



HAL
open science

L'élaboration des nouveaux (Bio)-matériaux et leurs applications dans le domaine médical

Zaineb Bouaziz

► **To cite this version:**

Zaineb Bouaziz. L'élaboration des nouveaux (Bio)-matériaux et leurs applications dans le domaine médical. Autre. Université Montpellier; Université de Carthage (Tunisie), 2018. Français. NNT : 2018MONTTS115 . tel-02180552

HAL Id: tel-02180552

<https://theses.hal.science/tel-02180552>

Submitted on 11 Jul 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.

THÈSE POUR OBTENIR LE GRADE DE DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ DE MONTPELLIER

En Chimie et Physico-Chimie des Matériaux

École doctorale SCIENCES CHIMIQUES BALARD (SCB) – ED 459

Unité de recherche Institut Européen des Membranes IEM
En partenariat international avec Faculté des sciences de Bizerte, TUNISIE

Titre de la thèse

L'élaboration des nouveaux (Bio)- matériaux et leurs applications dans le domaine médical.

Présentée par Zaineb BOUAZIZ
Le 17 Juillet 2018

Sous la direction de Sébastien BALME, Abdesslem BEN HAJ AMARA
et Laurence SOUSSAN

Devant le jury composé de

Maguy JABER, Professeur, Université de Sorbonne
Hervé QUIQUAMPOIX, Directeur de recherche, INRA
Sophie TINGRY, Directeur de recherche, CNRS
Abdesslem BEN HAJ AMARA, Professeur, Université de Carthage
Sébastien BALME, Maître de conférences, Université de Montpellier
Laurence SOUSSAN, Maître de conférences, ENSCM

Rapporteur
Rapporteur
Examineur
Directeur de thèse
Invité
Invitée



UNIVERSITÉ
DE MONTPELLIER

Je Dédie Ce Travail

A Mes Chers Parents

A Mes Sœurs Et Mes Frères

A Tous Ceux Qui Me Sont Chers

A Ceux Qui M'ont Tout Donne Sans Rien En Retour

A Mon PAPA Mon Héro

Zaineb

Remerciement

Ce travail a été effectué dans le cadre d'une collaboration franco-tunisienne, que je tiens à remercier pour ses aides financiers.

Je tiens à remercier dans un premier temps mon directeur de thèse, Monsieur **Ben Haj Amara Abdesslem**; professeur à la faculté des sciences de Bizerte; qui m'a offert cette opportunité de travailler au sein de son groupe de recherche. Je lui dois un grand respect. Son encouragement et sa patience à mon égard ont été un appui moral pour continuer ce travail.

Je tiens à remercier aussi mes encadrants, Monsieur **Sébastien Balme** ; maitre de conférence à l'Université de Montpellier ; et Madame **Laurence Soussan** ; maitre de conférences à l'Université de Montpellier, de m'avoir accueilli au sein de l'Institut Européenne des Membranes et pour l'expérience enrichissante et pleine d'intérêt qu'ils m'ont fait vivre durant mes années de thèse au sein de l'Institut Européen des Membranes (IEM), pour m'avoir accordé toute leur confiance; et pour le temps qu'il m'ont consacré tout au long de cette période, sachant répondre à toute mes interrogations, sa patience à mon égard et sans oublier leur participation au cheminement de ce travail.

Je désire également exprimer ma gratitude à: Monsieur **Hervé Quiquampoix**, Directeur de recherche, INRA, à Madame **Maguy Jaber**, Professeur, Université de Sorbonne et à Madame **Sophie Tingry**, Directeur de recherche, CNRS, pour m'avoir fait l'honneur de juger et d'évaluer ce travail.

Je tiens également à remercier les étudiants et les post-docs avec qui j'ai partagé de bons moments pendant mes trois ans de thèse: Maya, Tianji, Azariel, Sakthi, digo, Nicoletta, slim et Md amine.

Je remercie évidemment ma famille, plus particulièrement mes parents qui m'ont encouragé et qui étaient d'accord pour mon départ aussi loin d'eux. Leur amour me donne chaque jour une envie d'avancer et d'aller plus loin. Je remercie également mes frères, mes sœurs et ma nombreuse et merveilleuse famille.

Table des matières

Table des matières

<i>Liste des abréviations</i>	9
<i>Introduction générale</i>	10
<i>Chapitre 1 : Partie bibliographique</i>	15
<i>I. Contexte des antibiotiques dans les matériaux</i>	16
<i>I.1. Intérêt environnemental</i>	16
<i>I.2. Intérêt médical</i>	16
<i>II. Les hydroxydes doubles Lamellaires</i>	17
<i>II.1 Définition et structure d'un HDL</i>	17
<i>II.2 Propriétés des HDL</i>	19
<i>II.3 HDL : Matrice hôte</i>	20
<i>III. Les antibiotiques</i>	25
<i>III.1 Différentes classes d'antibiotiques</i>	25
<i>III.2 Famille des cyclines</i>	28
<i>III.2.1. Propriétés, stabilité et composition chimique de TCH et OXY</i>	28
<i>III.2.2. Mécanisme d'action et spectre d'activité</i>	30
<i>III.2.3 L'immobilisation de TCH et OXY dans les matériaux lamellaires (argiles et HDL)</i>	30
<i>III.3. Antibiotique polypeptidique : la « nisine »</i>	31
<i>III.3.1. Structure et mode d'action de la nisine</i>	33
<i>III.3.2 Propriétés de la nisine</i>	34
<i>III.3.3 L'immobilisation de la nisine dans les différents matériaux lamellaires</i>	35
<i>III.4. Antibiotique enzymatique : le Lysozyme</i>	36
<i>III.4.1. Généralités sur les enzymes</i>	36
<i>III.4.2. Propriétés et structure du lysozyme</i>	37
<i>III.4.3. L'immobilisation du lysozyme dans les argiles et les HDL</i>	38
<i>IV. Conclusion</i>	41
<i>V. Références</i>	42
<i>Chapitre 2 : Matériels et méthodes</i>	48
<i>I. Produits chimiques utilisés</i>	49
<i>II. Techniques de caractérisations physico-chimiques</i>	50
<i>II.1. Diffraction des rayons X (DRX)</i>	50
<i>II.2. Spectroscopie infrarouge (IR)</i>	52
<i>II.3. Spectrophotométrie UV-visible</i>	54

II.4. Fluorescence résolue au cours du temps	56
II.5. Microscopie électronique à balayage (MEB).....	57
II.6. Microscopie électronique à transmission (MET)	58
II.7. Microscope à force atomique AFM	58
II.8. Diffusion dynamique de la lumière DLS.....	59
III. Synthèse des phases HDL de référence	60
III.1. Synthèse des HDL par coprécipitation	60
III.2. Synthèse des HDL par décomposition thermique de l'urée	63
III.3. Synthèse des différents matériaux HDL-antibiotiques	64
III.3.1 HDL-nisine.....	65
III.3.2 HDL-Lysozyme	65
III.3.3 HDL-TCH et HDL-OXY	65
IV. Adsorption/désorption	67
IV.1. Cinétiques d'adsorption.....	67
IV.2. Désorption	68
V. Etude de l'activité antibactérienne des matériaux HDL-antibiotiques	69
V.1. Germes testés.....	69
V.2. Méthodes utilisées	69
V.2.1. Culture bactérienne	70
V.2.2. Test bactéricide en voie solide (nisine).....	72
V.2.3. Test bactériostatique en voie solide (TCH et OXY).....	72
V.2.4. Test bactéricide en voie liquide (lysozyme)	73
V.3. Test t.Student	75
VI. Références	76
Chapitre 3 : Etude de l'adsorption et de l'activité antibactérienne de la tétracycline (TCH) et oxytétracycline (OXY) dans les hydroxydes doubles lamellaires.	77
I. Introduction	78
II. Article scientifique: Dual role of layered double hydroxide nanocomposites on antibacterial activity and degradation of tetracycline and oxytetracycline	79
III. Referneces	101
Chapitre 4 : Etude de l'adsorption de la nisine par les différentes phases HDL : Contrôle de libération et évaluation de l'activité antibactérienne.	103
I. Introduction:	104
II. Article scientifique: Adsorption of nisin into layered double hydroxide nanohybrids and in-vitro controlled release	105

III. Partie complémentaire : Etude de l'adsorption de la nisine dans différentes phases HDL : évaluation de l'activité antibactérienne.....	134
IV. Conclusion.....	148
V. Références	149
Chapitre 5 : Préparation et caractérisation des phases HDL — lysozyme	153
I. Introduction.....	154
II. Article scientifique: Structure and antibacterial activity relationships of native and amyloid fibril lysozyme loaded on layered double hydroxide	155
III. Partie complémentaire: Evaluation de l'effet de la matrice HDL sur l'activité antibactérienne du matériau	176
IV. Conclusion.....	181
V. Références	182
Conclusion générale.....	185

Liste des abréviations

Aⁿ⁻: Anion intercalé

CEC: Capacité d'échange cationique

Cea : Capacité d'échange anionique

DRX: diffraction des rayons X

E.coli: *Escherichia coli*

FTIR: Spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier

HDL: Hydroxyde Double Lamellaire

IEP: Point isoélectrique

LB: Luria Broth Miller

LYS: lysozyme

M^{II}: Cation métallique divalent

M^{III}: Cation métallique trivalent

Mt: Montmorillonite

MEB: Microscope Electronique à Balayage

MET: Microscopie Electronique à Transmission

M.luteus: *Micrococcus luteus*

Nis: Nisine

OXY: Oxytetracycline

PBS: Tampon Phosphate Saline

S.epidermidis: *Staphylococcus epidermidis*

TCH: Tetracycline

UV-vis: Spectrophotométrie UV-visible

Introduction générale

Les matériaux combinant une espèce (bio)-organique et une espèce inorganique constituent une nouvelle classe de matériaux à l'interface entre la biologie et la science des matériaux. Dans ce domaine, le confinement des antibiotiques dans des matrices inorganiques est un axe de recherche fortement développé. En effet, les antibiotiques sont très utilisés dans le domaine médical. Ils présentent des problèmes d'administration dû à leurs faibles solubilités et à leurs effets secondaires sur la santé. Pour cette raison, plusieurs matrices ont été testées comme un support afin de remédier ces inconvénients. L'élaboration de ces matériaux doit répondre à un cahier de charge sévère imposant en particulier, la biocompatibilité, une bonne accessibilité du substrat bactérien, la conservation de l'activité antibactérienne au cours du temps ainsi qu'une stabilité opérationnelle et au stockage.

Plusieurs matériaux ont été utilisés pour confiner des antibiotiques. Par comparaison à d'autres matériaux tels que les polymères, les matrices inorganiques permettent de protéger les antibiotiques sensibles à la dégradation. Dans ce travail, notre intérêt s'est porté sur des matrices inorganiques de type hydroxydes doubles lamellaires (HDL), nommée aussi argiles anioniques. Le choix des HDL repose, d'une part sur leur caractère bidimensionnel et d'autre part, sur leur grande diversité. De plus, les HDL présentent plusieurs propriétés intéressantes telles que la facilité de synthèse, des propriétés de gonflement, une bonne stabilité chimique et thermique et la possibilité d'intercaler différents types d'anions (inorganiques, organiques, et de type biomolécules). Enfin, ils sont aussi biocompatibles.

Cette thèse s'intéresse à la synthèse de nouveaux matériaux HDL-antibiotiques pour contrôler et protéger l'activité antibactérienne par le confinement. Nos objectifs ont été (i) d'établir une corrélation entre la localisation des antibiotiques dans les matrices HDL et leur activité antibactérienne, mais aussi (ii) de définir la matrice la plus adéquate pour protéger les antibiotiques de la dégradation thermique et/ou photonique.

Dans ce travail nous avons choisi trois types d'antibiotiques, (i) cyclines, (ii) polypeptide et (iii) enzyme, pour leurs complémentarités de mode d'action.

Tout au long de ce travail nous nous sommes efforcés de répondre à deux questions.

1. Quelle est l'influence de la localisation de l'antibiotique sur son activité antibactérienne ?

Pour répondre à cette première question, les hypothèses de travail sont différentes en fonction du type d'antibiotique. Lysozyme est une protéine dure, ce qui limite la dénaturation de son site actif lorsqu'il s'adsorbe. Son adsorption sur des surfaces solides est généralement considérée comme irréversible et son activité antibactérienne dépend de l'intégrité et de l'accessibilité du site enzymatique. La localisation du lysozyme dans le matériau influe sur l'accessibilité de son site actif. S'il est confiné dans l'espace interfeuille du matériau, le site ne sera pas accessible et son activité antibactérienne sera donc limitée. S'il est localisé à la surface externe des grains HDL, son activité antibactérienne dépendra alors de l'orientation de la protéine et de l'accessibilité du site actif. Pour les antibiotiques cyclines et la nisine, nous devons vérifier si l'adsorption est réversible. Si cela est le cas, le relargage de l'antibiotique dans le milieu sera permis et la localisation de l'antibiotique dans le matériau aura un effet sur sa cinétique de désorption et sur sa disponibilité.

2. La matrice HDL pourrait-elle protéger les antibiotiques de la dégradation thermique et/ou photonique ?

Les antibiotiques cyclines et la nisine sont en effet très sensibles à la lumière et/ou à la température. Leur intercalation nous permettrait de limiter leur dégradation. La protection de l'antibiotique dépend de sa localisation et s'il est confiné à l'intérieur de l'espace interfeuille du matériau, il devrait être plus protégé que s'il était localisé à la surface des grains.

Pour apporter des éléments de réponses à nos questions, ce manuscrit est composé de cinq chapitres. Le premier chapitre, propose une étude bibliographique concernant les classes d'antibiotiques utilisées en présentant leurs structures et leurs mécanismes d'actions. Il introduit le support inorganique utilisé tout au long de ce travail « les hydroxydes doubles lamellaires » en indiquant leur structure et leur utilisation comme une matrice hôte pour les antibiotiques. Le deuxième chapitre est dédié à la description des méthodes et techniques expérimentales utilisées au cours de ce travail. Dans un premier temps seront décrites, les méthodes de synthèse des phases HDL, le confinement des antibiotiques ainsi que leurs caractérisations. Ensuite, les techniques de microbiologie seront introduites. Dans le troisième chapitre, nous décrirons deux méthodes pour charger les phases HDL avec deux antibiotiques de la famille des cyclines : la tétracycline (TCH) et l'oxytétracycline (OXY). L'impact de l'irradiation UV ou/et du stockage à différentes températures (30, 60 et 120 ° C) sur leurs activités antibactériennes sera évalué. Les résultats seront présentés sous la forme d'un article scientifique « Dual role of layered double hydroxide nanocomposites on antibacterial activity and degradation of tetracycline and oxytetracycline ». Le quatrième chapitre s'intéresse à l'immobilisation de la nisine dans des phases HDL. Les effets du rapport molaire, de la matrice, de l'anion et de la morphologie ont été étudiés. Une étude de la libération de la nisine a été effectuée pour la matrice $Zn_2Al-Cl/nisine$. Ces résultats seront présentés sous la forme d'un article scientifique « Adsorption of nisin into layered double hydroxide nanohybrids and in-vitro controlled release ». Ensuite, une analyse de l'activité antibactérienne a été faite pour différente matrice HDL/nisine de type $M^{2+}Al-Cl/nisine$ ($M^{2+} = Zn, Mg, Ni, \text{ et } Mn$) pour étudier leur effet sur la stabilité de la nisine dans les phases HDL. Enfin, le cinquième chapitre porte sur l'immobilisation du lysozyme et d'agrégats de lysozyme dans la phase HDL de type Zn_2Al-NO_3 . Nous avons notamment effectué une étude par fluorescence résolue dans le temps du site enzymatique pour évaluer la relation structure/ propriétés antibactériennes du

site actif. Ces résultats seront présentés sous la forme d'un article scientifique intitulé «Structure and antibacterial activity relationships of native and amyloid fibril lysozyme loaded on layered double hydroxide ». Ensuite, une étude de l'effet de la matrice sur la localisation et l'activité antibactérienne du lysozyme sera présentée.

Enfin, nous terminerons ce travail par une conclusion générale qui rassemblera une synthèse de tous les résultats et nous formulerons quelques perspectives concernant la suite des travaux.

Chapitre 1 : Partie bibliographique

I. Contexte des antibiotiques dans les matériaux

L'élaboration de nouveaux matériaux pour la séquestration d'agents antibiotiques présente des intérêts pour différentes applications [1, 2] telles que la médecine [3, 4], l'industrie pharmaceutique [1], l'industrie alimentaire [5] ou dans le domaine environnemental [6, 7].

I.1. Intérêt environnemental

En raison de leur utilisation généralisée par l'être humain et par les animaux [11, 12], les antibiotiques se retrouvent dans les déchets liquides, les eaux usées, de surface, souterraines et l'eau potable [8, 9]. A cause de leur grande stabilité, ils ne peuvent pas être totalement dégradés ou éliminés par les méthodes de traitement des eaux usées [7,10,11]. Leur utilisation systématique a également soulevé des inquiétudes concernant l'augmentation de la résistance des micro-organismes [12]. Des études ont montré que la tétracycline, oxytétracycline, nitroimidazoles, et amoxicilline sont parmi les antibiotiques les plus présents dans les milieux aquatiques [10,13,14]. Il est donc nécessaire de mettre au point des stratégies efficaces et rentables pour les éliminer. Une grande variété de matériaux ont été utilisés pour dégrader ou adsorber les antibiotiques [15], tels que les argiles [10, 16-19], les matériaux à base de carbone poreux [20], les nanoparticules de dioxyde de titane TiO_2 [14], les nano feuillets de graphène [21], le charbon actif [22], et les polymères [15, 22, 23].

I.2.Intérêt médical

De nombreuses études ont montré que la libération de l'antibiotique dépend fortement de la surface de l'échantillon et de son pH [24, 25].

Ces matériaux ont la capacité, en fonction de leurs propriétés, de changer la pharmacocinétique des antibiotiques (administration, distribution, métabolisation ou

élimination dans l'organisme). Ces systèmes de transport permettent d'améliorer la solubilité de l'antibiotique et/ou fournissent une administration plus ciblée qui permet d'avoir une thérapie efficace en minimisant les effets secondaires [26-30]. Un grand nombre de matériaux ont été considérés pour des applications de délivrance de médicaments tels que les nanotubes de titane [31, 32], les silices mésoporeuses ordonnées (SMO) qui sont des matrices intéressantes pour l'administration des antibiotiques car elles permettent une libération contrôlée de médicament « *in-situ* » [33-38] et les argiles de type montmorillonite qui permettent une libération plus stable [25, 39]. En particulier, les argiles de type hydroxydes doubles lamellaires HDL ont permis d'améliorer l'activité antimicrobienne pour certains antibiotiques [29, 30].

Dans ce travail nous nous sommes intéressés à l'étude de confinement des antibiotiques dans les matériaux lamellaires et plus précisément les hydroxydes doubles lamellaires (argiles anioniques).

II. Les hydroxydes doubles Lamellaires

II.1 Définition et structure d'un HDL

Les hydroxydes doubles lamellaires (HDL), sont également connus comme argiles anioniques. Leur structure dérive de celle du brucite $Mg(OH)_2$ [40]. Elles sont constituées d'un empilement de feuillets plans construits par la superposition d'octaèdres $M(OH)_6$ où, M peut être à la fois un cation métallique divalent ou trivalent. Dans chaque feuillet, une fraction de l'élément métallique divalent est substituée par un métal trivalent. Cela génère un excédent de charges positives, et la compensation de ce déficit se fait par un groupement d'espèces anioniques hydratées intercalées entre les feuillets. La Figure 1.1, présente la structure détaillée des HDL. Leur formule abrégée est la suivante.



où, M^{II} et M^{III} sont les cations divalents et trivalents respectivement, A l'anion intercalé et R le rapport $M^{\text{II}}/M^{\text{III}}$ (R est compris entre 1 jusqu'à 4).

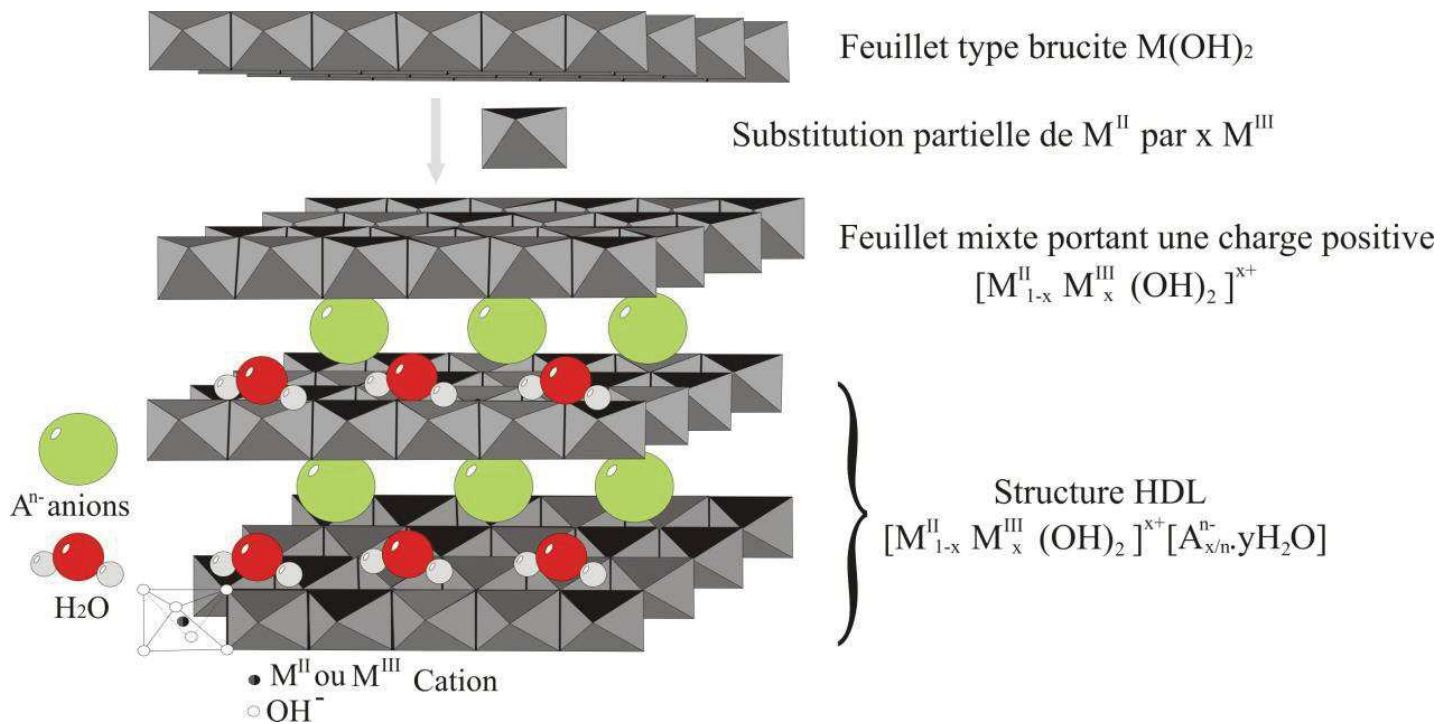


Figure 1.1: Représentation schématique d'une phase de type HDL.

Toutes les combinaisons possibles entre les cations divalents et trivalents sont présentées dans le tableau ci-après de la Figure 1.2.

H	$[M_{1-x}^{2+} M_x^{3+} (OH)_2]^{x+}$																He					
Li	Be	M^{2+}										M^{3+}					B	C	N	O	F	Ne
Na	Mg	M^{2+}										M^{3+}					Al	Si	P	S	Cl	Ar
K	Ca	Sc	Ti	V	Cr	Mn	Fe	Co	Ni	Cu	Zn	Ga	Ge	As	Se	Br	Kr					
Rb	Sr	Y	Zr	Nb	Mo	Tc	Ru	Rh	Pd	Ag	Cd	In	Sn	Sb	Te	I	Xe					
Cs	Ba	La	Hf	Ta	W	Re	Os	Ir	Pt	Au	Hg	Tl	Pb	Bi	Po	At	Rn					
Fr	Ra	Ac	Ce	Pr	Nd	Pm	Sm	Eu	Gd	Tb	Dy	Ho	Er	Tm	Yb	Lu						
			Th	Pa	U	Np	Pu	Am	Cm	Bk	Cf	Es	Fm	Md	No	Lr						

Figure 1.2: Combinaisons possibles entre cations métalliques pour la constitution du feuillet HDL.

Grâce à leur structure bidimensionnelle, diverses espèces anioniques peuvent être intercalées dans les phases hydroxydes doubles lamellaires synthétisées. Généralement, les familles d'anions concernées sont les suivantes : anions organiques (Cl^- , CO_3^{2-} , NO_3^-), des complexes anioniques ($[Fe(CN)_6]^{4-}$, $[Co(CN)_6]^{4-}$), des polyoxométalates ($Cr_2O_7^{2-}$, $Mo_7O_{24}^{6-}$, $W_{12}O_{40}^{3-}$), des anions organiques ($C_6H_5SO_3^-$, CH_3COO^-) et même des polymères (polyacrylate $[-CH_2-CH(COONa)]_n$ et polystyrène sulfonate $[R-SO_2O^-]_n$).

