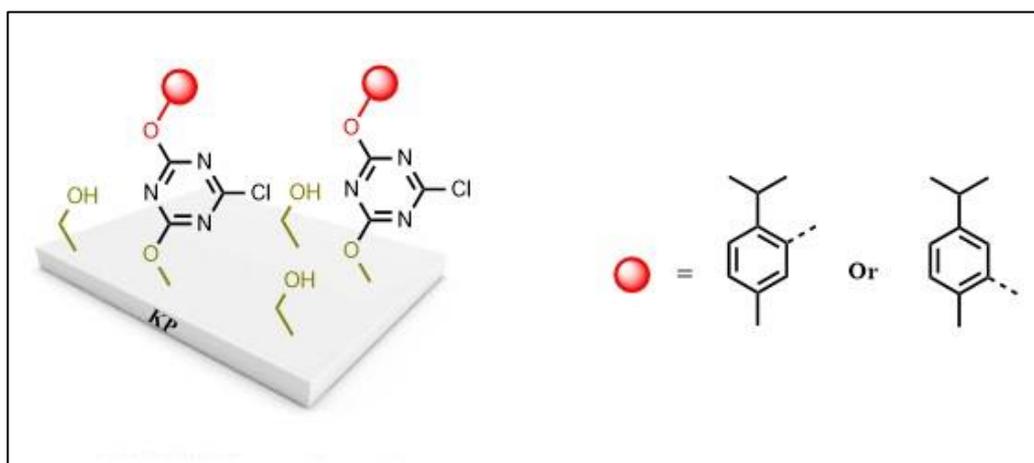
### Article 1:

### **Synthesis and antibacterial properties of thymol and carvacrol grafted onto lignocellulosic kraft fibers**

**Zineb Khaldi**, Tan-Sothéa Ouk and Rachida Zerrouki

*Journal of Bioactive and Compatible Polymers* **2018**, DOI: 10.1177/0883911518783227

Bacterial infections and surface contaminations are worrying public health issues. It becomes urgent to find solutions. One of the ways to limit bacterial proliferation is to develop new antimicrobial materials. The phenolic compounds of essential oils like thymol and carvacrol, are attractive antibacterial candidates, which have gained great popularity in the food, cosmetic, and pharmaceutical industries. This work describes the elaboration of bioinspired antibacterial materials. Thymol and carvacrol are linked to Kraft pulp fibers, via triazine link. This novel material has been investigated for its antibacterial properties against *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus*. The developed materials show very interesting antibacterial activity. The grafting of thymol and carvacrol by covalent bond allows to avoid the problem of their release and, thus, could maintain the antibacterial properties of support.



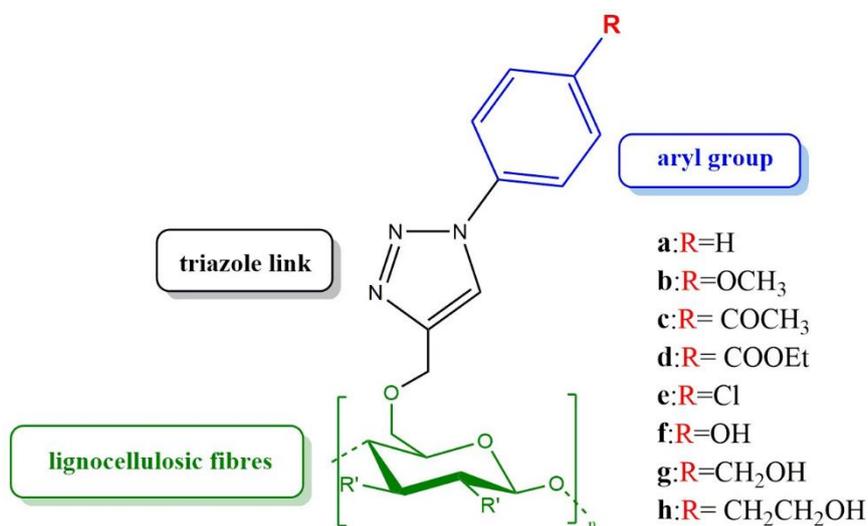
## Article 2:

### **Synthesis, characterization and antibacterial activities of a new lignocellulosic material carrying aryl triazole moiety**

**KHALDI Zineb**, BESSE Claire, NZAMBE TA KEKI Jean Kerim, OUK Tan-Sothéa, GLOAGUEN Vincent, ZERROUKI Rachida

*Polymers for Advanced Technologies*, 2018, sous presse.

Contamination of surfaces by bacteria and the emergence of antimicrobial resistant strains are very worrying issues. One of ways to limit the bacterial proliferation is to develop antimicrobial materials. We reported herein, the development of new antimicrobial support by grafting different aryl azide onto propargylated Kraft Pulp, using the Copper (I)-Catalyzed Alkyne-Azide 1,3-dipolar Cycloaddition (CuAAC) reaction, forming 1,2,3-triazole aryl. These novel materials have been investigated for their antibacterial properties against *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus*. The developed materials acquire its antimicrobial potential only after grafting via triazole link. Depending on the substituent of the grafted aryl, the elaborated materials showed a bacteriostatic or even bactericidal activity.



### Article 3:

## **Synthesis, Characterization and Biological Evaluation of Triclosan Grafted onto cellulosic Fibers**

**Zineb KHALDI**, Jean Kerim Nzambe Takeki, Claire BESSE, Tan-sothea OUK, Amel HADJ-BOUAZZA, Rachida Zerrouki

*Fibers and Polymers*, 19(9), 2018, 1820-1827.

With the increased risk of disease transmissions and cross-infection caused by microorganisms, the control of microbial infections becomes a very important issue in modern societies. Moreover, with the emergence of antibio-resistant bacterial strains, it is necessary to control the bacterial growth. One of ways to limit the bacterial proliferation is to develop antimicrobial surfaces. The present work describes the synthesis process of a direct linking of propargylded Triclosan to a modified Kraft Pulp. Propargylded Triclosan, and azidated Kraft Pulp were linked in the presence of Cu(I) catalyst, a type of Huisgen's 1,3-dipolar azide-alkyne cycloaddition reaction, leading to the formation of Triclosan linked to kraft Pulp fibers. The modified Kraft Pulp fibers are characterized by Fourier transform infrared spectroscopy (FTIR) and X-ray photoelectron spectroscopy (XPS). This novel material has been investigated for its antibacterial properties against *E. coli*, *S. aureus*, *B. cereus* and *P. aeruginosa*. The developed material showed an important antibacterial activity. Although Triclosan is covalently grafted onto Kraft Pulp, its antibacterial properties are maintained.