II.2 Propriétés des HDL

Les HDL présentent des propriétés intéressantes liées essentiellement à leurs structures, leurs morphologies et à la taille des particules. Ces matériaux sont très faciles à synthétiser et peu coûteux [29]. Ils présentent une stabilité chimique et thermique très élevée [29], une diversité des cations divalents et trivalents et la capacité d'intercaler différents types d'anions (inorganiques, organiques, et biomolécules). De manière générale, les HDL permettent une chimie d'intercalation très riche vis-à-vis des molécules inorganiques organiques, et des

biomolécules. Ils permettent d'élaborer des matériaux de propriétés physico-chimiques modulables pour une grande variété d'applications [29,30,41-43].

Les HDL ont une capacité d'échange anionique aussi importante que les argiles cationiques. De ce fait, il est possible de remplacer l'anion intercalé par un autre. Ils possèdent une surface spécifique importante de l'ordre de $50 - 80 \text{ m}^2 \text{ g}^{-1}$ qui peut atteindre $200 \text{ m}^2 \text{ g}^{-1}$ pour les phases calcinés.

II.3 HDL : Matrice hôte

La préparation des matériaux HDL-antibiotiques peut se faire par différentes méthodes d'adsorption telles que, l'échange anionique [44] ou la coprécipitation [45] *in-situ*. La méthode d'échange ionique, est la plus simple et la plus utilisée pour charger des HDL. Elle assure l'intégrité chimique et/ou biologique de l'espèce invitée. Pour cela, il est nécessaire de définir les conditions optimales, comme le temps de contact, le pH, la force ionique, ect Il existe plusieurs modèles cinétiques pour décrire le processus d'adsorption. Ce dernier est fortement influencé par plusieurs paramètres reliés à l'état du solide, et aux conditions physicochimiques sous lesquelles l'adsorption est dirigée. Les modèles utilisés dans le cas des HDL sont le pseudo premier ordre (Eq 1.1) et le pseudo deuxième ordre [46] (Eq 1.2).

$$\log(\Gamma_e - \Gamma_t) = \log\Gamma_e - \left(\frac{k_1}{2.303}\right)t \quad (\text{Eq 1.1})$$

$$\frac{t}{\Gamma_t} = \left(\frac{1}{k_2\Gamma_e^2}\right) + \left(\frac{1}{\Gamma_e}\right)t \quad (\text{Eq 1.2})$$

où : Γ_e (mg mg^{-1}) est la concentration interfaciale à l'équilibre, Γ_t (mg mg^{-1}) est la concentration interfaciale à un instant t , et k_1 et k_2 sont les constantes d'adsorption.

Le modèle de pseudo premier ordre (**Eq 1.1**) suppose que le phénomène d'adsorption entre la phase liquide et la phase solide peut être considéré comme un processus réversible. Ce modèle est représenté en traçant $\log(\Gamma_e - \Gamma_t)$ en fonction du temps qui devrait être linéaire ; k_1 et Γ_e sont déterminés à partir la pente et de l'ordonnée à l'origine respectivement. Le modèle de pseudo deuxième ordre (**Eq 1.2**) suppose que la capacité d'adsorption est proportionnelle au nombre de sites actifs occupés par l'adsorbat. Si le modèle est approprié aux données, la courbe de $\frac{t}{\Gamma_t}$ en fonction du temps est linéaire ; k_2 et Γ_e étant obtenus à partir de l'ordonnée à l'origine et de la pente respectivement.

Les isothermes d'adsorption permettent d'analyser le processus d'adsorption. La concentration interfaciale (Γ_e) est mesurée par les méthodes de déplétion de surnageant donnée par l'équation (**Eq 1.3**). Typiquement, elle est déduite à partir de la différence entre la concentration massique initiale de la molécule en solution (C_0), et celle après adsorption (C_e).

$$\Gamma_e = (C_0 - C_e) \frac{V}{m} \quad \text{(Eq 1.3)}$$

avec V (mL) le volume de la suspension et m (mg) la masse de la phase HDL.

Il existe une classification des isothermes d'adsorption établie par Giles [47] qui traduit la nature et l'intensité des interactions adsorbat/adsorbant. On distingue quatre grands types d'isothermes (**Figure 1.3**): **S** (Sigmoide), **L** (Langmuir), **H** (Haute affinité) et **C** (Partition Constante). Les adsorptions de molécules ou macromolécules organiques sur les argiles relèvent généralement de la classe L et présentent classiquement soit un profil de Langmuir, soit un profil de Freundlich. Un comportement de type Langmuir met en jeu des sites d'adsorption indépendants alors que celui de Freundlich tient compte d'un certain degré de compétition entre les interactions adsorbat/adsorbant et adsorbat/adsorbat.

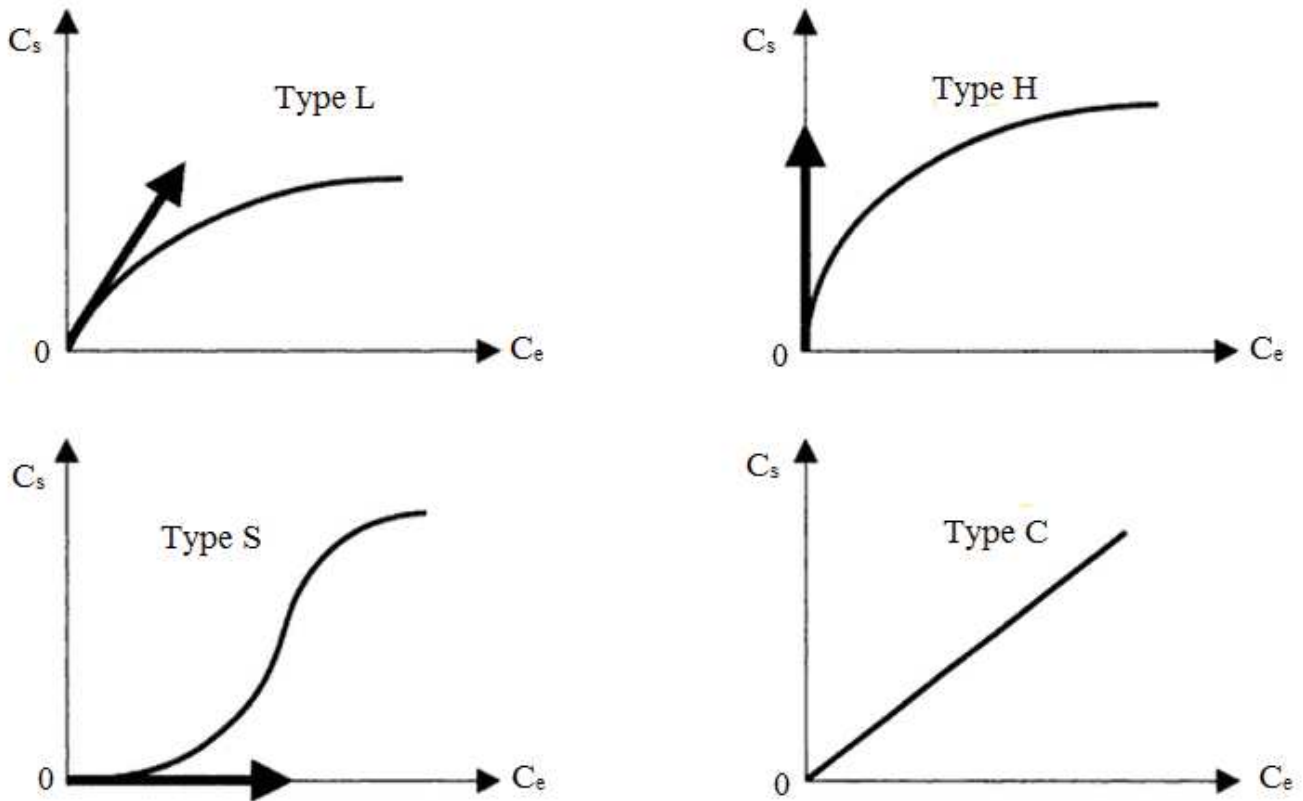


Figure 1.3: Les quatre classes d'isothermes d'adsorption proposées par Giles et al. 1960 [47].

➤ Modèle de Langmuir

Les réactions d'adsorption sur les HDL sont souvent décrites en utilisant le modèle d'adsorption de Langmuir [48]. Cette approche, est applicable pour décrire les phénomènes de physisorption relatifs aux isothermes de type L. Ce modèle fait intervenir une adsorption sur une seule couche d'adsorbant et suppose trois conditions :

- des sites d'adsorption énergétiquement équivalents,
- une seule molécule par site,
- aucune interaction entre les molécules adsorbées.

L'équation proposée pour décrire l'isotherme de Langmuir (Eq 1.4) [48] peut être linéarisée (Eq 1.5).

$$\Gamma_e = \frac{\Gamma_m k_L C_e}{1 + k_L C_e} \quad (\text{Eq 1.4})$$

$$\frac{C_e}{\Gamma_e} = \frac{C_t}{\Gamma_m} + \frac{1}{k_L \Gamma_m} \quad (\text{Eq 1.5})$$

où k_L est la constante de Langmuir et Γ_m le maximum de la concentration interfaciale.

➤ **Modèle de Freundlich**

Le modèle de Freundlich s'applique généralement lorsque les quantités adsorbées sont très faibles. Ce modèle empirique est basé sur la relation entre la concentration de composé adsorbé sur la phase solide Γ_e et la concentration de composé restant en solution C_e . Il s'exprime par la relation (Eq 1.6) et les paramètres caractéristiques d'adsorption sont alors déterminés respectivement à partir de la linéarisation de l'isotherme de Freundlich (Eq 1.7).

$$\Gamma_e = K_F C_e^{1/n} \quad (\text{Eq 1.6})$$

$$\log \Gamma_e = \log K_F + \frac{1}{n} * \log C_e \quad (\text{Eq 1.7})$$

où n et K_F sont les constantes de Freundlich avec $n < 1$.

Transfert des médicaments

Les hydroxydes doubles lamellaires présentent des propriétés adaptées à l'immobilisation de molécules biologiques ou d'intérêt biologique telles que les médicaments. Ces molécules peuvent être des vitamines [49, 50] (A, ou C) des agents anti-inflammatoires [51-53], des anti-cancéreux [54-58] et des antibiotiques [59-61].

Grâce à leur biocompatibilité et leur structure bidimensionnelle favorable à l'intercalation d'une large diversité de molécules organiques ou de macromolécules [29, 30], les HDL ont, en effet, été utilisés dans des formulations pharmaceutiques [29, 30]. Ils participent dans la conservation des molécules pharmaceutiques lors de leur stockage et dans le contrôle de leurs

libérations dans l'organisme. L'utilisation de ces matériaux permettraient une augmentation et une prolongation de l'efficacité du médicament [62, 63], une diminution des effets secondaires, une réduction de la fréquence d'administration et une diminution des dosages.

Le Tableau 1.1 regroupe des exemples d'antibiotiques immobilisés dans des phases HDL [30].

Tableau 1.1: Les différents antibiotiques immobilisés au sein des phases HDL.

Antibiotiques	Matrices HDL	Méthodes de préparation
Benzilpenicillin [60]	MgAl	Echange anionique
Benzaoate [60]	MgAl	Echange anionique
Gramicidine [64]	MgAl	Echange anionique
Tétracycline [65]	MgAl	Reconstruction*
Ampiciline [64]	MgAl	Echange anionique
Cefazolin [61]	ZnAl	Coprécipitation
Chloramphénicol [66, 67]	ZnAl	Coprécipitation
	MgAl	Reconstruction*

**Reconstruction* : Une des propriétés des HDL est de pouvoir se cristalliser et reprendre leur structure après calcination. Des auteurs ont parlé d' « effet mémoire » de la structure HDL. Cette méthode dite reconstruction après calcination, consiste à faire subir au matériau HDL un traitement thermique à une température suffisante de l'ordre de 450° C.

Dans ce travail nous avons étudié l'immobilisation de trois types d'antibiotiques dans différentes matrices HDL : les premiers antibiotiques appartiennent à la famille des cyclines (**tétracycline et oxytétracycline**), le second antibiotique est un antibiotique de type polypeptide (**la nisine**) et enfin le troisième est un antibiotique enzymatique (**le lysozyme**).

III. Les antibiotiques

Le mot antibiotique résulte de deux termes Grec « anti » : contre et « bois » : vie. Un antibiotique est une substance naturelle ou synthétique qui détruit ou bloque la croissance des bactéries. Le premier antibiotique « pénicilline » a été découverte en 1928 par Alexander Fleming. Les antibiotiques sont des molécules chimiques produites soit de façon naturelle par des micro-organismes (bactéries ou champignons), ou de façon synthétique (obtenus soit à partir de dérivés artificiels, soit en recréant des molécules primitivement extraites de micro-organismes). Il existe des antibiotiques bactéricides et des antibiotiques bactériostatiques :

- *Les antibiotiques bactéricides*, ont la capacité de tuer des bactéries. Les propriétés bactéricides varient d'une substance à une autre, en termes de spectre d'action, d'efficacité, et de durée d'actions.

- *Les antibiotiques bactériostatiques* inhibent la multiplication des bactéries sans les tuer. Ils interagissent sur : la synthèse des protéines bactériennes, la production d'ADN bactérien, ou le métabolisme cellulaire bactérien.

III.1 Différentes classes d'antibiotiques

Les antibiotiques peuvent être classés selon plusieurs critères : leurs origines, leurs structures, leurs activités antibactériennes et leurs mécanismes d'action. Il s'agit d'un groupe de produits chimiques qui peuvent être divisés en différents sous-groupes tels que les β -lactamines, les aminosides, les cyclines (ou tétracyclines), les macrolides, les glycopeptides, les quinolones, les nitrofuranes et nitriomadazoles, les phénicolés, les sulfonamides et (**Tableau 1.2**). Les antibiotiques sont souvent des molécules complexes qui agissent de manière différentes au sein de la même bactérie (**Figure 1.4**).

Les modes d'action des antibiotiques sont variés (**Tableau 1.2**) (**Figure 1.4**). Les β -lactamines et les glycopeptides inhibent la synthèse de la paroi bactérienne tandis que les aminosides, les cyclines, les macrolides et les phénicolés inhibent la synthèse protéique. Les polymyxines agissent au niveau de la membrane cellulaire alors que les quinolones (et fluoroquinolones) empêchent le métabolisme des acides nucléiques. Les nitrofuranes et nitroimidazoles inhibent des enzymes impliquées dans la dégradation du glucose et du pyruvate. Les sulfonamides et diaminopyridines inhibent, quant à eux, la synthèse de l'acide tétrahydrofolique et agissent par inhibition compétitive comme antimétabolites [68].

Tableau 1.2: Classification des antibiotiques selon leurs origines et leurs effets antibactériennes [68].

Antibiotiques	Origine	Effet antibactérien	Mode d'action
β-lactamine	Naturelle/semi-synthétique	Bactéricide	Inhibent la synthèse de la paroi bactérienne suite à leur liaison avec les protéines <i>penicillin-binding</i> et surtout à l'inhibition de l'activité des transpeptidases impliquées dans la synthèse de la paroi.
Aminoacides	Naturelle/semi-synthétique	Bactéricide	Inhibent la synthèse protéique suite à leur fixation sur la sous unité 30S du ribosome bactérien.
Cycline	Naturelle/semi-synthétique	Bactériostatique	Inhibent la synthèse protéique en empêchant la liaison de l'aminocyl-ARNt à la sous unité 30S du ribosome bactérien.
Macrolides	Naturelle/semi-synthétique	Bactériostatique	Inhibent la synthèse protéique en empêchant l'élongation de la chaîne peptidique suite à leur fixation sur la sous unité 50S du ribosome bactérien.
Glycopeptides	Naturelle	Bactéricide	Inhibent la synthèse de la paroi bactérienne en inhibant la transglycolysation par liaison au dipeptide terminal du peptidoglycane et en se chélatant à l'aminocyl-D-alanyl-D-alanine.
Quinolones	Synthétique	Bactériostatique	Empêchent le métabolisme des acides nucléiques agissent sur la topoisomérase IV et sur l'ADN-gyrase bactérienne.
Nitrofuranes et	Naturelle/semi-	Bactériostatique	Inhibent des enzymes impliquées dans la

nitroimidazoles	synthétique		dégradation du glucose et du pyruvate.
Phénicolés	Synthétique	Bactériostatique	Inhibent la synthèse protéique en empêchant l'élongation de la chaîne peptidique suite à leur fixation sur la sous unité 50S du ribosome bactérien.
Polymyxines	Naturelle	Bactériostatique	Détruisent la structure de la membrane des bactéries de Gram négatif en interagissant avec leurs phospholipides.
Sulfonamides et diaminopyridines	Synthétique	Bactériostatique	Anti-métabolite, inhibent la synthèse de l'acide tétrahydrofolique, cofacteur de la synthèse des bases puriques et pyrimidiques.

*Effet bactériostatique : arrêt la croissance bactérienne

*Effet bactéricide : provoque la mort de la bactérie

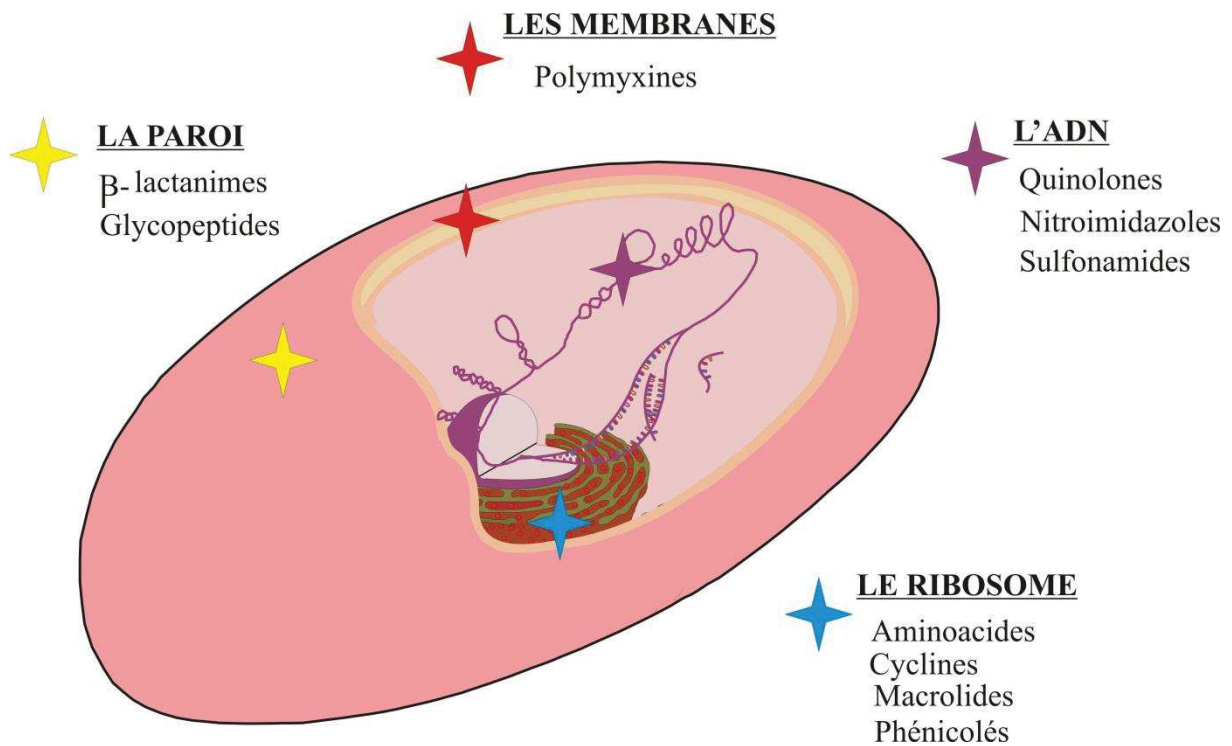


Figure 1.4: Les cibles bactériennes des antibiotiques.

Les cyclines font partie la deuxième famille d'antibiotique la plus consommée dans le monde, avec une production annuelle mondiale supérieure à 20000 tonnes [69, 70].

III.2 Famille des cyclines

Les cyclines ou les tétracyclines sont des antibiotiques bactériostatiques à large spectre. Ils disposent de quatre cycles accolés, d'où leur nom (**Figure 1.5**). Leur structure complexe est composée de :

- un squelette de base dérivé du naphtacène qui résulte de la condensation en ligne de quatre cycles insaturés à six chaînons,

- une structure oxygénée comportant notamment: d'un noyau phénol, d'un enchaînement β -dicétophénolique, structure à doubles liaisons conjuguées comprenant un hydroxyle phénolique et éolique et 2 fonctions cétones, et d'un hydroxyle éolique,

- une fonction amine tertiaire basique (groupement diméthylamine),

- une fonction carboxamide.

On distingue des cyclines naturelles (chlortétracycline et tétracycline) et des cyclines hémisynthétiques (oxytétracycline, doxycycline et minocycline). Dans notre étude, nous nous sommes intéressés à la tétracycline (TCH) et l'oxytétracycline (OXY).

III.2.1. Propriétés, stabilité et composition chimique de TCH et OXY

TCH et OXY (**Figure 1.5**) sont deux antibiotiques à large spectre contre des bactéries Gram positives et négatives découverts dans les années 40. En raison de leurs vastes éventails d'activités, leur faible coût et leur faible effet secondaire, ils sont utilisés dans plusieurs domaines d'applications en médecine humaine et vétérinaire [71].

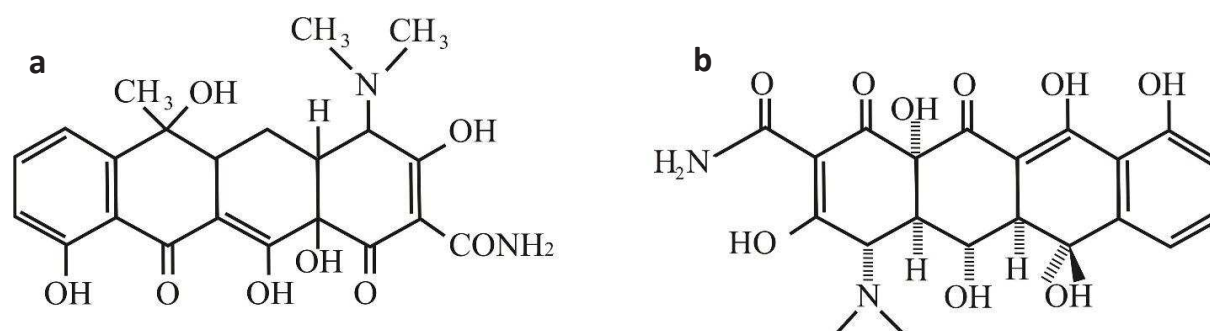


Figure 1.5: Structure moléculaire de la tétracycline (a) et de l'oxytétracycline (b).

La tétracycline (TCH) (**Figure 1.5.a**) [72] est un antibiotique bactériostatique de formule générale $C_{22}H_{24}N_2O_8$. Il est produit par la bactérie *Streptomyces aureofaciens*. Sa masse molaire est $444,4 \text{ g mol}^{-1}$. Dans certains pays, y compris les États-Unis, la tétracycline est largement utilisé dans la médecine humaine [71], pour les traitement des infections respiratoires et de l'acné.

L'oxytétracycline (OXY) (**Figure 1.5.b**) est un antibiotique bactériostatique produit par produits par la bactérie *Streptomyces rimosus*. Sa formule chimique $C_{22}H_{24}N_2O_9$ est légèrement différente par rapport à TCH. Sa masse molaire est de l'ordre 460 g mol^{-1} . L'OXY est utilisé pour le traitement des acnés et les infections de la peau. Il possède trois pKa à 3,3 (fonction énolique, carboxamide et cétone du cycle central), 7,3 (enchaînement dicétophénolique) et 9,1 (groupement diméthylamine). Son point isoélectrique se situe à un pH de 5,0.

La tétracycline et l'oxytétracycline ont une structure chimique semblable et le même mécanisme d'action. Ces antibiotiques sont très sensibles à la lumière. Ils doivent être conservés à l'abri de la lumière [10, 73]. Ils sont plus stables sous forme poudre qu'en solution aqueuse car leur structure dépend fortement du pH [73]. Ils sont déconseillés aux personnes allergiques ou ayant une forte sensibilité à la lumière. La prise de ce type de médicament impose de se protéger des expositions solaires.

III.2.2. Mécanisme d'action et spectre d'activité

La tétracycline et l'oxytétracycline sont actifs sur des bactéries de Gram négatif et positif, des bactéries anaérobies, les mycoplasmes, les rickettsies, les Chlamydiae et les leptospires [71]. Ils inhibent la synthèse des protéines en empêchant la fixation de l'aminocyl-ARNt au site de l'accepteur ribosomique [71, 74]. Pour interagir avec sa cible, la tétracycline et l'oxytétracycline doivent traverser un ou plusieurs systèmes membranaires dépendant du Gram de la bactérie (positif ou négatif). Elles se fixent sur la sous-unité 30S des ribosomes, pour stopper la phase d'élongation de la synthèse protéique. La liaison de la tétracycline et/ou de l'oxytétracycline avec le ribosome est réversible, ce qui explique l'effet bactériostatique de ces antibiotiques [74].

III.2.3 L'immobilisation de TCH et OXY dans les matériaux lamellaires (argiles et HDL)

L'immobilisation des antibiotiques dans les matériaux lamellaires tels que les argiles et les HDL a été réalisée pour deux applications principales: (i) la séquestration des antibiotiques d'un point de vue environnemental pour le traitement de l'eau [10, 11, 75] et (ii) la prolongation de leur libération tout en minimisant les effets secondaires [29, 30, 71].

La détection fréquente de ces antibiotiques dans les eaux usées, de surface, et souterraines a attiré l'attention sur l'interaction médicament-sol. Plusieurs travaux ont étudié l'adsorption du TCH et/ou OXY par des matériaux lamellaires [10, 19], avec pour objectif de les éliminer. Des études ont utilisé plusieurs types d'argiles comme la montmorillonite [75] pour l'élimination du TCH de l'environnement, et la palygorskite [76] pour retirer des quantités importantes de TCH dans les eaux usées grâce à leurs structures fibreuses et leurs grandes surfaces spécifique. L'hydrotalcite calcinée a été utilisée pour la photo-dégradation de l'oxytétracycline [10]. Cette étude a mis en œuvre la phase HDL MgAl-Cl préparée par la

méthode de coprécipitation qui a été calcinée à 723 K pour obtenir des oxydes d'hydrotalcite. Les résultats obtenus ont été comparés avec ceux du TiO₂ commercial P25 [10]. Ils montrent que l'hydrotalcite présente une meilleure activité de photo-dégradation sur OXY que le TiO₂.

Plusieurs études ont utilisé les matériaux lamellaires pour l'adsorption de la tétracycline tel que la montmorillonite [77] et les hydroxydes doubles lamellaires [78]. Xu et al. [65] ont étudié l'interaction de la tétracycline (TCH) dans l'hydrotalcite, pour éliminer l'antibiotique dans l'eau. Ils ont utilisé des échantillons de différents rapports Mg/Al (2, 3 et 4) préparés par coprécipitation, puis calcination. Les résultats ont été comparés à ceux obtenus pour l'hydrotalcite non calcinée et au MgO traité dans des conditions similaires. Les hydrotalcites calcinés présentaient des capacités d'adsorption nettement plus élevées pour le TCH.

III.3. Antibiotique polypeptidique : la « nisine »

Les bactériocines sont des polypeptides antimicrobiens synthétisés par voie ribosomique. Leur masse moléculaire est comprise entre 2 et 30 kDa [79]. Le terme bactériocine peut être traduit par antibiotique produit par une bactérie. L'activité des bactériocines a un effet soit « bactéricide », provoquant la mort de la bactérie cible, soit « bactériostatique » inhibant la croissance bactérienne. Leur spectre d'activité varie d'une bactériocine à une autre. Ils sont principalement actifs contre les bactéries à Gram positif [80]. Les bactéries à Gram négatif sont plus résistantes aux bactériocines car elles sont protégées par leurs membranes externes qui les empêchent d'atteindre la membrane interne. Selon la classification de Klaenhammer (1993) [81] (**Tableau 1.3**), les bactériocines sont divisées en quatre classes : les lantibiotiques, les nonlantibiotiques, les polypeptides à hautes poids moléculaires et les polypeptides complexes. D'une manière générale, les bactériocines sont thermostables (**jusqu'à 120°C, voir section III.3.2**), solubles et actives à pH acide [82]. Elles sont non toxiques pour les cellules eucaryotes et sensibles aux enzymes protéolytiques du tractus

gastro-intestinal, ce qui permet d'éviter les interférences avec la microflore intestinale [83]. De plus, d'un point de vue physico-chimique, elles sont généralement cationiques, amphiphiles et non structurées en solution aqueuse [84].

Tableau 1.3: Classification des bactériocines avec leurs caractéristiques principales. [81, 84].

<i>Classe</i>	<i>Caractéristique principale</i>	<i>Stabilité thermique</i>	<i>Exemple</i>
Classe I : <i>Lantibiotiques</i>	Cycles thioester dans la séquence, poids moléculaire < 5 kDa	Stable	Nisine Lactacine 481 Carnocine U149 Lactocine S
Classe II : <i>Nonlantibiotiques</i>	-IIa : poids moléculaire < 10 kDa -IIb : association de 2 peptides pour l'activité, poids moléculaire < 10 kDa	Stable Stable	Lactococcine MMF2 Sakacine G Lactococcine G Lactocine F
Classe III : <i>polypeptides à hautes poids moléculaires</i>	Poids moléculaire < 30 kDa	Sensible	Helvéticine J Helvéticine V-1829 Lactacine A et B
Classe VI : <i>polypeptides complexes</i>	Mélange indéfini de protéines, lipides et carbohydrates	Stable	Plantaricine S Leuconocine S Lactocine 27 Pediocine SJ1

Parmi les bactériocines, la « nisine » est actuellement la plus largement utilisée dans la sécurité alimentaire. Elle a été découverte en 1927 [85]. Elle est produite par *Lactococcus lactis*. Le terme nisine est issu de l'anglais N Inhibitory Substance, où N réfère au groupe Lancefield auquel appartient *L. lactis*. Elle est utilisée en tant qu'agent de conservation (E 234) dans l'industrie alimentaire [86]. C'est la seule bactériocine commercialisée sous le nom

de Nisaplin (DANISCO, Copenhague, Danemark) depuis 1953. La nisine est la première bactériocine approuvée par 50 pays pour des utilisations spécifiques dans différents produits alimentaires. Elle a obtenu le statut GRAS (Generally Recognized As Safe) par la FDA (Food and Drug Administration) aux Etats-Unis, ainsi que par l'organisation mondiale de la santé. Ceci signifie que son utilisation dans les aliments est sans danger pour les êtres humains [86, 87].

III.3.1. Structure et mode d'action de la nisine

La nisine appartient à la classe des lantibiotiques. Sa structure est représentée par la Figure 1.6. La nisine est un polypeptide de 3488 Da, composée de 34 aminoacides [88]. La nisine A est le prototype; la nisine Z est la variante naturelle. Cette dernière présente une légère modification dans les séquences d'acides aminés qui n'affecte ni son spectre d'action, ni l'immunité de la souche productrice. La nisine Z diffère par un seul acide aminé en position 27 (l'histidine de la nisine A est remplacée par l'asparagine) [89] mais son activité est similaire à la nisine A [90].

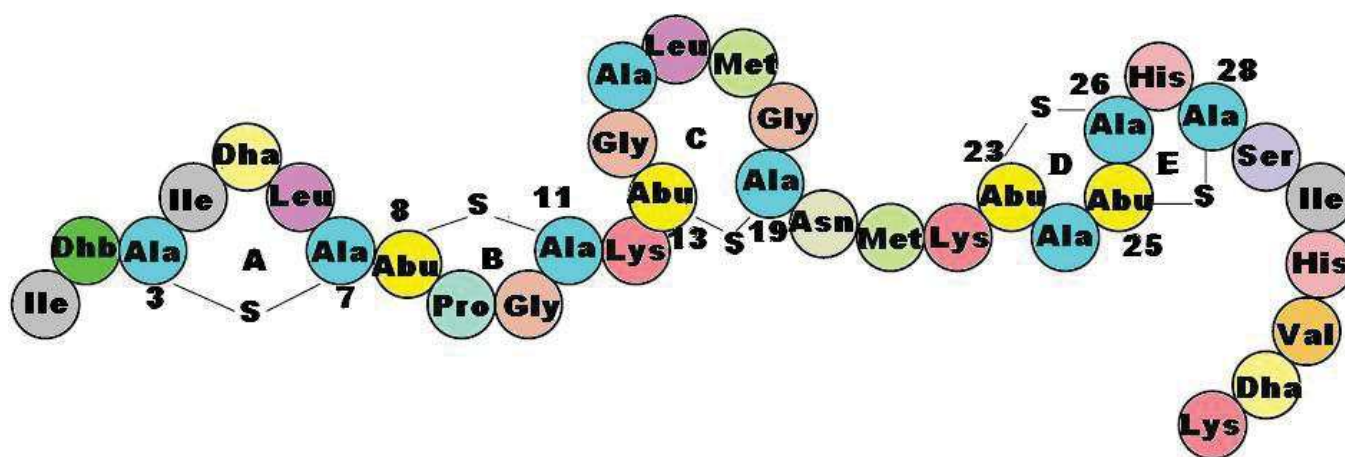


Figure 1.6: Structure générale de la nisine [91].

La nisine est un polypeptide amphiphile puisqu'elle possède des résidus hydrophiles (Asn, His, Ser et Lys), et d'autres hydrophobes (Ala, Ile, Leu, Met et Val). La partie N-terminale est

représentée par les acides aminés de 1 à 22 contenant les trois premiers cycles (A, B et C) ; elle est plus hydrophobe que la partie C-terminale, qui est représentée par les acides aminés 23 à 34 contenant les deux derniers cycles (D et E). Les résidus 1-2, le fragment 29-34 et la charnière centrale confèrent la flexibilité à cette molécule. D'après *Klaenhammer* [81], les molécules de nisine peuvent s'assembler en dimères ou en oligomères à travers des interactions intermoléculaires entre résidus Dha et Dhb. [91]. Les aminoacides de la partie C-terminale sont responsables des interactions électrostatiques avec la membrane des cellules cibles. La partie N-terminale s'insère dans la membrane lipidique par l'intermédiaire des interactions hydrophobes pour composer les pores et induire l'activité antimicrobienne de la nisine. La nisine possède un double mode d'action antimicrobien : elle se lie au lipide II puis inhibe la synthèse de la paroi cellulaire et forme des pores au niveau de la membrane cytoplasmique. Les lipides II sont des précurseurs d'ancrage de la paroi cellulaire à la membrane qui sont essentiels à la biosynthèse de la paroi bactérienne.

Le mode d'action de la nisine est sans doute le plus étudié en raison de sa découverte ancienne et de son utilisation dans le domaine agro-alimentaire. La nisine a une action contre un certain nombre des bactéries pathogènes de Gram positif.

III.3.2 Propriétés de la nisine

Le point isoélectrique (IEP) de la nisine est compris entre 8-9. Son activité est dépendante du pH et est optimale à pH 5,8. A $\text{pH} > \text{IEP}$, la nisine forme des multimères par des interactions inter-moléculaires responsables de la perte de l'activité biologique [89]. La nisine est plus soluble dans de l'eau à pH acide qu'à pH proche de l'IEP. En effet, sa solubilité varie de 57 à $0,25 \text{ mg.mL}^{-1}$ lorsque le pH varie de 2 à 8. La nisine se conserve mieux à 4°C qu'à 20°C [92]. Sa thermostabilité est aussi fonction du pH. L'activité de la nisine reste stable à pH 2 après un traitement de 30 min à 120°C . En revanche, à température ambiante, elle perd 40 % de son

activité à pH 5, 90 % à pH 6,8 et 100 % à pH 7. Les cinq ponts thioéther semblent être à l'origine de sa thermo-stabilité ainsi que de sa résistance aux enzymes, sauf à l' α -chymotrypsine. Dans les gammes de pH 2-8 et de températures 20, 37 et 75°C, un optimum de thermostabilité est obtenu à pH 3, avec une stabilité à la température qui augmente avec la diminution du pH [93].

III.3.3 L'immobilisation de la nisine dans les différents matériaux lamellaires

L'immobilisation de la nisine a été étudiée dans les argiles cationiques de type montmorillonite avec différentes capacités d'échange cationique (CEC) [94]. Plusieurs techniques de caractérisation ont été utilisées telles que la DRX, la FTIR et le TEM. Elles ont permis de confirmer que la nisine interagit avec la structure argileuse en produisant une « intercalation frustrée » [94]. Les études microbiennes des matériaux montmorillonite-nisine ont été effectuées par rapport *Enterococcus faecium* C1. Elles ont montré que l'argile pouvait protéger l'activité inhibitrice de la nisine. Cette étude a permis de conclure que l'immobilisation de la nisine dans les montmorillonites est une méthode pertinente pour protéger et fournir une libération progressive des polypeptides antimicrobiens [94].

L'immobilisation de la nisine dans trois nanocomposites différents : la bentonite, l'halloysite et la montmorillonite ont été étudié [95]. Les résultats montrent que la concentration interfaciale la plus élevée a été obtenue avec la bentonite. Le système halloysite-nisine présente la zone d'inhibition la plus importante contre une bactérie de Gram positif. Les techniques de caractérisation (DRX et FTIR) ont montré que la nisine a été intercalée dans les montmorillonites modifiées et la bentonite. Par contre, elle est immobilisée à la surface pour l'halloysite. La nisine garde son activité antibactérienne dans les trois nanocomposites. Toutefois, elle présente une activité plus importante avec l'halloysite puisque elle est adsorbée à la surface des grains.

Pour des applications dans l'industrie alimentaire, des films de nanocomposite amidon/halloysite/nisine ont été développés [96]. Les résultats ont montré que les propriétés morphologiques, mécaniques et thermiques ont été améliorées lorsque l'halloysite a été incorporée. L'activité antimicrobienne a été testée contre *Listeria monocytogenes*, *Clostridium perfringens* et *Staphylococcus aureus*. Tous les micro-organismes ont été inhibés par les nanocomposites. Les résultats ont montré que la nisine supportée dans les films amidon/halloysite peut être une barrière active et utile pour contrôler la contamination alimentaire. Cette étude a permis de protéger des aliments, comme le fromage Minas Frescal, contre la contamination par *L. monocytogenes* à l'aide de ces films d'emballages antimicrobiens.

III.4. Antibiotique enzymatique : le Lysozyme

III.4.1. Généralités sur les enzymes

Les enzymes sont des protéines de masses moléculaires élevées entre 10 à 1000 kDa qui catalysent des réactions biochimiques. Elles augmentent la vitesse de réaction sans modifier leur état d'équilibre. Les propriétés des enzymes sont liées à leurs structures tridimensionnelles. Les enzymes sont aussi des molécules amphotères : elles peuvent être chargées positivement, négativement ou être électriquement neutres selon le pH de la solution dans laquelle elles se trouvent. Une nomenclature a été proposée par la Commission des Enzymes de l'Union Internationale de Biochimie divisant les enzymes en six grandes classes (**Tableau 1.4**). C'est en fonction de leur activité catalytique que celles-ci sont classées. Chaque enzyme est associée à un « EC number ». Exemple : le Lysozyme EC 3.2.1.17 appartient à la classe des Hydrolases.

Tableau 1.4: Classification des enzymes.

<i>E.C (classe)</i>	<i>Classification</i>
E.C.1	Oxydoréductases
E.C.2	Transférases
E.C.3	Hydrolases
E.C.4	Lyases
E.C.5	Isomérases
E.C.6	Ligases

III.4.2. Propriétés et structure du lysozyme

Le lysozyme (EC 3.2.1.17) a été découvert en 1922 par Alexander Fleming. Cette protéine est constituée de 129 acides aminés, son poids moléculaire est 14,4 kDa, et son point isoélectrique (IEP) de 11,33. Lysozyme est un conservateur naturel et une enzyme à potentiel antimicrobien important. Le lysozyme peut être trouvé dans la nature ; il est produit par les plantes, les bactéries, les champignons et les mammifères [97]. L'activité du lysozyme est également limitée aux bactéries à Gram positif car les parois cellulaires des bactéries à Gram négatif sont protégées par une membrane externe [98]. Cependant, une action du lysozyme, couplée à un agent de chélation tel que l'ETDA permet de déstabiliser la membrane externe dans un premier temps, pour laisser agir le lysozyme sur le peptidoglycane dans le second temps [99]. Le lysozyme a une stabilité thermique dans une large plage de température (entre -18°C et 100°C) et sa stabilité interne élevée est due à quatre liaisons disulfures entre la cystéine 6-127, 30-115, 64-80 et 76-94. Il est considéré comme une protéine dure [100]. Son activité antimicrobienne optimale est pour une gamme de pH de 3,4-5,6 [101].

Le lysozyme est une protéine globulaire composée de deux zones hélice α et feuillet β (Figure 1.7). Il présente six résidus de tryptophanes (Trp), trois d'entre eux Trp 62, Trp 63 et Trp 108 sont localisés dans le site enzymatique et les Trp 108, Trp 28 et Trp 111 sont situés dans la partie hydrophobe de la protéine.

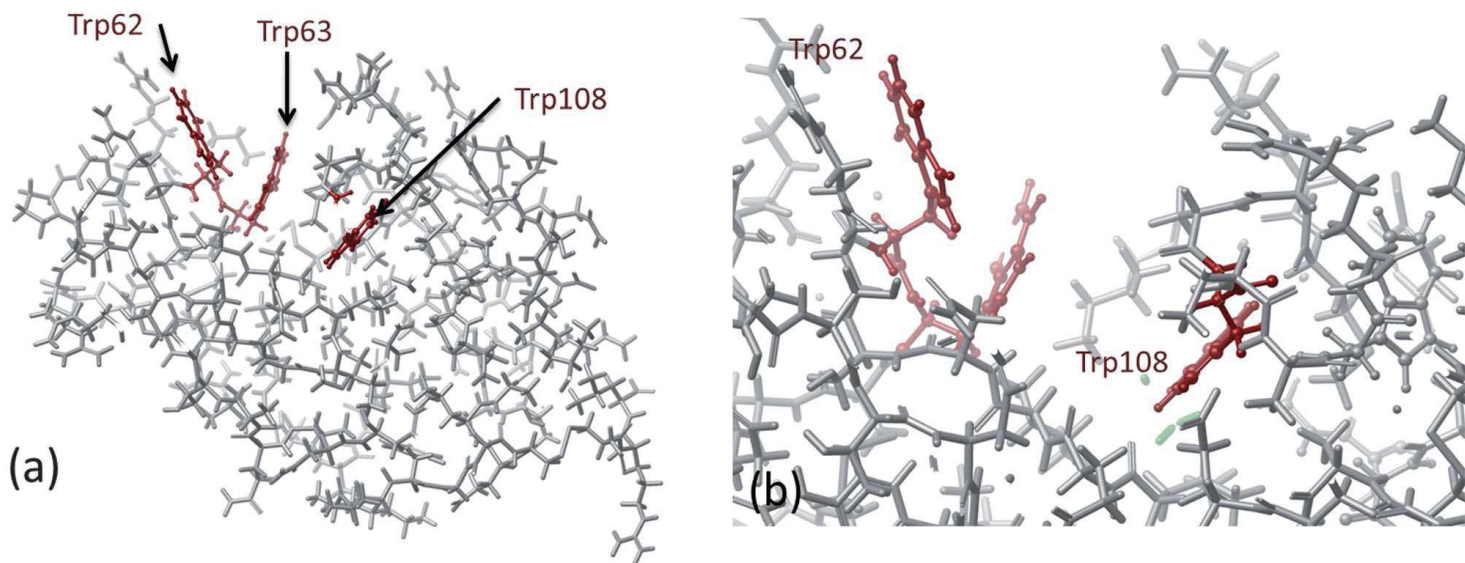


Figure 1.7: Structure de lysozyme : (a) structure complet et (b) zoom sur le site actif et Trp62 [102].

III.4.3. L'immobilisation du lysozyme dans les argiles et les HDL

Les protéines sont souvent classées en deux groupes. Les protéines de haute stabilité interne sont qualifiées « dures » comme le lysozyme et les protéines « molles » ayant une faible stabilité interne comme la BSA. La Figure 1.8 illustre les comportements d'une protéine dure et molle avec les argiles anioniques.

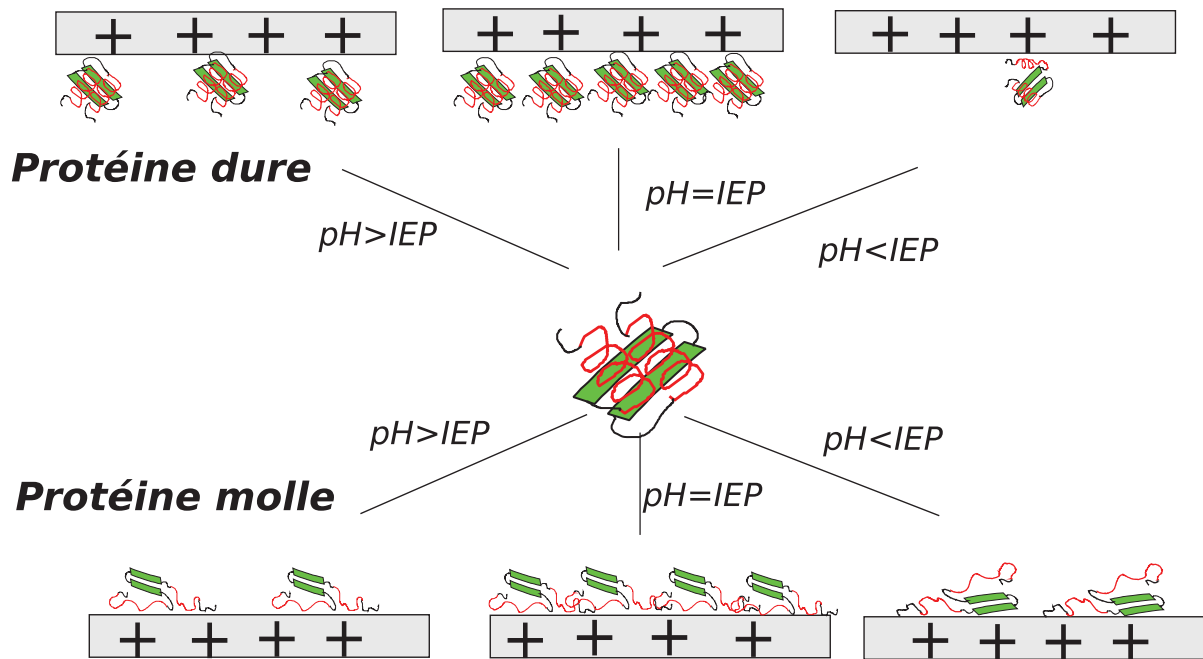


Figure 1.8: Interaction de la protéine dure et molle avec la surface des argiles anioniques.

La protéine dure a besoin de plus d'énergie pour se déplier que la protéine molle. Pour $pH=IEP$ (point iso-électrique), la protéine est globalement neutre minimisant ainsi les interactions électrostatiques ; cela permet d'avoir le maximum de protéines à la surface. Globalement, la structure des protéines dures est peu modifiée lors de l'adsorption contrairement aux protéines molles. Elles seront donc plus sensibles aux répulsions électrostatiques [103-105].

Le lysozyme a été intercalé dans un grand nombre de matrices argileuses [105], comme la montmorillonite, où il a été montré que le cation métallique influence l'adsorption. Balme et al. [102] ont étudié le confinement du lysozyme dans des matériaux lamellaires de type montmorillonite, montmorillonite modifiée et les hydroxydes doubles lamellaires modifiées. La DRX a montré que la protéine elle est bien intercalée au sein des montmorillonites et de la montmorillonite modifiée. Elle est présente uniquement à la surface des grains des phases HDL modifiées. L'adsorption du lysozyme a été réalisée en dessous de son point

isoélectrique, donc dans ces conditions la protéine est globalement chargée positivement. Le mécanisme d'adsorption est décrit dans Figure 1.9.

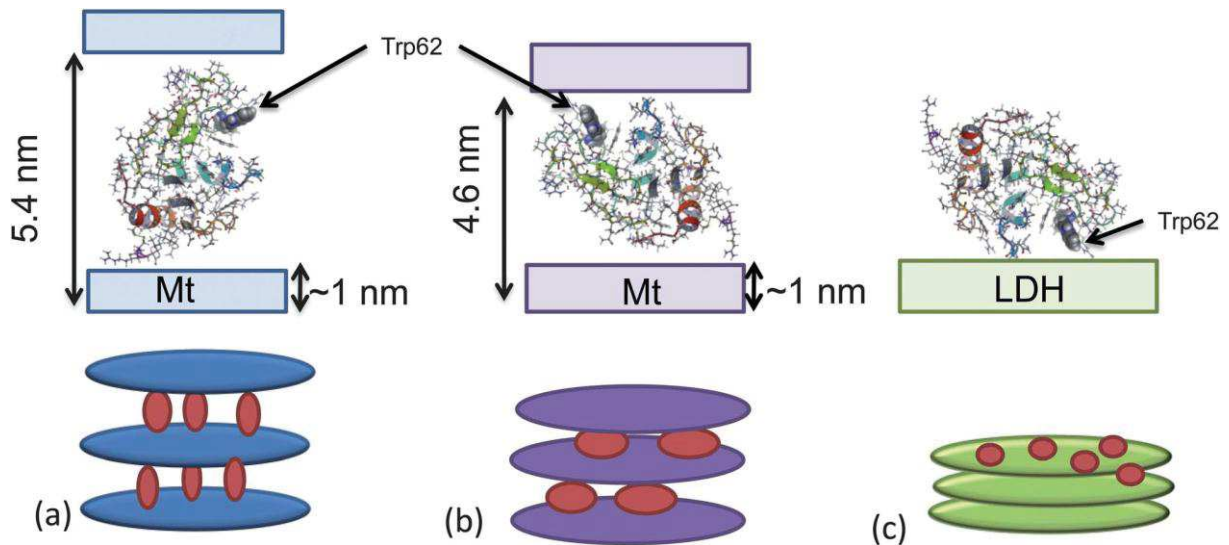


Figure 1.9: Orientation du lysozyme dans les différents matériaux lamellaires (a) Mt (montmorillonite) modifiée, (b) Mt (montmorillonite), (c) HDL-modifiée.[102].

D'autres travaux se sont intéressés à synthétiser des matériaux ayant une grande capacité antibactérienne contre des bactéries à Gram positif et à Gram négatif en combinant les nanoparticules d'argent (AgNPs) avec le lysozyme [106]. Les résultats ont montré que le système Ag/lysozyme- montmorillonite (Ag/lys-Mt) est très stable. Il peut être exposé aux suspensions bactériennes pendant 2 jours avec peu de changement de morphologie et une légère diminution de la teneur en AgNPs. Le matériau Ag/lyz-Mt combine la capacité d'absorption élevée de l'argile aux activités antibactériennes du lysozyme et des AgNPs sur la surface des pores d'argile. Ces nanomatériaux pourraient être un bactéricide prometteur pour la désinfection de l'eau par exemple.

Des travaux ont utilisé la bentonite comme matrice argileuse [107] dopée avec du tryptophane pour l'adsorption du lysozyme. Les résultats ont montré que le tryptophane est situé dans l'espace interlamellaire de la bentonite. La concentration interfaciale dépend de plusieurs paramètres : la concentration initiale en lysozyme, le pH et la température. Le maximum

d'adsorption du lysozyme a été obtenu à pH 10 (proche de son IEP=11). Toutefois, la capacité d'adsorption des microcomposites diminue significativement lorsque la température augmente.

IV. Conclusion

L'association des HDL avec des antibiotiques a fait l'objet de nombreux travaux. Dans ce travail de thèse, nous fixerons trois types d'antibiotiques : tétracycline (TCH) et oxytétracycline (OXY), nisine et lysozyme sur plusieurs types de HDL (ZnAl, MgAl, MnAl et NiAl). Cette étude vis à répondre à deux principales questions dont les réponses obtenues expérimentalement seront comparées aux réponses auxquelles on peut s'attendre en s'appuyant sur différentes hypothèses :

Question 1 : Quelle est l'influence de la localisation des antibiotiques dans la matrice HDL sur leurs activités antibactériennes ?

Hypothèse 1 : L'hypothèse que nous pourrions formuler est que le lysozyme sera adsorbé en surface des grains d'HDL sans modification majeure de son activité et que l'activité antibactérienne du lysozyme dépendra principalement de l'accessibilité du site enzymatique. Pour les antibiotiques de type cyclines et nisine, la localisation (à la surface ou entre les couches lamellaires) aura un effet sur la cinétique de relargage et la disponibilité des antibiotiques et donc sur leur activité.

Question 2 : La matrice HDL protège-t-elle les antibiotiques de la dégradation ?

Hypothèse 2 : L'hypothèse que nous pourrions formuler est que la température et la lumière UV provoqueront une instabilité pour les antibiotiques et la nisine, ce qui induira une diminution de l'activité antibactérienne. Nous pouvons penser que leur intercalation permettra de limiter leur dégradation.

V. Références

1. Nicole, L., et al., *Hybrid materials science: a promised land for the integrative design of multifunctional materials*. *Nanoscale*, 2014. **6**(12): p. 6267-6292.
2. Saba, N., et al., *5 - Hybrid multifunctional composites—recent applications*, in *Hybrid Polymer Composite Materials 2017*, Woodhead Publishing. p. 151-167.
3. Ramanujam, B.T.S. and P.K. Annamalai, *1 - Conducting polymer–graphite binary and hybrid composites: Structure, properties, and applications*, in *Hybrid Polymer Composite Materials 2017*, Woodhead Publishing. p. 1-34.
4. Soares, P.I.P., et al., *4 - Hybrid polysaccharide-based systems for biomedical applications*, in *Hybrid Polymer Composite Materials 2017*, Woodhead Publishing. p. 107-149.
5. Iessa, H., et al., *Discharged filtrate movement in food materials under application of electrokinetics*. *Food Chemistry*, 2018. **247**: p. 1-7.
6. Ghoshal, G., *Chapter 10 - Recent Trends in Active, Smart, and Intelligent Packaging for Food Products A2 - Grumezescu, Alexandru Mihai*, in *Food Packaging and Preservation*, A.M. Holban, Editor 2018, Academic Press. p. 343-374.
7. Cuerda-Correa, E.M., et al., *On the use of carbon blacks as potential low-cost adsorbents for the removal of non-steroidal anti-inflammatory drugs from river water*. *Journal of Hazardous Materials*, 2010. **177**(1): p. 1046-1053.
8. Kümmerer, K., *Antibiotics in the aquatic environment – A review – Part I*. *Chemosphere*, 2009. **75**(4): p. 417-434.
9. Kümmerer, K., *Antibiotics in the aquatic environment – A review – Part II*. *Chemosphere*, 2009. **75**(4): p. 435-441.
10. Jácome-Acatitla, G., et al., *Photodegradation of sodium naproxen and oxytetracycline hydrochloride in aqueous medium using as photocatalysts Mg-Al calcined hydrotalcites*. *Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry*, 2014. **277**: p. 82-89.
11. Kümmerer, K., *Drugs in the environment: emission of drugs, diagnostic aids and disinfectants into wastewater by hospitals in relation to other sources – a review*. *Chemosphere*, 2001. **45**(6): p. 957-969.
12. Sarmah, A.K., M.T. Meyer, and A.B.A. Boxall, *A global perspective on the use, sales, exposure pathways, occurrence, fate and effects of veterinary antibiotics (VAs) in the environment*. *Chemosphere*, 2006. **65**(5): p. 725-759.
13. Rivera-Utrilla, J., et al., *Removal of nitroimidazole antibiotics from aqueous solution by adsorption/bioadsorption on activated carbon*. *Journal of Hazardous Materials*, 2009. **170**(1): p. 298-305.
14. Basha, S., et al., *On the adsorption/photodegradation of amoxicillin in aqueous solutions by an integrated photocatalytic adsorbent (IPCA): experimental studies and kinetics analysis*. *Photochemical & Photobiological Sciences*, 2011. **10**(6): p. 1014-1022.
15. De Gisi, S., et al., *Characteristics and adsorption capacities of low-cost sorbents for wastewater treatment: A review*. *Sustainable Materials and Technologies*, 2016. **9**: p. 10-40.
16. Li, Z., et al., *Interaction between tetracycline and smectite in aqueous solution*. *Journal of Colloid and Interface Science*, 2010. **341**(2): p. 311-319.
17. Wang, C.-J., Z. Li, and W.-T. Jiang, *Adsorption of ciprofloxacin on 2:1 dioctahedral clay minerals*. *Applied Clay Science*, 2011. **53**(4): p. 723-728.
18. Wang, Y.-J., et al., *Adsorption and Cosorption of Tetracycline and Copper(II) on Montmorillonite as Affected by Solution pH*. *Environmental Science & Technology*, 2008. **42**(9): p. 3254-3259.

19. Sharma, V., et al., *Integrated adsorption-membrane filtration process for antibiotic removal from aqueous solution*. Powder Technology, 2017. **321**: p. 259-269.
20. Ahmed, M.J., et al., *Human hair-derived high surface area porous carbon material for the adsorption isotherm and kinetics of tetracycline antibiotics*. Bioresource Technology, 2017. **243**: p. 778-784.
21. Rostamian, R. and H. Behnejad, *A comprehensive adsorption study and modeling of antibiotics as a pharmaceutical waste by graphene oxide nanosheets*. Ecotoxicology and Environmental Safety, 2018. **147**: p. 117-123.
22. Ahmed, M.J., *Adsorption of quinolone, tetracycline, and penicillin antibiotics from aqueous solution using activated carbons: Review*. Environmental Toxicology and Pharmacology, 2017. **50**: p. 1-10.
23. Thines, R.K., et al., *Application potential of carbon nanomaterials in water and wastewater treatment: A review*. Journal of the Taiwan Institute of Chemical Engineers, 2017. **72**: p. 116-133.
24. Giammarco, J., et al., *The adsorption of tetracycline and vancomycin onto nanodiamond with controlled release*. Journal of Colloid and Interface Science, 2016. **468**: p. 253-261.
25. Meng, N., et al., *Controlled release and antibacterial activity chlorhexidine acetate (CA) intercalated in montmorillonite*. International Journal of Pharmaceutics, 2009. **382**(1): p. 45-49.
26. Nascimento, T.L., et al., *Lipid-based nanosystems for CD44 targeting in cancer treatment: recent significant advances, ongoing challenges and unmet needs*. Nanomedicine, 2016. **11**(14): p. 1865-1887.
27. Valetti, S., et al., *Rational design for multifunctional non-liposomal lipid-based nanocarriers for cancer management: theory to practice*. Journal of Nanobiotechnology, 2013. **11**(1): p. S6.
28. Li, C.-C. and A. Chauhan, *Modeling Ophthalmic Drug Delivery by Soaked Contact Lenses*. Industrial & Engineering Chemistry Research, 2006. **45**(10): p. 3718-3734.
29. Mishra, G., B. Dash, and S. Pandey, *Layered double hydroxides: A brief review from fundamentals to application as evolving biomaterials*. Applied Clay Science, 2018. **153**: p. 172-186.
30. Rives, V., M. del Arco, and C. Martín, *Intercalation of drugs in layered double hydroxides and their controlled release: A review*. Applied Clay Science, 2014. **88-89**: p. 239-269.
31. Peng, L., et al., *The effect of TiO₂ nanotubes on endothelial function and smooth muscle proliferation*. Biomaterials, 2009. **30**(7): p. 1268-1272.
32. Vasilev, K., et al., *Tailoring the surface functionalities of titania nanotube arrays*. Biomaterials, 2010. **31**(3): p. 532-540.
33. Nairi, V., et al., *Adsorption and release of ampicillin antibiotic from ordered mesoporous silica*. Journal of Colloid and Interface Science, 2017. **497**: p. 217-225.
34. Baeza, A., M. Colilla, and M. Vallet-Regí, *Advances in mesoporous silica nanoparticles for targeted stimuli-responsive drug delivery*. Expert Opinion on Drug Delivery, 2015. **12**(2): p. 319-337.
35. Berger, D., et al., *Influence of structural, textural and surface properties of mesostructured silica and aluminosilicate carriers on aminoglycoside uptake and in vitro delivery*. Microporous and Mesoporous Materials, 2015. **206**: p. 150-160.
36. Mamaeva, V., C. Sahlgren, and M. Lindén, *Mesoporous silica nanoparticles in medicine—Recent advances*. Advanced Drug Delivery Reviews, 2013. **65**(5): p. 689-702.
37. Maggini, L., et al., *Breakable mesoporous silica nanoparticles for targeted drug delivery*. Nanoscale, 2016. **8**(13): p. 7240-7247.

38. Stjern, L., et al., *Cyclodextrin-mesoporous silica particle composites for controlled antibiotic release. A proof of concept toward colon targeting*. International Journal of Pharmaceutics, 2017. **531**(2): p. 595-605.
39. Wu, L., et al., *Drug release material hosted by natural montmorillonite with proper modification*. Applied Clay Science, 2017. **148**: p. 123-130.
40. Cavani, F., F. Trifirò, and A. Vaccari, *Hydrotalcite-type anionic clays: Preparation, properties and applications*. Catalysis Today, 1991. **11**(2): p. 173-301.
41. Lins, L.C., et al., *Phosphonium ionic liquid as interfacial agent of layered double hydroxide: Application to a pectin matrix*. Carbohydrate Polymers, 2018. **182**: p. 142-148.
42. Baig, N. and M. Sajid, *Applications of layered double hydroxides based electrochemical sensors for determination of environmental pollutants: A review*. Trends in Environmental Analytical Chemistry, 2017. **16**: p. 1-15.
43. Cao, Y., G. Li, and X. Li, *Graphene/layered double hydroxide nanocomposite: Properties, synthesis, and applications*. Chemical Engineering Journal, 2016. **292**: p. 207-223.
44. SHIGEO, M., *ANION-EXCHANGE PROPERTIES OF HYDROTALCITE-LIKE COMPOUNDS*. Clays and Clay Minerals, 1983. **31**(4): p. 305-311.
45. OKADA, M.S.a.A., *SYNTHESIS OF HYDROTALCITE-LIKE COMPOUNDS AND THEIR PHYSICO-CHEMICAL PROPERTIES-- THE SYSTEMS Mg^{2+} - Al^{3+} - SO^{2-} AND Mg^{2+} - Al^{3+} - CrO^{2-}* . Clays and Clay Minerals, 1976. **25**: p. 14-18.
46. Ho, Y.S. and G. McKay, *Pseudo-second order model for sorption processes*. Process Biochemistry, 1999. **34**(5): p. 451-465.
47. Giles, C.H., et al., *786. Studies in adsorption. Part XI. A system of classification of solution adsorption isotherms, and its use in diagnosis of adsorption mechanisms and in measurement of specific surface areas of solids*. Journal of the Chemical Society (Resumed), 1960(0): p. 3973-3993.
48. Langmuir, I., *THE ADSORPTION OF GASES ON PLANE SURFACES OF GLASS, MICA AND PLATINUM*. Journal of the American Chemical Society, 1918. **40**(9): p. 1361-1403.
49. Choy, J.-H., et al., *Layered double hydroxide as an efficient drug reservoir for folate derivatives*. Biomaterials, 2004. **25**(15): p. 3059-3064.
50. Aisawa, S., et al., *Intercalation behavior of l-ascorbic acid into layered double hydroxides*. Applied Clay Science, 2007. **35**(3): p. 146-154.
51. Ambrogi, V., et al., *Intercalation compounds of hydrotalcite-like anionic clays with antiinflammatory agents — I. Intercalation and in vitro release of ibuprofen*. International Journal of Pharmaceutics, 2001. **220**(1): p. 23-32.
52. Ambrogi, V., et al., *Intercalation compounds of hydrotalcite-like anionic clays with anti-inflammatory agents, II: Uptake of diclofenac for a controlled release formulation*. AAPS PharmSciTech, 2002. **3**(3): p. 77-82.
53. Berber, M.R., et al., *Nanocomposites of 2-arylpropionic acid drugs based on Mg-Al layered double hydroxide for dissolution enhancement*. European journal of pharmaceutical sciences : official journal of the European Federation for Pharmaceutical Sciences, 2008. **35**(4): p. 354-360.
54. Pang, X., et al., *Synthesis and characterization of 10-hydroxycamptothecin – sebacate – layered double hydroxide nanocomposites*. Solid State Sciences, 2013. **16**: p. 71-75.
55. Nie, H.-Q. and W.-G. Hou, *Synthesis and Characterization of Ifosfamide Intercalated Layered Double Hydroxides*. Journal of Dispersion Science and Technology, 2012. **33**(3): p. 339-345.
56. Pan, D., et al., *A novel organic–inorganic microhybrids containing anticancer agent doxifluridine and layered double hydroxides: Structure and controlled release properties*. Chemical Engineering Science, 2010. **65**(12): p. 3762-3771.

57. Wang, Z., et al., *Synthesis and properties of Mg₂Al layered double hydroxides containing 5-fluorouracil*. Journal of Solid State Chemistry, 2005. **178**(3): p. 736-741.
58. Choi, S.-J., J.-M. Oh, and J.-H. Choy, *Anticancer drug-layered hydroxide nanohybrids as potent cancer chemotherapy agents*. Journal of Physics and Chemistry of Solids, 2008. **69**(5): p. 1528-1532.
59. Wang, J., et al., *Synthesis, sustained release properties of magnetically functionalized organic-inorganic materials: Amoxicillin anions intercalated magnetic layered double hydroxides via calcined precursors at room temperature*. Solid State Sciences, 2009. **11**(9): p. 1597-1601.
60. Wang, Y. and D. Zhang, *Synthesis, characterization, and controlled release antibacterial behavior of antibiotic intercalated Mg-Al layered double hydroxides*. Materials Research Bulletin, 2012. **47**(11): p. 3185-3194.
61. Ryu, S.-J., et al., *Layered double hydroxide as novel antibacterial drug delivery system*. Journal of Physics and Chemistry of Solids, 2010. **71**(4): p. 685-688.
62. Perioli, L. and C. Pagano, *Inorganic matrices: an answer to low drug solubility problem*. Expert Opinion on Drug Delivery, 2012. **9**(12): p. 1559-1572.
63. Perioli, L., P. Mutascio, and C. Pagano, *Influence of the Nanocomposite MgAl-HTlc on Gastric Absorption of Drugs: In Vitro and Ex Vivo Studies*. Pharmaceutical Research, 2013. **30**(1): p. 156-166.
64. Trikeriotis, M. and D.F. Ghanotakis, *Intercalation of hydrophilic and hydrophobic antibiotics in layered double hydroxides*. International Journal of Pharmaceutics, 2007. **332**(1): p. 176-184.
65. Xu, Z., et al., *On the Adsorption of Tetracycline by Calcined Magnesium-Aluminum Hydrotalcites* All rights reserved. No part of this periodical may be reproduced or transmitted in any form or by any means, electronic or mechanical, including photocopying, recording, or any information storage and retrieval system, without permission in writing from the publisher. Journal of Environmental Quality, 2009. **38**(3): p. 1302-1310.
66. San Román, M.S., et al., *Characterisation of Diclofenac, Ketoprofen or Chloramphenicol Succinate encapsulated in layered double hydroxides with the hydrotalcite-type structure*. Applied Clay Science, 2012. **55**: p. 158-163.
67. Tamarro, L., et al., *Nanohybrids for controlled antibiotic release in topical applications*. International Journal of Antimicrobial Agents, 2007. **29**(4): p. 417-423.
68. Vardanyan, R. and V. Hruby, *Chapter 30 - Antibiotics*, in *Synthesis of Best-Seller Drugs 2016*, Academic Press: Boston. p. 573-643.
69. Liu, H., et al., *Fate of tetracycline in enhanced biological nutrient removal process*. Chemosphere, 2018. **193**: p. 998-1003.
70. Zhang, Y., et al., *Microbial community functional structure in response to antibiotics in pharmaceutical wastewater treatment systems*. Water Research, 2013. **47**(16): p. 6298-6308.
71. Chopra, I. and M. Roberts, *Tetracycline Antibiotics: Mode of Action, Applications, Molecular Biology, and Epidemiology of Bacterial Resistance*. Microbiology and Molecular Biology Reviews, 2001. **65**(2): p. 232-260.
72. Chopra, I., *Tetracycline analogs whose primary target is not the bacterial ribosome*. Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 1994. **38**(4): p. 637-640.
73. E. Salmon-Legagneur, A.A., C. Jouandet, P. Vaissade, Huguette Dewulf, A. Kmoisant, Hélène Moutel, Michelle Nocart, J. Hautducoeur, *Etude de quelques facteurs de la stabilité des antibiotiques dans les aliments pour porcelets* Annales de zootechnie, 1968. **17**(3): p. 289-305.

74. Chopra Ian, H.P., Hinton M., *Tetracyclines, molecular and clinical aspects*. the journal of antimicrobial chemotherapy 1992. **29**(3) : p. 245-277.
75. Wu, H., et al., *Effects of the pH and anions on the adsorption of tetracycline on iron-montmorillonite*. Applied Clay Science, 2016. **119**: p. 161-169.
76. Chang, P.-H., et al., *Sorptive removal of tetracycline from water by palygorskite*. Journal of Hazardous Materials, 2009. **165**(1): p. 148-155.
77. Lv, G., et al., *Influence of montmorillonite on antimicrobial activity of tetracycline and ciprofloxacin*. Journal of Asian Earth Sciences, 2013. **77**: p. 281-286.
78. Soori, M.M., et al., *Intercalation of tetracycline in nano sheet layered double hydroxide: An insight into UV/VIS spectra analysis*. Journal of the Taiwan Institute of Chemical Engineers, 2016. **63**: p. 271-285.
79. Sidhu, P.K. and K. Nehra, *Bacteriocin-nanoconjugates as emerging compounds for enhancing antimicrobial activity of bacteriocins*. Journal of King Saud University - Science, 2017.
80. Thonart, C.D.a.P., *Les bactériocines des bactéries lactiques : caractéristiques et intérêts pour la bioconservation des produits alimentaires*. Biotechnology, Agronomy, Society and Environment, 2009. **13**(1): p. 143-154.
81. Klaenhammer, T.R., *Genetics of bacteriocins produced by lactic acid bacteria*. FEMS Microbiology Reviews, 1993. **12**(1): p. 39-85.
82. Hicham LABIOUI, L.E., Mohammed EL YACHIOUI, Mohammed OUHSSINE, *Sélection de souches de bactéries lactiques antibactériennes*. Bulletin-societe de pharmacie de bordeaux, 2005. **144**: p. 237-250.
83. Castellano, P., et al., *A review of bacteriocinogenic lactic acid bacteria used as bioprotective cultures in fresh meat produced in Argentina*. Meat Science, 2008. **79**(3): p. 483-499.
84. Reis, J.A., et al., *Lactic Acid Bacteria Antimicrobial Compounds: Characteristics and Applications*. Food Engineering Reviews, 2012. **4**(2): p. 124-140.
85. Hurst, A., *Function of Nisin and Nisin-like Basic Proteins in the Growth Cycle of Streptococcus lactis*. Nature, 1967. **214**: p. 1232.
86. P. Michael Davidson, J.N.S., Alfred Larry Branen, *ANTIMICROBIALS IN FOOD*. Food science and technology, 2005: p. 237-274.
87. Balciunas, E.M., et al., *Novel biotechnological applications of bacteriocins: A review*. Food Control, 2013. **32**(1): p. 134-142.
88. Sahl, H.-G. and G. Bierbaum, *LANTIBIOTICS: Biosynthesis and Biological Activities of Uniquely Modified Peptides from Gram-Positive Bacteria*. Annual Review of Microbiology, 1998. **52**(1): p. 41-79.
89. Liu, W. and J.N. Hansen, *Some chemical and physical properties of nisin, a small-protein antibiotic produced by Lactococcus lactis*. Applied and Environmental Microbiology, 1990. **56**(8): p. 2551-2558.
90. Mulders, J.W.M., et al., *Identification and characterization of the lantibiotic nisin Z, a natural nisin variant*. European Journal of Biochemistry, 1991. **201**(3): p. 581-584.
91. Breukink, E. and B. de Kruijff, *The lantibiotic nisin, a special case or not?* Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes, 1999. **1462**(1): p. 223-234.
92. Hurst, A., *Nisin*, in *Advances in Applied Microbiology*, D. Perlman and A.I. Laskin, Editors. 1981, Academic Press. p. 85-123.
93. Rollema, H.S., et al., *Improvement of solubility and stability of the antimicrobial peptide nisin by protein engineering*. Applied and Environmental Microbiology, 1995. **61**(8): p. 2873-2878.
94. Ibarguren, C., et al., *Adsorption of nisin on raw montmorillonite*. Applied Clay Science, 2014. **90**: p. 88-95.

95. Meira, S.M.M., A.I. Jardim, and A. Brandelli, *Adsorption of nisin and pediocin on nanoclays*. Food Chemistry, 2015. **188**: p. 161-169.
96. Meira, S.M.M., et al., *Starch-halloysite nanocomposites containing nisin: Characterization and inhibition of Listeria monocytogenes in soft cheese*. LWT - Food Science and Technology, 2016. **68**: p. 226-234.
97. Branan, J.K. and P.M. Davidson, *Enhancement of nisin, lysozyme, and monolaurin antimicrobial activities by ethylenediaminetetraacetic acid and lactoferrin*. International Journal of Food Microbiology, 2004. **90**(1): p. 63-74.
98. Proctor, V.A., F.E. Cunningham, and D.Y.C. Fung, *The chemistry of lysozyme and its use as a food preservative and a pharmaceutical*. C R C Critical Reviews in Food Science and Nutrition, 1988. **26**(4): p. 359-395.
99. Hughey, V.L. and E.A. Johnson, *Antimicrobial activity of lysozyme against bacteria involved in food spoilage and food-borne disease*. Applied and Environmental Microbiology, 1987. **53**(9): p. 2165-2170.
100. Mecitoğlu, Ç., et al., *Incorporation of partially purified hen egg white lysozyme into zein films for antimicrobial food packaging*. Food Research International, 2006. **39**(1): p. 12-21.
101. Sakakibara, Y. and H. Yanagisawa, *Techniques for the separation of proteins by isoelectric point column chromatography(Natural Science)*. Bulletin of Aichi University of Education, 2007. **56**: p. 45-49.
102. Balme, S., et al., *Structure, Orientation and Stability of Lysozyme Confined in layered Materials*. The Royal Society of Chemistry, 2013. **9**(11): p. 3188-3196.
103. Haynes, C.A., E. Sliwinsky, and W. Norde, *Structural and Electrostatic Properties of Globular Proteins at a Polystyrene-Water Interface*. Journal of Colloid and Interface Science, 1994. **164**(2): p. 394-409.
104. Kleijn, J.M. and W. Norde, *The adsorption of proteins from aqueous solution on solid surfaces*. Heterogeneous chemistry reviews, 1995. **2**: p. 157-172.
105. Lepoitevin, M., et al., *BSA and lysozyme adsorption on homoionic montmorillonite: Influence of the interlayer cation*. Applied Clay Science, 2014. **95**: p. 396-402.
106. Jiang, J., et al., *The disinfection performance and mechanisms of Ag/lysozyme nanoparticles supported with montmorillonite clay*. Journal of Hazardous Materials, 2016. **317**: p. 416-429.
107. Kalburcu, T., et al., *Adsorption of lysozyme from aqueous solutions by a novel bentonite-tyrptophane (Bent-Trp) microcomposite affinity sorbent*. Journal of Molecular Structure, 2015. **1083**:p.156-162.

Chapitre 2 : Matériels et méthodes

L'objectif de ce chapitre est de présenter toutes les méthodes que nous avons utilisées pour la synthèse et la caractérisation des différents matériaux hydroxydes doubles lamellaires (HDL) chargés par des antibiotiques.

I. Produits chimiques utilisés

L'eau déionisée (Millipore, 18 M Ω) a été utilisée pour la préparation de tous les échantillons. Deux solutions tampons ont été utilisées : le tampon phosphate à pH 7,4 (sous forme des comprimés) et une solution d'HEPES à pH 7,0 (Sigma). Pour la synthèse des phases hydroxydes doubles lamellaires (HDL) par coprécipitation, on a utilisé du chlorure d'aluminium hexahydraté (CAS-Number : 7784-13-6), du chlorure de magnésium hexahydraté (CAS Number : 7791-18-6), du chlorure de zinc (CAS-Number 7646-85-7), du chlorure de nickel hexahydraté (CAS Number: 7791-20-0), du chlorure de manganèse (CAS-Number 7773-01-5), du nitrate d'aluminium nonahydraté (CAS-Number : 7784-27-2), du nitrate de magnésium hexahydraté (CAS-Number : 13446-18-9) et de l'hydroxyde de sodium (CAS-Number :1310-73-2). Pour la synthèse des HDL par la méthode d'hydrolyse l'urée (CSA-Number124-43-6) a été utilisée. Les antibiotiques utilisés sont : la nisine extraite de *Lactococcus lactis* (CAS Number : 1414-45-5), le lysozyme extrait de blanc d'œuf de poulet (CAS Number : 12650-88-3), du chlorhydrate de tétracycline (CAS Number : 64-75-5) et du chlorhydrate d'oxytétracycline (CAS-Number : 2058-46-0). Nous avons utilisé trois souches bactériennes : *Staphylococcus epidermidis* (*S. epidermidis* CIP 53156, Institut de Pasteur, Lyon, France), *Escherichia coli* (*E.coli* K12 DSM 423, DSMZ, Allemagne) et *Micrococcus luteus* (*M. luteus*, NCIMB 10149, Ecosse). Un milieu de culture de type Luria Bertani Miller (LB, ref. 1214662, Fisher Fischer Scientific, France) a été utilisé ainsi que du chlorure de sodium (CAS-Number : 7647-14-5) et de l'agar (CAS-number 9002-18-0).

II. Techniques de caractérisations physico-chimiques

Pour examiner l'évolution structurale et morphologique des échantillons synthétisés (phases HDL seules ou bien matériaux hydrides HDL-antibiotiques), nous avons utilisé différentes techniques d'analyse. Pour l'analyse structurale, la diffraction des rayons X (DRX), l'analyse spectroscopique d'infrarouge (FTIR), la spectrophotométrie UV-visible (UV) et la spectroscopie de fluorescence résolue en temps ont été mises en œuvre. Pour les analyses morphologiques, la microscopie électronique à balayage (MEB) et la microscopie électronique à transmission (MET) ont été utilisées.

II.1. Diffraction des rayons X (DRX)

La diffraction des rayons X (DRX), nous permet d'analyser les phases hydroxydes doubles lamellaires (HDL). C'est un outil de base pour identifier la composition chimique des composés et déterminer leurs caractéristiques structurales. C'est une technique facile à réaliser, rapide et non destructive avec laquelle il est possible d'obtenir des renseignements sur le feuillet, l'espace interfeuillet, et les distances inter-réticulaires d_{hkl} . Cette technique nous permet aussi de déterminer les paramètres de maille a et c où $a=2d(110)$ et $c=3d(003)$.

-Principe de la méthode : Le principe consiste à bombarder l'échantillon avec des rayons X et à analyser l'intensité de rayons qui est diffusée selon l'orientation dans l'espace. Les rayons X diffusés interfèrent entre eux, l'intensité présente des maxima dans certaines directions ; on parle de phénomène de «diffraction». Les données collectées forment le diagramme de diffraction ou diffractogramme (enregistrement de l'intensité diffractée en fonction de l'angle 2θ formé avec le faisceau directe). Pour que la diffraction soit observée, il faut que les ondes diffractées par les différents plans soient en phase (ou que la différence de

marche des rayons rencontrant ces plans soit égale à un nombre entier). Ce raisonnement conduit à la relation de Bragg.

$$2d_{hkl} \sin \theta = n \cdot \lambda \quad (\text{Eq 2.1})$$

Avec :

d_{hkl} : la distance inter-réticulaire entre les plans diffractant,

θ : l'angle entre le faisceau incident et les plans diffractants. Le domaine de l'angle (2θ) est compris entre 2° et 70° .

n : l'ordre de la réflexion.

λ : la longueur d'onde du rayonnement utilisé.

Cette formule permet de déterminer l'ensemble des équidistances d_{hkl} caractéristiques de la nature du réseau cristallin du matériau analysé.

-Conditions d'enregistrement : La qualité du diagramme de diffraction dépend de la cristallinité de l'échantillon, et des conditions de l'enregistrement. Il est donc nécessaire de connaître au préalable le domaine angulaire en deux θ dans lequel le composé donnera des pics de diffraction. Les diffractogrammes ont été réalisés dans les conditions opératoires suivantes :

Domaine angulaire en 2θ : 2° - 70° .

Incrément angulaire en 2θ : $0,02^\circ$.

-Caractéristique du diffractomètre utilisé : Les mesures par diffraction des rayons X ont été effectuées à l'aide d'un diffractomètre de poudre « BRUKER D8 ADVANCE ». Cet appareil se compose d'un goniomètre monté verticalement sur un générateur de rayons X. Cet appareil est également équipé d'un tube à anticathode de cuivre (porté à une tension et une intensité de 40 kV et 30 mA respectivement) en utilisant le rayonnement $\text{CuK}\alpha_1$, $\lambda = 1,54158$ Å. Le rayonnement X issu de ce tube est diffracté par un monochromateur en Germanium

puis transmis à travers l'échantillon. Ce même monochromateur permet d'isoler la raie $K\alpha_1$ du cuivre. Par conséquent, le détecteur ne reçoit des photons issus de ces transitions que s'ils résultent d'une interaction élastique. Un tel montage conduit à un excellent rapport signal/bruit. Les données sont ensuite stockées sous forme numérique dans un micro-calculateur spécialisé, qui gère également les mouvements du goniomètre et la recherche automatique des raies de diffraction.

L'enregistrement d'un diagramme de diffraction X nous permet de :

- Confirmer la présence des pics caractéristique de la phase HDL,
- Connaitre la localisation des antibiotiques.

II.2. Spectroscopie infrarouge (IR)

La spectroscopie infrarouge est une analyse complémentaire de la diffraction des rayons X. C'est une technique locale qui fournit des informations sur la nature des liaisons chimiques de l'échantillon. Par ailleurs, les bandes observées sur les spectres IR renseignent souvent non seulement sur le système moléculaire étudié, mais aussi sur son environnement : la position des bandes et leurs intensités relatives sont souvent des sources précieuses d'information. C'est la raison pour laquelle ces méthodes sont largement répandues dans les laboratoires de recherche.

-Principe de la spectroscopie IR : La spectroscopie IR est une technique d'analyse physico-chimique locale basée sur l'interaction du moment dipolaire de la molécule avec le champ électrique de l'onde. Par conséquent, seules les molécules ayant un moment dipolaire permanent pouvant donné lieu à des pics d'absorption du rayonnement IR.

On distingue trois domaines infrarouges : le proche infrarouge : $15000-4000\text{ cm}^{-1}$, le moyen infrarouge : $4000-400\text{ cm}^{-1}$ et l'infrarouge lointain : $400-10\text{ cm}^{-1}$.

Sous l'effet d'un rayonnement électromagnétique infrarouge, les liaisons moléculaires absorbent une partie de cette énergie et vibrent selon des mouvements de différents types. Ces vibrations impliquent une variation du moment dipolaire de la molécule et créent un champ électromagnétique périodique qui absorbe la radiation électromagnétique de même fréquence. L'intensité d'absorption est proportionnelle au carré de la vitesse de variation du moment dipolaire. Les fréquences d'absorption correspondent aux fréquences des vibrations moléculaires.

Pour un groupement chimique donné, les vibrations sont classées en vibrations d'élongation, notées « ν » et de déformation notées « δ ». Le spectre de vibration dépend des forces interatomiques et la spectroscopie infrarouge peut être considérée comme une méthode d'analyse sensible aux environnements locaux. Dans ce travail de thèse, les spectres IR des HDL (en poudre) ont été enregistrés à l'aide d'un spectrophotomètre « NEXUS FTIR Thermo Scientific » en mode réflexion dans la gamme $4000-400\text{ cm}^{-1}$. Les échantillons sont analysés par ATR sur des échantillons en poudre avec un nombre de scan de 265, avec un pas de 0.1 cm^{-1} . Le spectre infrarouge (spectrogramme) obtenu est une courbe d'absorbance de rayonnement en fonction du nombre d'ondes.

Dans ce travail, la spectroscopie infrarouge a été utilisée pour :

- Confirmer la présence des bandes caractéristique de la phase HDL,
- Analyser la présence des antibiotiques dans les phases HDL.

II.3. Spectrophotométrie UV-visible

La spectrophotométrie UV-visible est la technique la plus fiable et la plus utilisée pour quantifier la molécule en solution.

-Principe de la spectrophotométrie : Un spectrophotomètre consiste en une source constituée de deux lampes qui permettent un continuum d'émission sur toute la gamme de longueur d'onde UV-Visible. Un monochromateur permet de sélectionner des longueurs d'ondes et donc de faire un balayage de la gamme en déplaçant ce monochromateur. Le faisceau de photons à la longueur d'onde sélectionnée traverse un miroir qui synchronise le mouvement du monochromateur puis le faisceau traverse l'échantillon et la référence et enfin un amplificateur permet de comparer l'intensité en sortie par rapport à l'intensité d'émission. Ainsi, un spectre d'absorption correspond au tracé de l'absorbance A en fonction de la longueur d'onde λ , qui s'exprime de la manière suivante :

$$A = \log \frac{I_0}{I} \quad (\text{Eq 2.2})$$

Où I_0 l'intensité de la lumière incidente et I l'intensité de la lumière transmise. Pour certaines conditions expérimentales (solution diluée, homogène, non fluorescente), l'absorbance est proportionnelle à la concentration selon la relation de Beer-Lambert (Eq 2.3).

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

Les spectres d'absorption UV-visible des antibiotiques (**Figure 2.1**) sont enregistrés à l'aide d'un spectrophotomètre UV JASCO sur la gamme de longueur d'onde allant de 200 jusqu'à 350 nm pour la nisine (**Figure 2.1A**), de 200 nm jusqu'à 350 nm pour le lysozyme (**Figure 2.1B**), et de 250 nm jusqu'à 400 nm pour les TCH et OXY (**Figure 2.1C**).

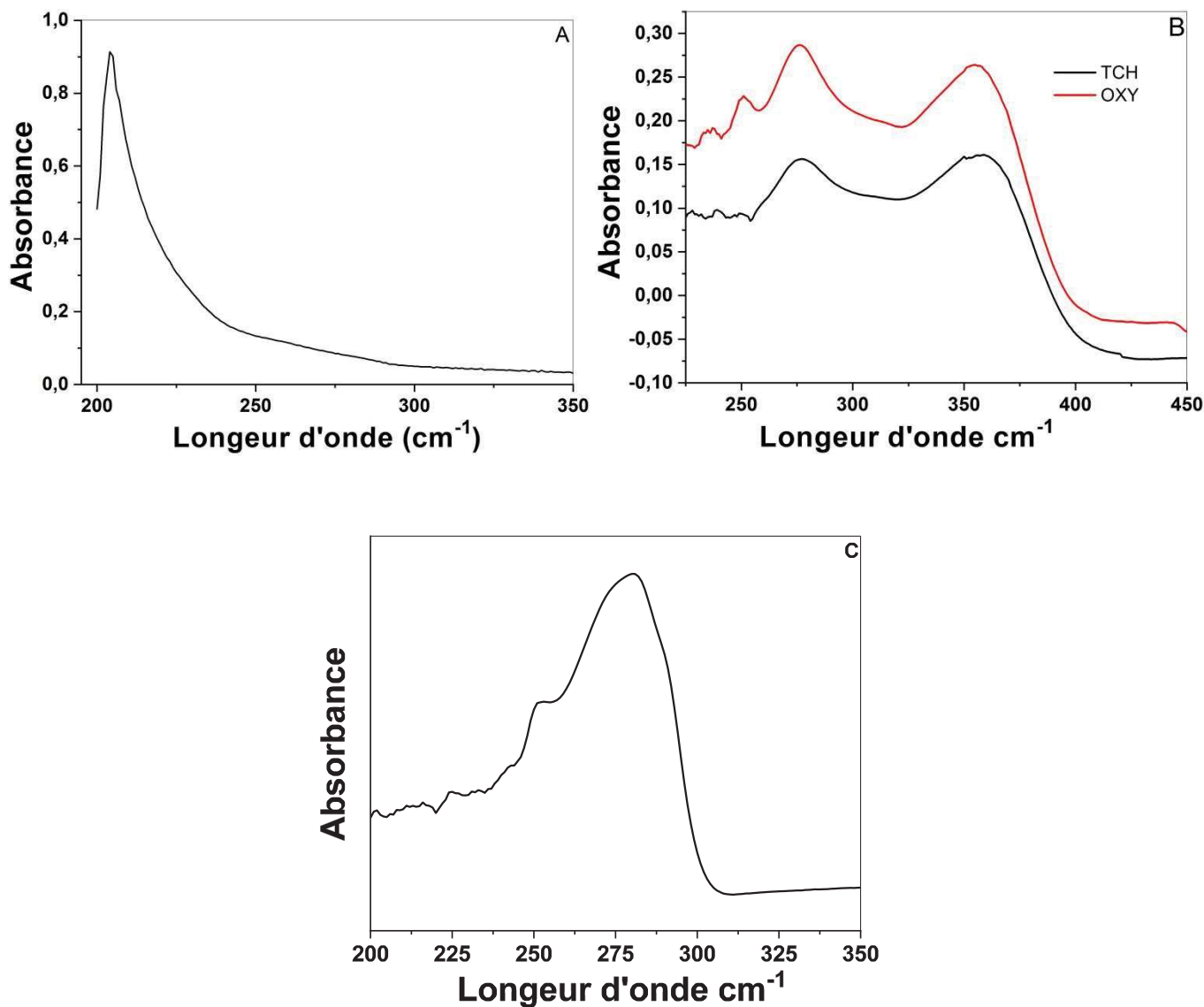


Figure 2.1: Spectres d'absorbance de la nisine 1 mg mL⁻¹ (A), des TCH et OXY à 0,1 mg mL⁻¹(B) et du lysozyme 17mg mL⁻¹ (C).

Tableau 2.1: Paramètres des antibiotiques.

Composé	Epsilon $\epsilon_{\lambda_{max}}$	$\lambda_{max}(\text{nm})$
Nisine (Nis)	0.2	205
Lysozyme (LYS)	36000	280
Tétracycline (TCH)	18.46	265
Oxytétracycline (OXY)	29.073	265

Avec ϵ appelée coefficient d'extinction molaire ou coefficient d'absorption molaire et d'après la loi de Beer-Lambert

$$\epsilon_{\lambda} = \frac{A_{\lambda}}{C L} \quad (\text{Eq 2.3})$$

avec C est la concentration de la solution ; et L est le longueur du cuve

II.4. Fluorescence résolue au cours du temps

Les données de la fluorescence résolue au cours du temps ont été obtenues par la technique de comptage de photons uniques à corrélation temporelle [1, 2]. L'excitation de longueur d'onde a été générée en utilisant un laser SuperK EXTREME (NKT Photonics, modèle EXR-15) en tant que source continue pulsée combinée avec le supercontinuum SuperK EXTEND-UV (NKT Photonics, model DUV); la longueur d'onde a été sélectionnée par couplage à un monochromateur (Jobin-Yvon H10). Le taux de répétition a été fixé à 38,9 MHz ; la durée de l'impulsion d'excitation sur cet appareil est d'environ 6 ps (pleine largeur à mi-hauteur, FWHM). L'émission de fluorescence est détectée, après passage au travers d'un polariseur orienté soit parallèle, perpendiculaire ou à l'angle magique (54.73°) par rapport à la polarisation de l'excitation, sur un détecteur PMT hybride HPM-100-40 (Becker & Hickl).

-Principe de la fluorescence : La fluorescence est un processus extrêmement rapide. Il se place typiquement dans l'échelle de temps de la picoseconde (10^{-12} s) à la nanoseconde (10^{-9} s). Cette résolution est insuffisante pour enregistrer un déclin de fluorescence. Le principe de la technique de comptage de photons uniques corrélés en temps consiste à exciter un échantillon fluorescent par une impulsion lumineuse extrêmement brève (quelques picosecondes), puis à sommer et à classer les photons détectés à partir du décalage en temps de leur émission. Après un nombre important de sommations, on obtient un histogramme qui correspond au déclin de l'état excité. La constante de temps calculée à partir de cet histogramme donne la durée de vie de l'état excité, ou encore durée de vie de fluorescence.

La fluorescence résolue au cours du temps a été utilisée pour analyser le site actif de lysozyme. Elle a prouvé que ce site actif n'est pas complètement dénaturé et qu'il y a une modification au niveau du Trp62 et Trp63.

II.5. Microscopie électronique à balayage (MEB)

La microscopie électronique à balayage (MEB) est une méthode à haute résolution qui est utilisée pour visualiser l'image d'une surface ou d'une coupe transversale d'un film à l'échelle micrométrique ou nanométrique. Elle peut aussi nous renseigner sur la taille des grains.

-Principe du MEB : Le fonctionnement du microscope électronique à balayage MEB est basé sur l'émission d'électrons produits par une cathode et la détection de signaux provenant de l'interaction de ces électrons avec l'échantillon. Ces électrons qui irradient la surface de l'échantillon pénètrent profondément dans le matériau et affectent un volume appelé poire d'interaction. Le volume de cette poire dépend du numéro atomique moyen de l'échantillon et de l'énergie des électrons incidents. Dans ce volume d'interaction les électrons de faisceau vont perdre leur énergie par collisions multiples avec les atomes du

matériau générant ainsi de nombreux phénomènes secondaires : réflexion d'électrons et de photons, absorption d'électrons, courants induits, potentiels électriques, élévation de température locale, vibration du réseau. Le microscope électronique utilisé est un JSM-5400 Jeol dont l'accélération peut aller jusqu'à 10 kV et 15 kV, respectivement.

II.6. Microscopie électronique à transmission (MET)

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

-Principe du MET : Les électrons accélérés sont générés par un canon à électrons comprenant une source et un champ électrique produit par une différence de potentiel entre la source et une anode, puis focalisés sur l'échantillon par des lentilles magnétiques ou électrostatiques. Le faisceau d'électrons interagit avec l'échantillon avec un contraste spatial résultant de différences de densité ou de composition chimique, et est mesuré par un détecteur permettant ainsi de former une image de l'échantillon. Les analyses par microscopie électronique à transmission ont été effectuées avec un microscope JEOL 100CX à l'UPMC. Les échantillons ont été préparés sous forme de poudre puis mis en suspension dans de l'éthanol et ensuite déposés sur des grilles de cuivre de 400 mesh et enfin recouverts d'une membrane de carbone ultraminces de 2-3 nm d'épaisseur.

II.7. Microscope à force atomique AFM

La microscopie à force atomique (AFM : Atomic Force Microscopy) fait partie de la famille des microscopies à champ proche (ou microscopies à sonde locale). Les images en

trois dimensions sont obtenues par balayage d'une surface à l'aide d'une sonde. La technique AFM exploite l'interaction (attraction/répulsion) entre les atomes de l'apex nanométrique d'une pointe et les atomes surfaciques d'un échantillon. Elle permet d'analyser des zones allant de quelques nanomètres à quelques microns de côtés et de mesurer des forces de l'ordre du nanonewton.

Le principe de l'AFM est de balayer la surface d'un échantillon à l'aide d'un levier muni d'une pointe pour en avoir une image en trois dimensions avec une résolution spatiale allant de quelques dizaines de microns au dixième de nanomètre. Dans ce travail des mesures de microscopie à force atomique (AFM) ont été effectuées sur un microscope de déviation optique (Dimension 3100 Veeco Instruments avec un Nanoscope IIIa, instrument numérique).

Dans ce travail, le microscope à force atomique a été utilisé pour :

-Estimer la dureté locale et l'organisation de la surface de notre matériau

Les échantillons ont été préparés comme suit: une solution diluée d'amyloïde (1000 x dans l'eau) a été dialysée (Cellu-Sep, MWCO 4000-6000) contre de l'eau pendant 2 h afin d'augmenter le pH de 2 à 7 et éliminer le sel. Une goutte de solution est ensuite déposée sur du mica fraîchement clivé et séché.

II.8. Diffusion dynamique de la lumière DLS

La diffusion dynamique de la lumière DLS est une technique d'analyse spectroscopique non destructive permettant d'accéder à la taille de particules en suspension dans un liquide ou de chaînes de polymère en solution de 1 à 500 nm de diamètre environ.

Le principe de la DLS : Le mouvement brownien des particules ou molécules en suspension engendre la diffusion de la lumière laser à différentes intensités. L'analyse de ces fluctuations d'intensité permet d'obtenir la vitesse du mouvement brownien et, partant, la taille des

particules à l'aide de la relation de Stokes-Einstein. Cette technologie nous permet d'avoir une :

- Analyse précise, fiable et reproductible de la taille des particules en une ou deux minutes.
- Mesure dans l'environnement de base du matériau.
- Réglage simple et mesure entièrement automatisée.
- Mesure de la taille à partir de < 1 nm.
- Mesure de la taille des molécules avec $MW < 1000$ Da.

Dans ce travail, la diffusion dynamique de la lumière a été utilisée pour estimer la constante de diffusion du monomère lysozyme dans la solution de PBS.

III. Synthèse des phases HDL de référence

III.1. Synthèse des HDL par coprécipitation

La synthèse par coprécipitation est la méthode la plus utilisée pour préparer un HDL (Hydroxyde Double Lamellaire). Elle a été développée par Miyata [3]. Elle consiste à précipiter simultanément des cations métalliques divalents et trivalents (pris en portion adéquate) par l'ajout d'une solution basique (NaOH, NH₄OH, KOH, Na₂CO₃...). L'addition simultanée des deux réactifs permet de maintenir le pH constant pour favoriser l'obtention de phases homogènes. Cette méthode conduit à l'intercalation directe de l'anion désiré au cours de la formation de la charpente inorganique. La réaction s'effectue sous agitation magnétique pour homogénéiser le milieu. Afin d'éviter l'intercalation d'anions carbonate, la synthèse s'effectue sous flux d'azote. Le produit final est séparé par centrifugation et mis en suspension dans l'eau déionisée pour éliminer les résidus de synthèse. Cette étape est répétée plusieurs fois (**Figure 2.2**).

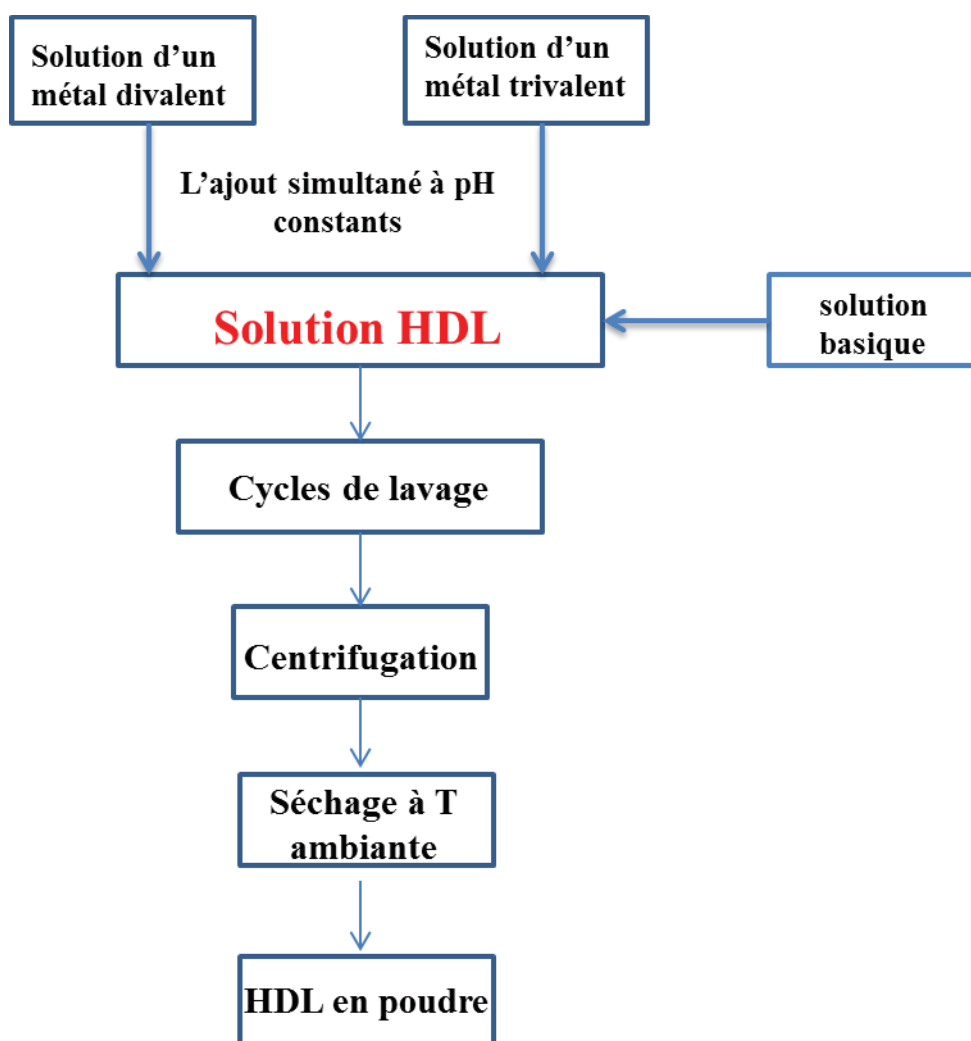


Figure 2.2: Présentation schématique du protocole de synthèse des HDL par coprécipitation.

Mode opératoire : 50 mL d'une solution de sels métalliques divalents et trivalents ($M^{II} + M^{III}$) de concentration totale 1 M avec un rapport molaire $M^{II}/M^{III} = 2$ ou 3 ou 4 est ajoutée à débit constant ($0,12 \text{ mL min}^{-1}$) dans un réacteur fermé (**Tableau 2.2**). Pour maintenir le pH constant, une solution de soude (NaOH) de concentration 2 M est ajoutée. La mixture est maintenue sous agitation magnétique ($400 \text{ tours min}^{-1}$) à température ambiante pour un temps de 7 h. La réaction se fait sous flux d'azote. Le dispositif utilisé contient une pompe seringue liée à un régulateurs pH-mètre (α lpha-pH1000 EUTECH instrument) (**Figure 2.3**). Il permet de régler le débit des solutions de sels et de soude. Le produit final est récupéré après 6 cycles

de lavage avec l'eau déionisée suivi de 20 min de centrifugation à 7000xg. Enfin, les HDL sont séchés à l'air, et à température ambiante.

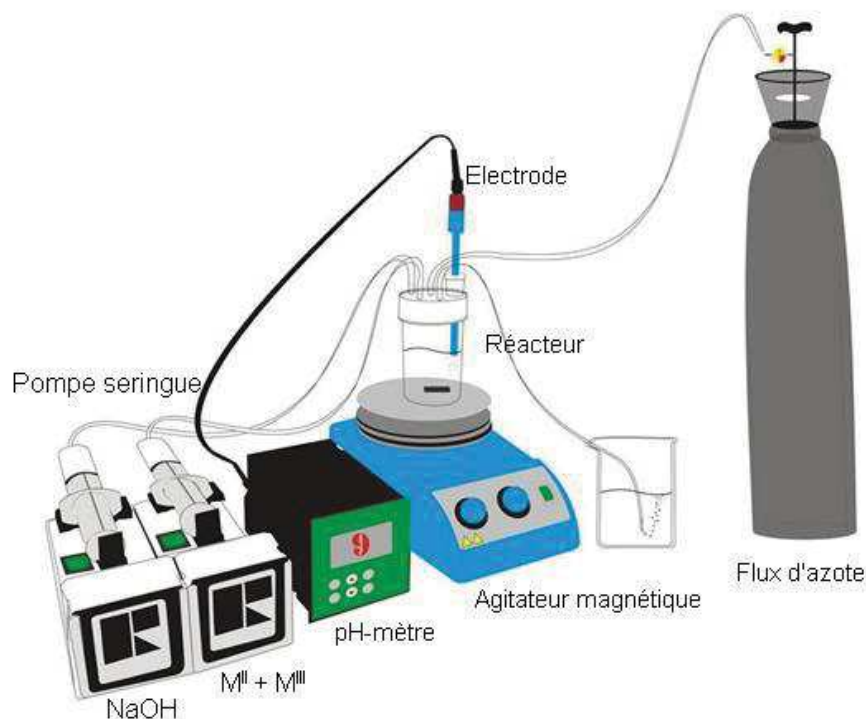


Figure 2.3: Dispositif expérimental utilisé pour la synthèse des composés HDL [4].

Tableau 2.2: Paramètres de coprécipitation mis en œuvre pour la synthèse des HDL de référence.

Echantillons	M ^{II} /M ^{III}	Sel		NaOH	Na ₂ CO ₃	pH
		M ²⁺ Cl	M ³⁺ Cl ₂			
ZnAl-Cl	2	0.66	0.33	2	-	7.5±0.3
	3	0.75	0.25	2	-	7.5±0.3
	4	0.80	0.20	2	-	7.5±0.3
ZnAl-CO ₃	2	0.66	0.33	2	0.5	7.5±0.3
MgAl-Cl	2	0.66	0.33	2	-	9.5±0.5
NiAl-Cl	2	0,66	0,33	2	-	10±0.5
MnAl-Cl	2	0,66	0,33	2	-	10±0.5

III.2. Synthèse des HDL par décomposition thermique de l'urée

La méthode par décomposition thermique de l'urée permet d'obtenir une taille des particules mono-dispersées [5]. Le protocole consiste, à utiliser l'urée pour générer une base : en effet, à des températures supérieures à 90 °C (**Figure 2.4**), l'urée se décompose et libère des OH⁻ qui vont réagir avec les sels métalliques. Plus la température est élevée plus la précipitation de la phase HDL sera rapide. L'inconvénient majeur de cette méthode provient de la génération *in-situ* d'anions carbonates très favorables à l'intercalation dans les HDL.

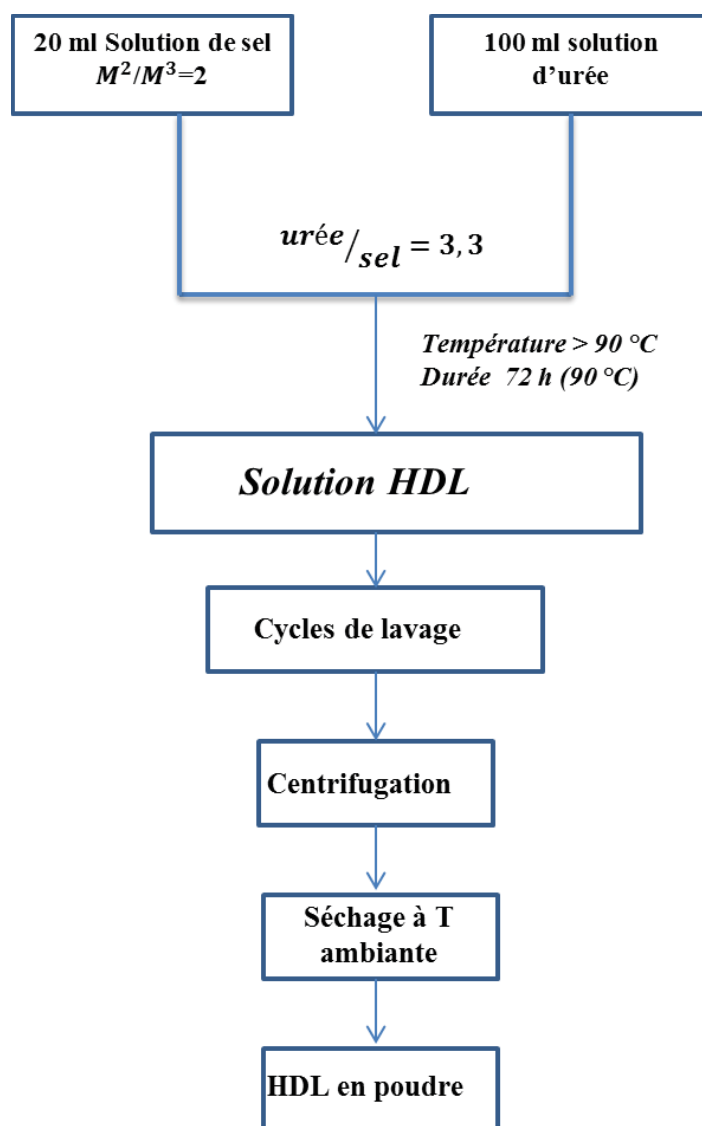


Figure 2.4: Présentation schématique du protocole utilisée pour la synthèse de la phase HDL à partir d'urée.

Mode opératoire : 50 mL d'une solution de Zn^{2+} et Al^{3+} avec un rapport $Zn^{2+}/Al^{3+} = 2$ et de concentration 1 M est ajoutée dans 100 mL d'eau décarbonatée contenant de l'urée dissoute avec un rapport $[urée]/[sels] = 3,3$. Le mélange réactionnel est alors placé à reflux (90°C ou 100°C) (**Figure 2.5**). Finalement, le milieu réactionnel est refroidi sous courant d'eau froide. Le produit obtenu est alors centrifugé et lavé 3 fois avec de l'eau déionisée puis séché à l'air à température ambiante [6].

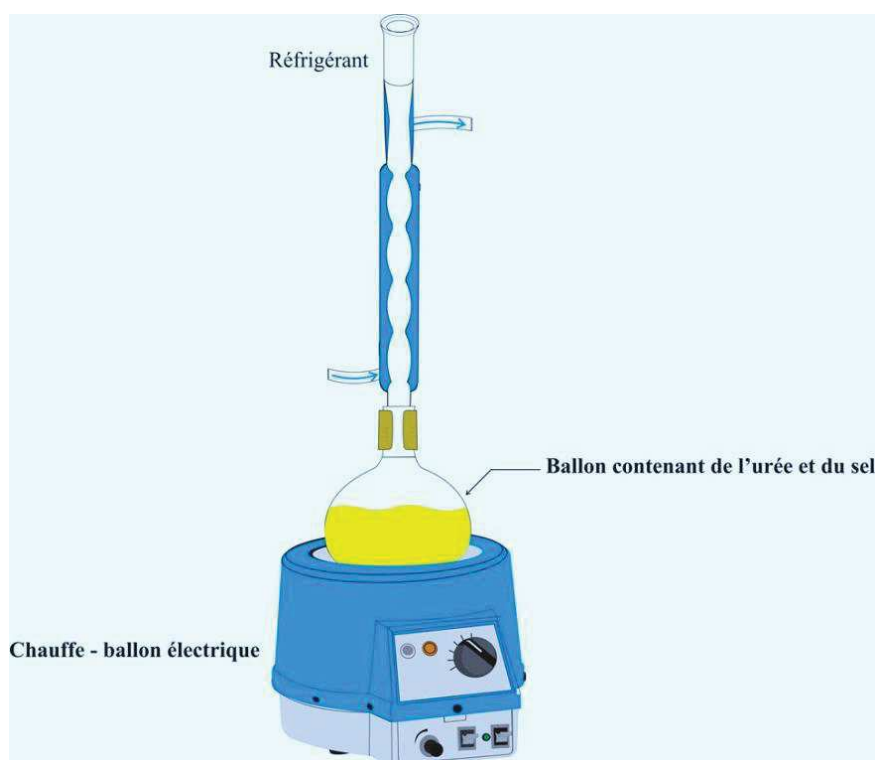


Figure 2.5: Dispositif expérimental utilisé pour la synthèse des composés HDL par la méthode de décomposition de l'urée.

III.3. Synthèse des différents matériaux HDL-antibiotiques

Pour la préparation des matériaux HDL-antibiotiques : HDL-nisine, HDL-lysozyme et HDL-TCH et HDL-OXY, nous avons utilisé les méthodes les plus courantes : l'échange anionique et la méthode de coprécipitation.

III.3.1 HDL-nisine

-Purification de la nisine : La nisine a été dissoute dans du PBS (pH=7,4) puis centrifugée à 5000 tours min^{-1} pendant 10 min afin d'éliminer les protéines insolubles. Ensuite, le surnageant a été filtré au travers de membranes stérilisantes de diamètre de pores 0,22 μm (Millipore Express PES Membrane). Les solutions de nisine purifiées ont été conservées à 4°C jusqu'à utilisation.

Les matériaux HDL-nisine ont été préparé par échange anionique (**Figure 2.6**) : 50 mg de précurseurs HDL (**préparés par coprécipitation selon la section III.1**) sont ajoutés avec une solution de nisine de concentration C_i (de 0.5-5 mg mL^{-1}). La solution est mise sous agitation à 23°C dans un erlenmeyer fermé pendant 4 h (temps de contact). Puis la suspension a été centrifugée à 1600 tours min^{-1} pendant 15 min, lavée à l'eau déionisé 18 M Ω et finalement séchée à l'air à température ambiante pendant 24 h.

III.3.2 HDL-Lysozyme

Les matériaux HDL-lysozyme ont été préparés par échange anionique (**Figure 2.6**) : 5 mg de HDL (**préparés par coprécipitation section III.1**) sont ajoutés à 50 μL de lysozyme de concentration 17 mg mL^{-1} . Après l'immobilisation de la protéine, pour un temps de contact de 24 h, la suspension a été centrifugée à 16000xg pendant 15 min, lavée deux fois à l'eau déionisée, puis filtrée sous vide. Enfin, le concentrât est séché sous flux d'air à température ambiante pendant 24 h.

III.3.3 HDL-TCH et HDL-OXY

-Préparation des antibiotiques : Des solutions mères de tétracycline (TCH) et d'oxytétracycline (OXY) ont été séparément préparées en dissolvant ces antibiotiques dans de l'eau déionisée 18 M Ω . Ces solutions mères ont été conservées à 4°C jusqu'à leur utilisation.

Pour la synthèse des HDL-TCH et HDL-OXY, nous avons utilisé deux méthodes de synthèses.

-Par méthode de coprécipitation : L'immobilisation de TCH et d'OXY a été effectuée par coprécipitation dans la phase HDL Zn_2Al en présence de TCH ou d'OXY suivant le protocole décrit ci-dessus (**section III.1**). Typiquement, 10 mL de $ZnCl_2$ et $AlCl_3$ 0,1 M avec un rapport molaire 2:1 ont été ajoutés lentement à une seconde solution de NaOH 0,2 M avec un débit constant dans un réacteur fermé. Ensuite, 60 mg d'antibiotique (TCH ou OXY) ont été ajoutés. Le pH du système résultant a été maintenu à $7,50 \pm 0,3$ sous agitation magnétique et sous flux d'azote pendant 24 h. Le produit final a été centrifugé à 16000xg pendant 15 min, lavé à l'eau distillée et finalement séché à l'air à température ambiante pendant 24 h. Les matériaux résultants sont notés respectivement Zn_2Al_{cop} -TCH et Zn_2Al_{cop} -OXY.

-Par méthode d'échange anionique : Pour l'immobilisation par échange anionique (**Figure 2.6**), 10 mL d'antibiotique de concentration C_i (0,1 ; 0,3 et 0,5 mg mL⁻¹) ont été ajoutés à une suspension de 10 mg de Zn_2Al (**préparer par coprécipitation selon la section III.1**) sous agitation magnétique à 23°C pendant 24 h. Puis la suspension a été centrifugée à 16000xg pendant 15 min, lavée à l'eau distillée et finalement séchée à température ambiante pendant 24 h. Les matériaux résultants sont notés respectivement Zn_2Al_{exc} -TCH et Zn_2Al_{exc} -OXY.

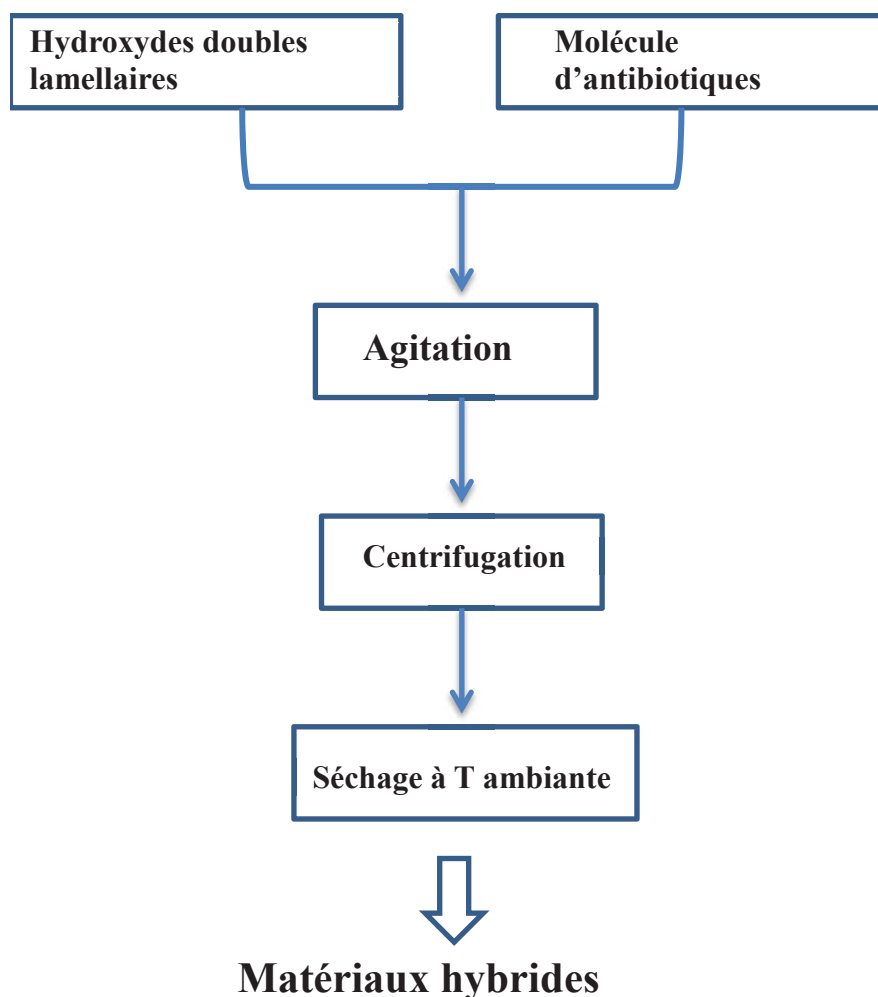


Figure 2.6: Présentation schématique du protocole de synthèse des matériaux HDL-antibiotiques par échange anionique.

IV. Adsorption/désorption

IV.1. Cinétiques d'adsorption

La méthode d'adsorption consiste à additionner une masse m (mg) d'HDL à un volume V (mL) de solution de molécule ajoutée d'antibiotique (TCH, OXY, nisine et lysozyme) de concentration connue C_i (mg mL^{-1}), dans une erlenmeyer en verre fermé, sous agitation, à température constante 23°C pendant un temps $t=24$ h. On effectue chaque fois un prélèvement de la solution à un temps t bien déterminer On sépare, le solide par centrifugation à $1600xg$ pendant 20 min. La concentration d'antibiotique C_t (mg mL^{-1}) (concentration à l'équilibre

dans la solution) est analysée par absorbance. La différence entre la concentration initiale et la concentration à l'équilibre (**Eq 2.4**), nous permet de déterminer la concentration de la molécule adsorbée par masse d'argile Γ_e (mg mg^{-1}) donnée par la relation suivante :

$$\Gamma_t = (C_i - C_t) * \frac{V}{m} \quad \text{(Eq 2.4)}$$

Ce qui nous permet de tracer les cinétiques d'adsorption avec Γ_t en fonction du temps t .

IV.2. Désorption

-Relargage de nisine : Le test de libération de la nisine adsorbée a été effectué à température constante 23°C. Une quantité de 5 mg de nisine encapsulée a été dispersée dans 10 mL de milieu tampon PBS (0,01 M, pH 7,4) puis placée dans une membrane de dialyse immergée dans 200 mL de PBS sous agitation continue à une vitesse lente de 470 tours min^{-1} . A des intervalles de temps prédéterminés. Le solide a été prélevé pour mesurer la quantité de nisine diffusée à partir de la membrane de dialyse [7, 8].

-Relargage de l'antibiotique tétracycline (TCH) et oxytétracycline (OXY) : La cinétique de libération du TCH et OXY ont été évaluée. Ces expériences ont été réalisées dans un tampon HEPES 10 mM à pH 7 durant 24 h. Les quantités de TCH et d'OXY libérées ont été mesurées par la méthode de déplétion du surnageant. 20 mg de TCH ou OXY immobilisé ont été dispersés dans 20 mL de tampon HEPES à 37°C sous agitation continue à une vitesse lente de 600 tours min^{-1} . A différents intervalles de temps, un aliquot de solution a été prélevés. Le matériau a été éliminé par centrifugation et la concentration en antibiotique dans le surnageant a été obtenu à partir d'une mesure de l'absorbance à 265 nm.

V. Etude de l'activité antibactérienne des matériaux HDL-antibiotiques

V.1. Germes testés

Trois souches bactériennes de référence fournies par le Laboratoire de Bactériologie de l'Institut de Pasteur (Lyon, France) et la banque de culture DSMZ (Allemagne) ont été mises en œuvre dans les essais de caractérisation de l'activité antibactérienne des matériaux HDL-antibiotiques :

- Deux bactéries de Gram positif : *S. epidermidis* et *M. luteus*
- Une bactérie de Gram négatif : *E. coli*

V.2. Méthodes utilisées

En fonction du mode d'action et du poids moléculaire de l'antibiotique adsorbé sur les phases HDL, différentes méthodes ont été utilisées. En effet, lorsqu'ils sont classés selon leurs activités, deux types d'antibiotiques se distinguent (**voir chapitre 1 section III**) :

- les antibiotiques bactériostatiques qui vont inhiber la croissance bactérienne,
- les antibiotiques bactéricides qui vont détruire les bactéries.

Si l'antibiotique a un mode d'action bactériostatique, les performances du matériau HDL-antibiotique seront alors évaluées sur une culture bactérienne en conditions de croissance. Si l'antibiotique a un mode d'action bactéricide, les essais seront alors réalisés avec des bactéries ayant atteint une phase stationnaire (c'est-à-dire lorsqu'il n'y a plus de croissance bactérienne). Chacun des tests discutés précédemment peuvent être conduits en voie solide (c'est-à-dire sur un milieu gélosé) ou en voie liquide. La voie solide est plus rapide à mettre en œuvre. Néanmoins, une voie solide ne pourra être retenue que si le poids moléculaire de l'antibiotique est suffisamment faible pour permettre sa diffusion dans la gélose.

Au cours de ce travail, nous avons utilisé trois types d'antibiotiques : (i) **le lysozyme (LYS)** qui est un antibiotique protéique bactéricide de haut poids moléculaire (14,4 kDa), (ii) **la nisine (NIS)**, qui est un antibiotique polypeptidique bactéricide de poids moléculaire intermédiaire (3,5 kDa) et (iii) **la tétracycline (TCH) et l'oxytétracycline (OXY)**, des antibiotiques de la famille des cyclines, qui sont bactériostatiques et qui ont de faibles poids moléculaires (environ 450 Da).

Par conséquent, des essais en voie solide ont été privilégiés pour la nisine et les antibiotiques de type cyclines alors que des essais en voie liquide ont été conduits avec le lysozyme (**Tableau 2.3**). Les souches bactériennes ont été choisies en fonction du spectre d'activité des antibiotiques testés : des bactéries à Gram positif pour la nisine et le lysozyme et des bactéries de Gram négatif et positif pour TCH et OXY. Des tests préalables ont montré que l'activité antibactérienne de la nisine envers *S. epidermidis* n'était pas visible, ce qui a conduit à utiliser *M. luteus* qui est plus sensible à l'action de la nisine.

Tableau 2.3: Type de tests réalisés en fonction de l'antibiotique adsorbé sur phase HDL.

Antibiotique	Test	Voie	Souche
Nisine (NIS)	Bactéricide	Solide	<i>M. luteus</i>
Tétracycline (TCH) et Oxytétracycline (OXY)	Bactériostatique	Solide	<i>E.coli</i> et <i>S. epidermidis</i>
Lysozyme (LYS)	Bactéricide	Liquide	<i>S. epidermidis</i>

V.2.1. Culture bactérienne

Quelle que soit la bactérie mise en œuvre (*S. epidermidis*, *M. luteus* et *E. coli*), les cultures ont toutes été préparées à partir d'aliqots de bactéries conservées à -20°C (**Figure 2.7**). Les aliqots sont d'abord réhydratés (20 % v/v) dans du milieu Luria Broth Miller (LB) pendant 3 h à 37°C sous agitation constante (110 tours min⁻¹). L'aliqot réhydraté est ensuite utilisé pour

inoculer un milieu LB frais (5% v/v) qui est incubé à 37°C sous agitation constante (110 tours min⁻¹) jusqu'à ce que la bactérie atteigne la phase stationnaire de croissance (**Figure 2.7**). La densité optique à 600 nm (DO₆₀₀) est alors mesurée pour déterminer la concentration bactérienne, sur la base de corrélations préalablement établies au Laboratoire. La concentration bactérienne obtenue est toujours de l'ordre 10⁹ UFC mL⁻¹ pour *S. epidermidis* et *E. coli* (correspondant à une DO₆₀₀ de 5 environ) et de 10⁸ UFC mL⁻¹ pour *M.luteus* (correspondant à une DO₆₀₀ de 0,4 environ).

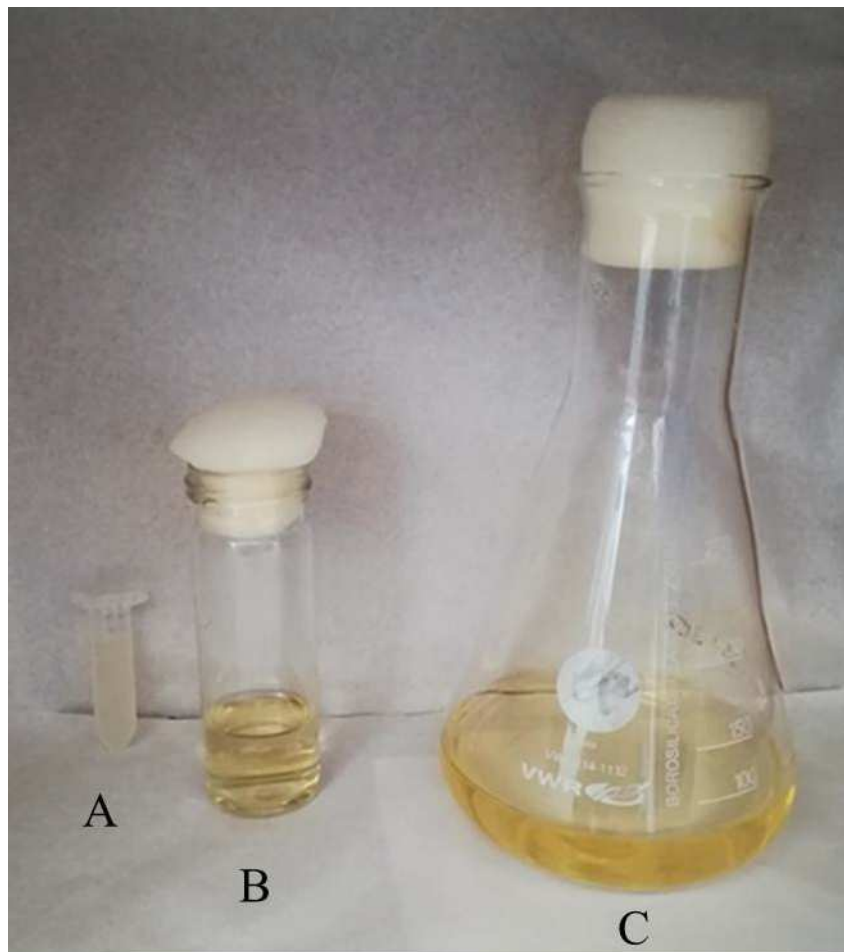


Figure 2.7: Protocole détaillé pour la préparation de la souche bactérienne. (A)^o aliquot de la bactérie conservé à -20°C, (B) réhydratation de la bactérie (20 % v/v) dans du milieu (LB) et (C) réhydratation et inoculation de la bactérie dans un milieu LB frais (5% v/v).

V.2.2. Test bactéricide en voie solide (nisine)

Pour ce test, 100 μL d'une culture bactérienne de *M. luteus* (**obtenue selon le protocole décrit en section V.2.1**) sont déposés sur des géloses de LB (préparées avec 15 g L^{-1} d'agar) puis les géloses sont incubées pendant une nuit dans une étuve aérée à 30°C pour permettre la formation d'un tapis bactérien stable dans le temps (correspondant à une phase stationnaire). Puis, 20 μL d'une solution de nisine libre ou d'une suspension de matériau HDL-nisine sont déposés au centre du tapis bactérien (ou biofilm). Les géloses sont alors incubées à 30°C pendant 24 h. Chaque expérience est tripliquée et les zones d'inhibition obtenues sont mesurées à l'aide d'une règle graduée (**Figure 2.8**). Ces mesures permettent d'accéder à une activité moyenne sur 24 h. Néanmoins, les zones d'inhibition peuvent être mesurées au cours du temps pour caractériser la cinétique d'action antibactérienne. Des témoins négatifs (sans bactéries et sans matériau) et des témoins positifs (avec bactéries mais sans matériau) sont toujours réalisés en parallèle.

V.2.3. Test bactériostatique en voie solide (TCH et OXY)

Des suspensions bactériennes de *S. epidermidis* et d'*E. coli* sont d'abord préparées séparément dans de l'eau de source pour éviter la présence d'éléments nutritifs dans la suspension et maîtriser ainsi les cinétiques de croissance des bactéries sur les géloses nutritives. Pour ce faire, les cultures de *S. epidermidis* et d'*E. coli* sont centrifugées pendant 20 min à 4°C et 4500 tours min^{-1} pour séparer les bactéries du milieu de culture LB. Après centrifugation, les culots bactériens récupérés sont suspendus séparément dans de l'eau de source (Cristalline, France: $[\text{Ca}^{2+}] = 39 \text{ mg L}^{-1}$, $[\text{Mg}^{2+}] = 25 \text{ mg L}^{-1}$, $[\text{Na}^+] = 19 \text{ mg L}^{-1}$, $[\text{K}^+] = 1,5 \text{ mg L}^{-1}$, $[\text{F}^-] < 0,3 \text{ mg L}^{-1}$, $[\text{HCO}_3^-] = 290 \text{ mg L}^{-1}$, $[\text{SO}_4^{2-}] = 5 \text{ mg L}^{-1}$, $[\text{Cl}^-] = 4 \text{ mg L}^{-1}$, $[\text{NO}_3^-] < 2 \text{ mg L}^{-1}$) pour obtenir une DO_{600} de 0,5 (correspondant à une concentration de l'ordre de 10^8 UFC mL^{-1}).

Pour évaluer l'activité bactériostatique des antibiotiques TCH et OXY (seuls ou adsorbés), 100 μL de suspension bactérienne (respectivement de *S. epidermidis* et d'*E. coli*) sont étalés sur une gélose nutritive LB. Après 2-3 min à température ambiante (qui permet à la suspension déposée d'imbiber la gélose), un spot de 20 μL d'une solution d'antibiotique seul ou d'une suspension de matériaux HDL-antibiotique est déposée au centre de la gélose. Les géloses sont alors incubées à 37°C pendant 24 h. Chaque expérience est tripliquée et les zones d'inhibition obtenues sont mesurées à l'aide d'une règle graduée (**Figure 2.8**). Des témoins négatifs et positifs sont toujours réalisés en parallèle.

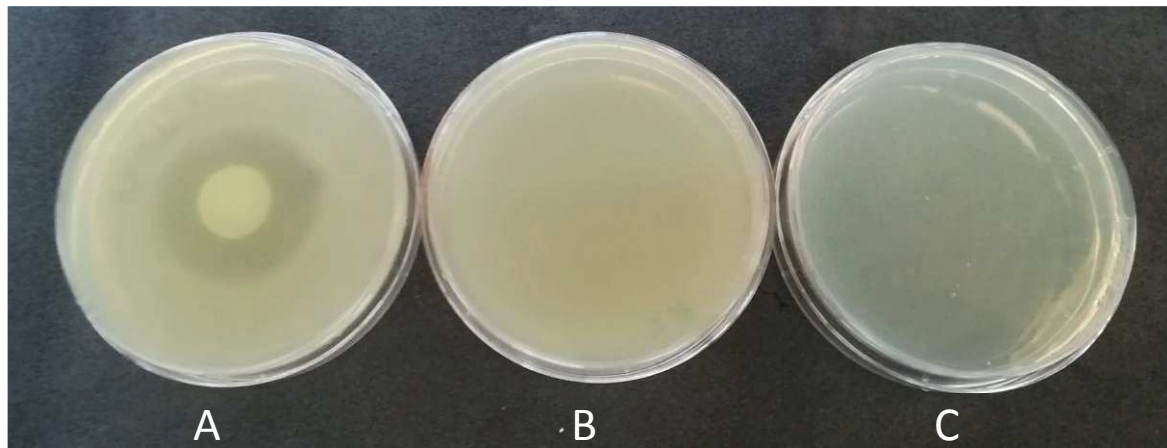


Figure 2.8: Principe de la méthode de diffusion par disque (A) matériaux HDL-ATB, (B) témoin positif et (C) témoin négatif.

V.2.4. Test bactéricide en voie liquide (lysozyme)

Comme dans la section V.2.3, une suspension bactérienne de *S. epidermidis* est d'abord préparée dans de l'eau de source pour éviter la présence d'éléments nutritifs dans la suspension qui pourraient permettre le développement bactérien dans le réacteur. Après centrifugation, le culot bactérien récupéré est suspendu dans de l'eau de source pour obtenir une concentration en bactéries d'environ 10^4 UFC mL^{-1} . La suspension bactérienne obtenue est alors immédiatement utilisée pour les tests antimicrobiens.

Les tests ont été réalisés dans des erlenmeyers en verre (25 mL), fermés par des bouchons perméables à l'air dont la porosité permet d'assurer aussi la stérilité du réacteur. Dans chaque réacteur, 9 mL de suspension bactérienne sont mélangés avec 1 mL de solution de lysozyme libre ou 1 mL de suspension de HDL-LYS (dont la concentration en lysozyme équivalente est de $45,6 \text{ mg L}^{-1}$) [9]. Les réacteurs sont placés dans un incubateur rotatif, sous agitation constante ($110 \text{ tours min}^{-1}$) à une température de 25°C ou 37°C , et incubés pendant 24 h. Des réacteurs de contrôles sont également mise en œuvre simultanément dans les mêmes conditions opératoires : (i) bactérie sans aucun matériaux et (ii) bactéries avec phase HDL seule. Chaque essai est dupliqué.

La concentration bactérienne est mesurée dans le réacteur initialement et au bout des 24 h d'incubation. L'évolution de la concentration en bactéries est corrélée aux performances bactéricides des matériaux testés. L'abattement bactérien (%) est défini comme le rapport entre la diminution de la concentration bactérienne sur 24 h et la concentration initiale ; la diminution de la concentration en bactéries sur 24 h étant la différence entre la concentration initiale et la concentration à 24 h.

Les concentrations sont déterminées par une méthode usuelle de comptage sur géloses (ou sur boîtes). Chaque échantillon est dilué par décades dans de l'eau de source jusqu'à la concentration. Chaque dilution est étalée sur des géloses nutritives de LB et les géloses sont incubées à 37°C pendant 24 h pour permettre le comptage des colonies bactériennes. Sachant qu'une colonie compte pour une bactérie initiale, la concentration bactérienne dans les échantillons est calculée comme le nombre moyen de colonies comptées divisé par le volume inoculé sur les géloses de LB, en prenant en compte le facteur de dilution. La limite de quantification est de 10 UFC.mL^{-1} . La concentration bactérienne initiale moyenne dans les réacteurs était de $3,6 \pm 0,3 \cdot 10^4 \text{ UFC mL}^{-1}$.

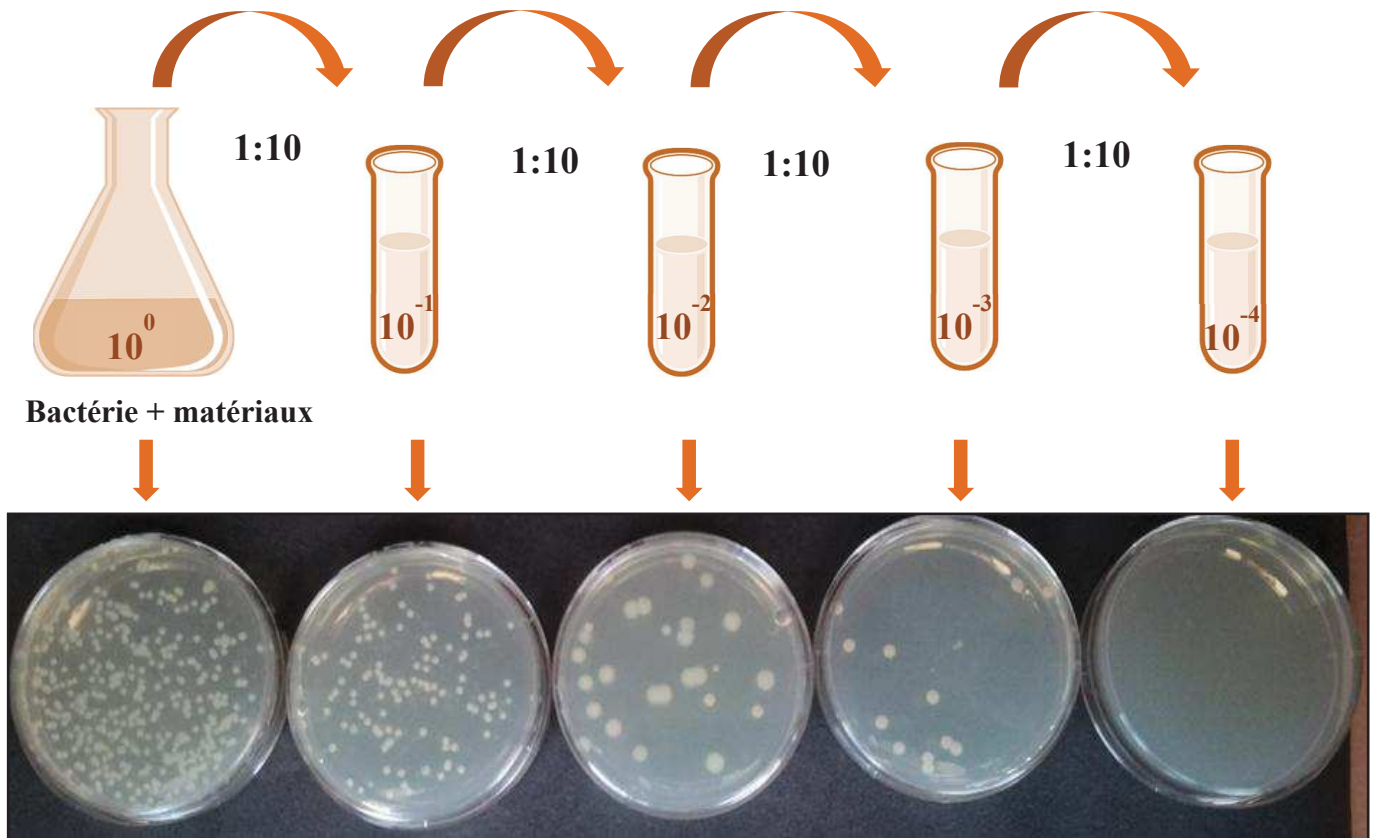


Figure 2.9: Principe de la méthode de dénombrement bactérien.

V.3. Test *t*.Student

Le test *t*.Student (ou test *t*) est un test statistique paramétrique qui repose sur les comparaisons de moyennes de deux séries indépendantes ou appariées. Deux séries indépendantes correspondent à deux groupes différents alors que deux séries appariées correspondent à un même groupe mais à des temps différents. Le test de Student permet de dire si les séries étudiées sont différentes et si oui, dans quelle mesure elles le sont. Le score *t* est défini comme le rapport entre la différence de moyenne entre les deux séries et la différence maximum par rapport à la moyenne au sein de la série. Plus le score *t* est grand et plus les séries sont différentes. Chaque score *t* a une valeur *p* qui lui est associée. Cette valeur *p* correspond à la probabilité que les résultats des séries obtenus soient aléatoires. Les valeurs de probabilité *p* varient entre 0 et 100 % et sont généralement données en valeurs décimales (par

exemple, 5 % est 0,05). Plus les valeurs de probabilité sont faibles et plus les différences entre séries sont fiables. Dans la plupart des cas, une valeur de 0,05 est communément admise comme pour conclure à la significativité.

VI. Références

1. Thangaraj, V., et al., *Fluorescence Quenching of Sulfo-rhodamine Dye over Graphene Oxide and Boron Nitride Nanosheets*. European Journal of Inorganic Chemistry, 2016. **2016**(13-14): p. 2125-2130.
2. Balme, S., et al., *Highly efficient fluorescent label unquenched by protein interaction to probe the avidin rotational motion*. Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry, 2006. **184**(1): p. 204-211.
3. OKADA, M.S.a.A., *SYNTHESIS OF HYDROTALCITE-LIKE COMPOUNDS AND THEIR PHYSICO-CHEMICAL PROPERTIES-- THE SYSTEMS Mg^{2+} - Al^{3+} - SO_4^{2-} AND Mg^{2+} - Al^{3+} - CrO_4^{2-}* . Clays and Clay Minerals, 1976. **25**: p. 14-18.
4. Dejjebi, M.A., *Les Hydroxydes Doubles Lamellaires au coeur de la biotechnologie Evaluation des applications médicales et environnementales*. Thèse de doctorat 2017
5. Costantino, U., et al., *New Synthetic Routes to Hydrotalcite-Like Compounds – Characterisation and Properties of the Obtained Materials*. European Journal of Inorganic Chemistry, 1998. **1998**(10): p. 1439-1446.
6. Vial, S., *Immobilisation d'Enzymes dans des Hydroxydes Doubles Lamellaires. Réalisation de Biocapteurs pour la détection de polluants organiques*. Thèse de doctorat 2005.
7. Bernela, M., et al., *Synthesis, characterization of nisin loaded alginate–chitosan–pluronic composite nanoparticles and evaluation against microbes*. LWT - Food Science and Technology, 2014. **59**(2, Part 1): p. 1093-1099.
8. Kaur, H., et al., *Carboxymethyl tamarind kernel polysaccharide nanoparticles for ophthalmic drug delivery*. International Journal of Biological Macromolecules, 2012. **50**(3): p. 833-839.
9. Yang, Q.-Z., Y.-Y. Chang, and H.-Z. Zhao, *Preparation and antibacterial activity of lysozyme and layered double hydroxide nanocomposites*. Water Research, 2013. **47**(17): p. 6712-6718.

*Chapitre 3 : Etude de
l'adsorption et de l'activité
antibactérienne de la
tétracycline (TCH) et
oxytétracycline (OXY) dans
les hydroxydes doubles
lamellaires.*

I. Introduction

Dans cette partie nous nous sommes intéressés à l'immobilisation de deux antibiotiques de la famille cycline, tétracycline (TCH) et oxytétracycline (OXY) dans la phase Zn_2Al -Cl-HDL. L'objectif de cette étude est de voir l'influence de la localisation des antibiotiques au sein des phases HDL sur leur activité antibactérienne, et si la phase HDL peut protéger les deux antibiotiques de la dégradation thermique et/ou photonique.

Dans cette étude nous avons utilisé deux méthodes de synthèse la coprécipitation et l'échange anionique, les matériaux sont nommés comme suit : Zn_2Al -TCH_{Cop}, Zn_2Al -TCH_{exc}, Zn_2Al -OXY_{Cop} et Zn_2Al -TCH_{exc}. Des analyses structurales ont été effectuées pour déterminer la localisation des deux antibiotiques, et les manipes microbiennes ont été faites avec deux souches différentes, *E.coli* et *S.epidermidis*, pour un stockage des matériaux à haute température (30, 60, 120 °C) et sous l'irradiation de la lumière UV.

Les résultats présentés dans ce chapitre ont fait l'objet d'un article scientifique : « **Dual role of layered double hydroxide nanocomposites on antibacterial activity and degradation of tetracycline and oxytetracycline** » Chemosphere, 206, 2018, 175–183.

II. *Article scientifique: Dual role of layered double hydroxide nanocomposites on antibacterial activity and degradation of tetracycline and oxytetracycline*

Zaineb Bouaziz^{1,2}, Laurence Soussan¹, Jean-Marc Janot¹, Maguy Jaber³, Abdesslem Ben Haj Amara²,

Sebastien Balme¹

Chemosphere 2018 DOI (206), 175-183

Abstract:

The antibiotic intercalation inside the layered double hydroxide (LDH) layers was usually considered for water decontamination but rarely for drug delivery. Here, tetracycline (TCH) and oxytetracycline (OXY) were immobilized in Zn₂Al-Cl LDH following two methods: co-precipitation and anionic exchange. The interfacial concentration of antibiotic varies from 0.04 to 0.5 depending the method of immobilization. The antibiotics are not intercalated in the interlayer space allowing their release in 10 Hours. The antibacterial activity against both *E. coli* and *S. epidermidis* revealed that the loaded antibiotics are still active but less efficient compared to the free ones. After exposition to UV light or to high temperature storage (30, 60 and 120°C), their antibacterial activity significantly decreases due to their degradation especially when antibiotic is loaded on material by co-precipitation. These results are promise to reduce antibiotic contamination in waters.

1

¹ 1 Institut Européen des Membranes, UMR5635, UM, ENSM, CNRS

² Laboratoire de Physique des Matériaux lamellaires et Nanomatériaux hybrides, Faculté des Sciences de Bizerte

³ Sorbonne Université, Laboratoire d'Archéologie Moléculaire et Structurale, CNRS UMR 8220

1. Introduction

Layered Double Hydroxides (LDHs) are natural anionic clays that can be synthesized at laboratory via simple and economically viable methods. They possess feature properties such as large surface areas and high anionic exchange capacities ($2-3 \text{ m}_{\text{eq}} \text{ g}^{-1}$). The current interest of LDHs is based on several properties: (i) adjustable chemical composition of layer and interlayer space (ii) an open structure which can host large range of anionic molecules and (iii) adjustable textural properties controlled by the condition of synthesis. For these reasons, they are of major interests in many application fields such as catalysis, optics, separation technology and medical science [1-3].

The intercalation of antibiotics inside layered materials such as clay minerals and LDHs has been reported for two main applications [4-8] water treatment and drug delivery. At physiologic pH, antibiotics are usually negatively charged and can therefore be intercalated in LDH via anionic exchange or co-precipitation with the metallic cations during synthesis. Several antibiotics were previously considered to charge LDH. The adsorption of chloramphenicol and amoxicillin allow notably to improve their thermal stability [9, 10]. Using gramicidin or amphotericine B which are hydrophobic and amphiphilic respectively allows to control their releasing specifically through lipid membrane or liposome but not in water [11]. The ampicillin which is hydrophilic is easily released in water because it is located on the external surface of Mg/Al-NO₃ LDH. On the contrary, when antibiotics are intercalated in the interlayer space, the releasing is slow as shown for the chloramphenicol in Mg/Al hydrotalcite [12]. The LDHs were also considered with polypeptidic antibiotic such as nisin [13] as well as enzyme such as lysozyme. In the latter case, the antibacterial activity is maintained despite a decrease around 20% of efficiency.

Tetracycline (TCH) and oxytetracycline (OXY) (**Figure 3.1**) are broad spectrum antibiotics. They are among the most used to prevent a variety of microbial infections. According to their

extensive using, their adsorption on layered materials was focused on their removal from water. For this purpose the clay minerals are the most efficient [14-16]. However, the TCH adsorption on Mg/Al hydrotalcites LDH was also considered. It was reported that the TCH affinity with the LDH is improved for high ratio of Mg/Al [17] and acidic medium [18]. The interlayer anion does not seem to interact with the antibiotics but interfere in the adsorption process. It is surprising that the LDH were not considered as host materials for TCH or OXY delivery. Indeed, these hybrid materials could be good candidates to control the antibiotic release and to protect the antibiotic against thermal or UV degradation.

In this work, we studied the immobilization of both tetracycline and oxytetracycline on LDH. Our work aimed to evaluate the impact of the immobilization on the antibacterial activity of the antibiotics and their degradation by temperature and light (UV and visible). For this purpose, TCH and OXY were immobilized onto Zn_2Al-Cl LDH following two methods: coprecipitation and anionic exchange. For the ionic exchange, the kinetic and adsorption isotherms were studied in order to optimize the process. The locations of TCH and OXY were characterized by XRD and TEM. The antibiotic/LDH interactions were studied by time resolved fluorescence. The kinetic of antibiotic release was thereafter evaluated and the antibacterial activity of the materials was studied against *E coli* and *S epidermis*. The stability of the antibiotics loaded on LDH was finally assessed against thermal and UV degradation.

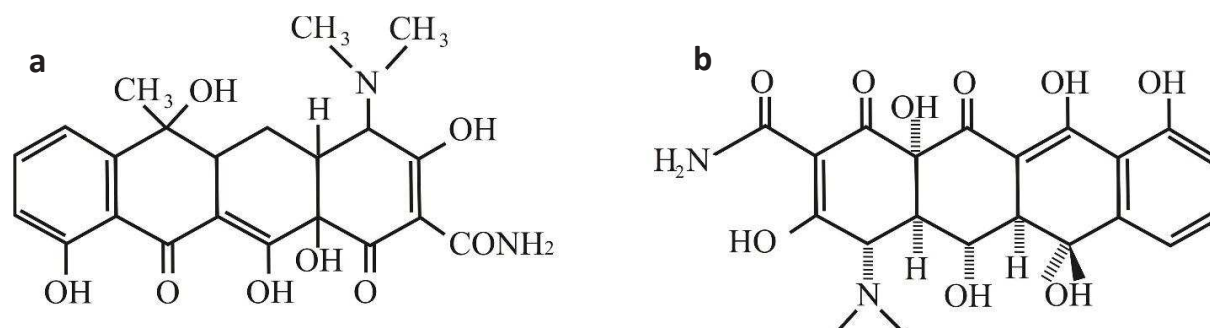


Figure 3.1: Molecular structure of tetracycline (a) and oxytetracycline (b); the molecular weights are 444.4 Da and 460.4 Da respectively.

2. Materials and methods

2.1. Chemicals

Aluminum chloride hexahydrate $\text{AlCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (CAS 7784-13-6), sodium hydroxide NaOH (97% CAS 1310-73-2) and zinc chloride ZnCl_2 (98% CAS 7646-85-7) were purchased from Prolabo. Tetracycline Hydrochloride (T7660), Oxytetracycline hydrochloride (O5875), and HEPES buffer were purchased from Sigma Aldrich. Deionized water (resistance is 18.2 M Ω) was used in all experiments.

2.2. Preparation of Zn_2Al LDH materials

Zn_2Al LDH materials were prepared using the co-precipitation method. Briefly, ZnCl_2 and AlCl_3 were dissolved in 50 mL of deionized water with total cationic concentration of 1.0 M ($\text{Zn}^{2+}:\text{Al}^{3+} = 2:1$). The salt solution was slowly added to a solution of NaOH 2 M into a reactor with a constant flow of 0.12 mL min⁻¹ using a syringe-pump system for 7 h under vigorous mechanical stirring at 400 rpm. The reaction mixture was maintained under nitrogen gas flow at pH 7.5 \pm 0.3. Then the resulting precipitates were centrifuged at 5000 rpm, washed with deionized water and kept at room temperature for 24 h.

2.3. Synthesis of TCH- Zn_2Al -LDH and OXY- Zn_2Al -LDH hybrid materials by co-precipitation

The immobilization of TCH and OXY on the Zn_2Al LDH by co-precipitation was performed following the process that described above (section 2.2). Typically, 10 mL of a 0.1 M metallic ZnCl_2 and AlCl_3 with a molar ratio 2:1 was slowly added to a second solution of 0.2 M NaOH with a constant flow into a reactor. Then, 60 mg of antibiotic (TCH or OXY) was added. The pH of the resulting system was maintained at 7.50 \pm 0.3 under magnetic stirring and nitrogen flow for 24 h. The solid product was collected and stored following the same procedure as

described above. The resulting materials are noted TCH-Zn₂Al_{cop} and OXY-Zn₂Al_{cop} respectively.

2.4. Synthesis of TCH-Zn₂Al-LDH and OXY-Zn₂Al-LDH hybrid materials by ion-exchange

The adsorption of TCH and OXY (pKa~3.3) on LDH was also prepared using ion-exchange method. Briefly, TCH or OXY was first dissolved in deionized water at different concentrations (C_0) ranging from 0.1 to 0.5 mg mL⁻¹. Next, 5 mL of each solution was mixed with a 5 mL suspension containing freshly prepared LDH (10 mg). The pH of the reaction mixture was adjusted to ≈8.0 and the suspension was stirred for a time (t) at 23°C. Afterwards, the colloidal suspension was centrifuged at 8000 rpm, washed with deionized water and then dried at room temperature for 24 h. The resulting materials are noted TCH-Zn₂Al_{exc} and OXY-Zn₂Al_{exc} respectively.

2.5. Material characterization

Powder X-ray diffraction patterns (XRD) were collected with a conventional Bragg-Brentano geometry ($\theta - 2\theta$ scans) on a Bruker D8 Advance automated diffractometer using CuK α radiation ($\lambda=1.54060 \text{ \AA}$) at 40 kV and 30 mA, and continued scanning mode. The patterns were recorded from 2 to 70° 2 θ in steps of 0.02° 2 θ , with the measuring time of 86.79 s per step. Transmission electron microscopy (TEM) study of the samples was performed on a JEOL100CX microscope. Samples in the form of bulk powders were suspended in ethanol and then deposited on 400 mesh copper grids covered with an ultrathin carbon membrane of 2–3 nm thickness.

The UV–Vis absorbance spectra were recorded using JASCO V-570 UV–visible spectrophotometer. Time-resolved fluorescence analysis was performed by the time-correlated single-photon counting technique using a lab-made setup previously described [19] [20]. Here, the excitation wavelength was provided by SuperK Extrem high power white

supercontinuum laser (NKT Photonics, model EXR-15) as a continuum pulsed source combined with SuperK EXTEND-UV supercontinuum (NKT Photonics, model DUV). Fluorescence was collected as magic angle to avoid the anisotropy contribution on a hybrid PMT detector HPM-100-40 (Becker & Hickl). All decays were collected so as to have at least $1.5 \cdot 10^6$ counts in total. Decay analysis was performed using a Levenberg–Marquardt algorithm. For the analysis, the fluorescence decay law at the magic angle $I_M(t)$ were assumed as a sum of exponentials.

2.6. Controlled release study

The release test of the immobilized TCH and OXY was carried as follows: 20 mg of immobilized TCH or OXY on LDH was dispersed in 20 mL of HEPES buffer pH 7 at 37°C under continuous stirring (600 rpm). At different time intervals, an aliquot of the solution was withdrawn. The material was removed by centrifugation and the concentration of antibiotic in the supernatant was obtained from an absorbance at 265 nm.

2.7. Antibacterial activity

The antibacterial activities of OXY and TCH antibiotics loaded on LDH were investigated by inhibition agar diffusion tests against two non-pathogenic bacteria: *Escherichia coli* (negative Gram, K12 DSM 423, from DSMZ, Germany) and *Staphylococcus epidermidis* (positive Gram, CIP53.124, from Pasteur Institute Laboratory, France). Bacterial strains were cultivated from frozen aliquots in liquid Luria-Bertani Miller (LB) until to reach the stationary phase; both growth culture rate being nearly similar. Bacterial cultures (0.5 McFarland) were then used to uniformly inoculate LB agar plates. For each test, a 20 μ L-spot of material solutions (1000 mg mL^{-1}) was deposited in the center of a plate freshly inoculated; the plates were thereafter incubated for 24 h at 37°C or at room temperature. The areas of inhibition zones were then measured. Each experiment was triplicated. Results were statistically analyzed by Student test.

3. Results and discussion

3.1. Antibiotic immobilization on Zn₂Al-Cl LDH

The immobilization of both OXY and TCH on Zn₂Al-Cl LDH were performed following two methods. For the co-precipitation method, 60 mg of antibiotic was added for the material synthesis (section 2.3). At the end of this synthesis, there was no free antibiotic left in the solution. The initial interfacial concentration of OXY and TCH in co-precipitated materials was thus 0.3 mg mg⁻¹ LDH and 0.3 mg mg⁻¹ LDH respectively. Concerning the immobilization by ion-exchange, antibiotic was added in a Zn₂Al-LDH suspension (section 2.4). In order to optimize the adsorption conditions, the kinetic and adsorption isotherms were investigated. Results are presented in the following sections.

3.1.1. Adsorption kinetic

The kinetic study was carried out at 23°C by introducing 10 mg of LDH into 10 ml of TCH or OXY solution at 0.3 g L⁻¹. The interfacial concentration Γ_t (mg mg⁻¹) at different time t was obtained from the depletion of supernatant method is reported on Figure 3.2.

$$\Gamma_t = (C_0 - C_t) \frac{V}{m} \quad \text{(Eq 3.1)}$$

where C_0 (mg mL⁻¹) and C_t (mg mL⁻¹) are the initial concentration and at time t (min) of TCH or OXY in solution, V (mL) the volume of the suspension and m (mg) the mass of LDH.

For TCH, the interfacial concentration increases with time to reach the equilibrium after 400 min. For OXY, the equilibrium is reached after 200 min of contact time. In order to describe the adsorption kinetic the experimental data were fitted with two kinetic models: pseudo-first-order model (Eq 3.2) and pseudo-second-order (Eq 3.3). The values of each fit are reported on Table 3.1.

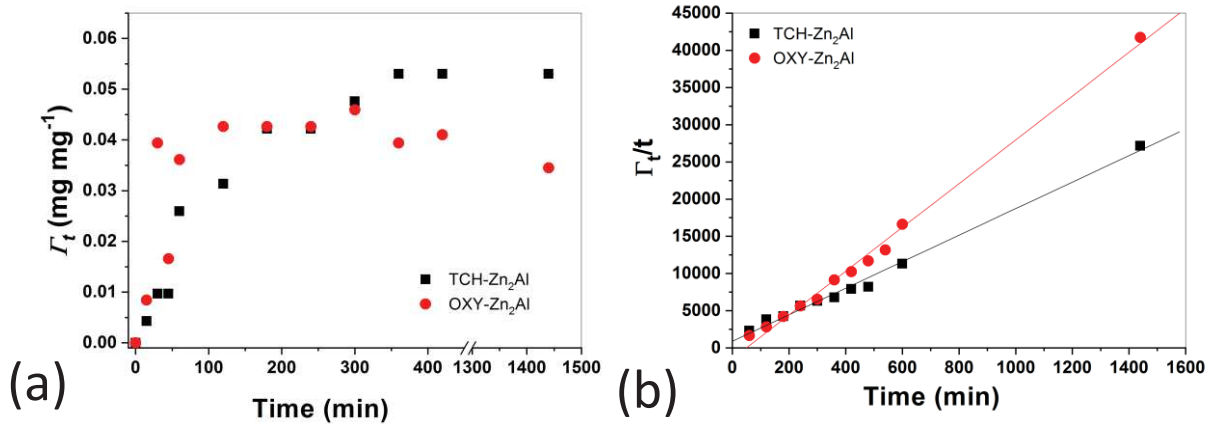


Figure 3.2: (a) Kinetic study of the TCH (black, square) and OXY (red, circle) adsorption on LDH at 23°C (b) Pseudo-second-order linear fit of TCH (black, square) and OXY (red, circle) adsorption on LDH.

$$\log(\Gamma_e - \Gamma_t) = \log\Gamma_e - \left(\frac{k_1}{2.303}\right) t \quad (\text{Eq 3.2})$$

$$\frac{t}{\Gamma_t} = \left(\frac{1}{k_2\Gamma_e^2}\right) + \left(\frac{1}{\Gamma_e}\right) t \quad (\text{Eq 3.3})$$

where Γ_e (mg mg⁻¹) is the interfacial concentration of TCH or OXY at equilibrium, k_1 and k_2 are the reaction rate constants. Based on the value of R^2 , the pseudo-second order is the most suitable model to fit our data. This indicates that the antibiotic adsorption is limited to the number of active sites. This confirms that adsorption process follows an ion-exchange.

Table 3.1: Kinetic parameters of TCH and OXY adsorption on LDH compounds.

LDH	Pseudo first order			Pseudo second order		
	Γ_e (mg mg ⁻¹)	k_1	R^2	Γ_e (mg mg ⁻¹)	k_2	R^2
Zn ₂ Al-TCH _{exc}	2.87	0.0014	0.926	0.056	0.59	0.996
Zn ₂ Al-OXY _{exc}	2.28	0.0002	0.545	0.034	0.449	0.997

3.1.2. Adsorption Isotherms

The affinity between TCH and OXY with Zn₂Al LDH matrix was investigated by the adsorption isotherms (Figure 3.3). For both TCH and OXY, the adsorption follows an L-type

isotherm according to the classification of Giles. Basically the interfacial concentration increases due to the occupancy of site until reaching a plateau. The experimental data were fitted using two common models (Freundlich and Langmuir). The Freundlich model (Eq 3.4) is an empirical model which assumes that the equilibrium is never reached and the material is not homogeneous.

$$\Gamma_e = K_f C_e^{\frac{1}{n}} \quad (\text{Eq 3.4})$$

where n and K_f are Freundlich constants. The Langmuir model (Eq 3.5) assumes that the material surface is homogeneous and at the equilibrium both adsorption and desorption occurs at the same time.

$$\Gamma_e = \Gamma_m \frac{K_l C_e}{1 + K_l C_e} \quad (\text{Eq 3.5})$$

where k_l is the Langmuir constant and Γ_m the maximum of interfacial concentration.

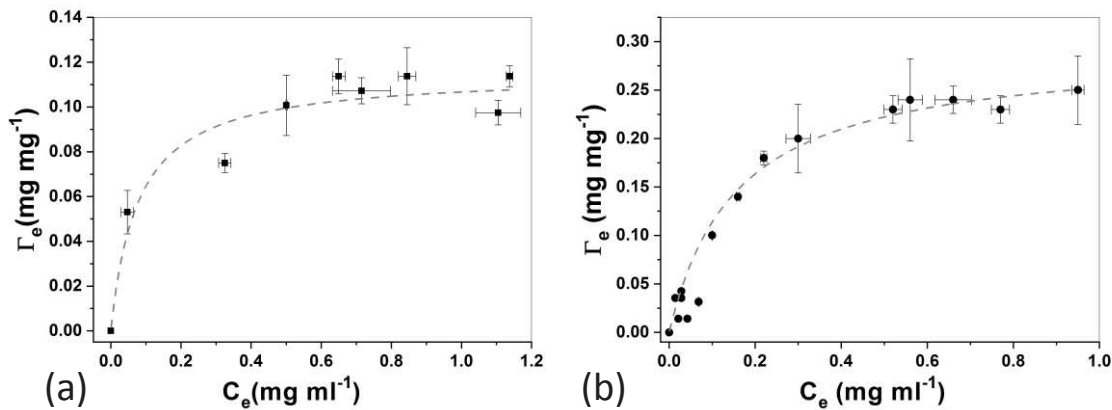


Figure 3.3: Adsorption isotherms and fit using Langmuir (dash line) model of TCH (a) and OXY (b) on LDH.

The results of fits are reported in Table 3.2. According to the correlation coefficients ($R^2 > 0.95$), the Langmuir model is the most suitable to describe the adsorption process. This suggests that adsorption sites for antibiotics are equivalent. For the TCH, the maximum of interfacial concentration is 0.11 mg mg^{-1} while it is about 0.29 mg mg^{-1} for the OXY.

Table 3.2: Langmuir and Freundlich parameters of TCH and OXY adsorption on Zn₂Al-Cl.

LDH	Langmuir			Freundlich		
	Γ_m (mg mg ⁻¹)	k_L (mg mL ⁻¹)	R ²	n	k_f (mg mL ⁻¹)	R ²
Zn ₂ Al-TCH	0.116	12.83	0.955	4.12	0.386	0.85
Zn ₂ Al-OXY	0.292	6.37	0.989	0.57	2.646	0.88

3.2. Characterization of antibiotic/LDH interactions

The hybrid materials were characterized by various methods. The antibiotic location is important information which can explain the release properties. The X-ray diffraction patterns of the raw Zn₂Al-Cl, TCH-Zn₂Al and OXY-Zn₂Al prepared using ion exchange and co-precipitation methods are reported in Figure 3.4. The basal spacing of Zn₂Al-Cl was around 0.75 nm. The addition of TCH or OXY does not modify the value of (001) whatever the methods of immobilization. Thus, we can conclude that the antibiotic is not located in the interlayer space but only on the external surface. This was also reported for ampicillin adsorbed on Mg/Al-NO₃ LDH [12]. We can also observe an enlargement of the peaks for the antibiotic-LDH prepared by co-precipitation compared to the one obtained by adsorption. This suggests a decrease of the crystallinity of the material.

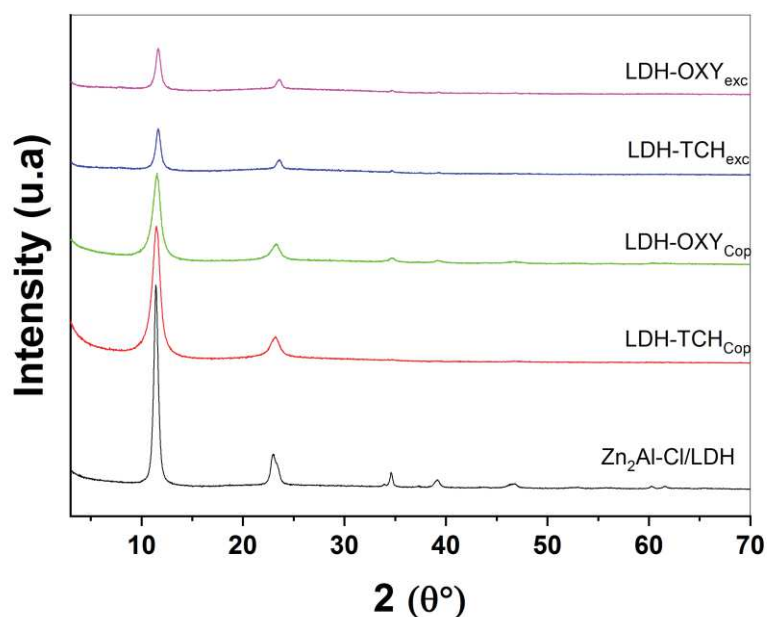


Figure 3.4: XRD patterns of Zn₂Al-Cl LDH (black), TCH-Zn₂Al_{cop} (red), OXY-Zn₂Al_{cop} (green) TCH-Zn₂Al_{exc} (blue) and OXY-Zn₂Al_{exc} (Pink).

To go further in our investigations, the TEM analysis was performed. The micrographs (**Figure 3.5**) show layered structures with alternate dark and bright fringes with a repeat length around 0.75 nm for the Zn₂Al-Cl HDL and hybrid antibiotic/LDH obtained by ion exchange. This confirms that the antibiotic is not intercalated in the LDH interlayer space which is consistent with the XRD analysis. The hybrid antibiotic/LDH obtained by coprecipitation, the TEM reveals a lower crystallinity as suggested by the peak enlargement in XRD analysis. However, in the crystalline part, the antibiotic does not seem intercalated.

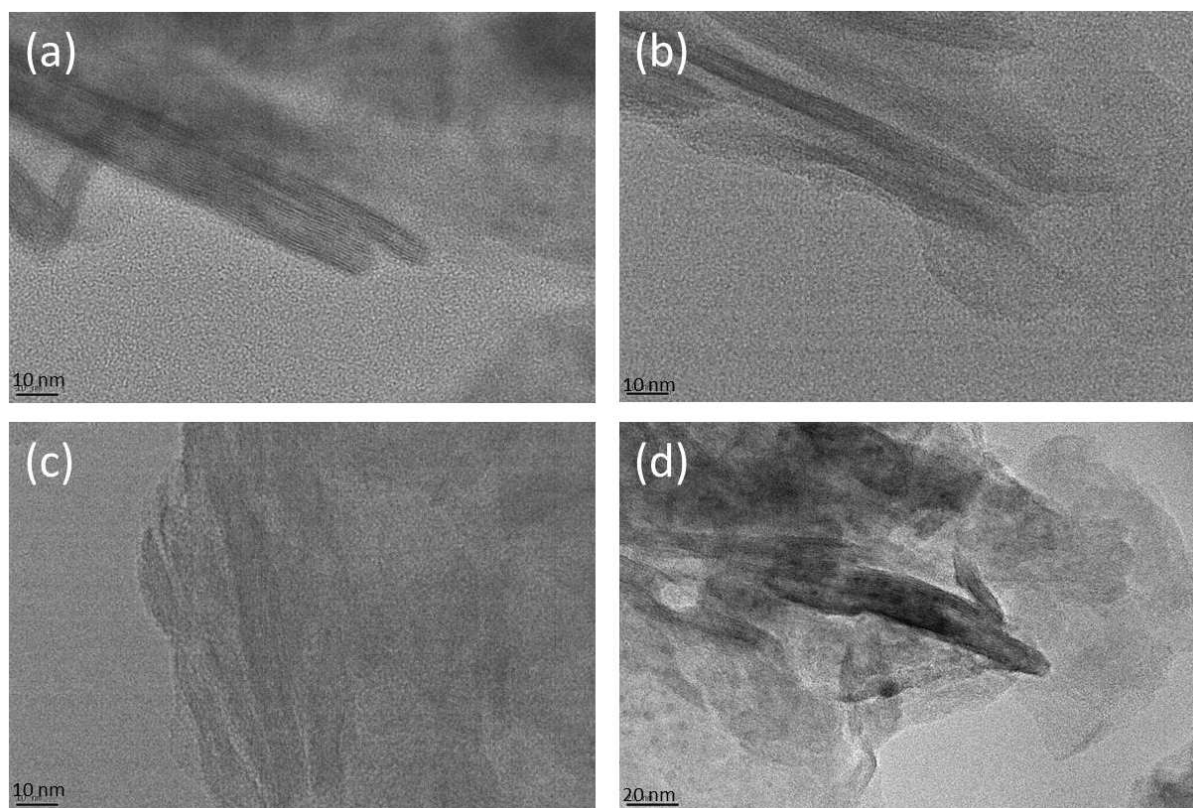


Figure 3.5: TEM micrograph of Zn₂Al-Cl (a), OXY-Zn₂Al_{exc} (b) and TCH-Zn₂Al_{cop} (c-d).

In order to confirm that the antibiotic is in interaction with the material, we investigated the fluorescence emission properties of TCH and OXY because it is strongly dependent on their environment. To do so, the sample was suspended in aqueous solution just before fluorescence measurement. The average fluorescence lifetime was extracted from the fluorescence decay (**Figure 3.6**). Free in solution at pH 7, the TCH and OXY exhibit at 504 nm short average lifetime 0.488 ns and 0.788 ns respectively. After immobilization on Zn₂Al LDH, the average lifetimes are longer 2.406 ns for TCH and 2.163 ns for OXY. This increase of fluorescence lifetime confirms the interaction between the antibiotic and LDH. It could be explained by the complexation of phenolate moieties with the aluminum of LDH. Similar trends was reported for the carminic acid adsorbed onto clay mineral exchanged with aluminum [21]. These results also showed that the antibiotic release does not occur quickly on

the contrary than it was previously reported in the case of rhodamine dye in different minerals clays [22].

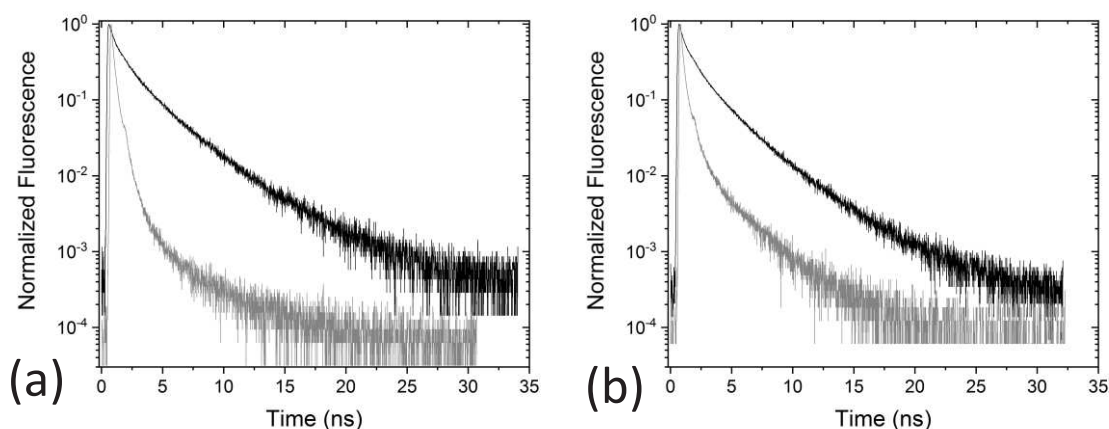


Figure 3.6: Fluorescence decay of TCH (a) and OXY (b) free in solution (gray line) and loaded on Zn_2Al LDH (black line).

3.3. *In vitro* release behaviors

Because the antibiotics are in interaction with the material but not intercalated in interlayer space, their kinetic of release were evaluated. To do so, the release experiments of TCH and OXY were performed in 10 mM HEPES buffer at pH 7 for time intervals up to 24 h. The amounts of released TCH and OXY were measured by the depletion of supernatant method. The kinetics of release are reported on Figure 3.7.

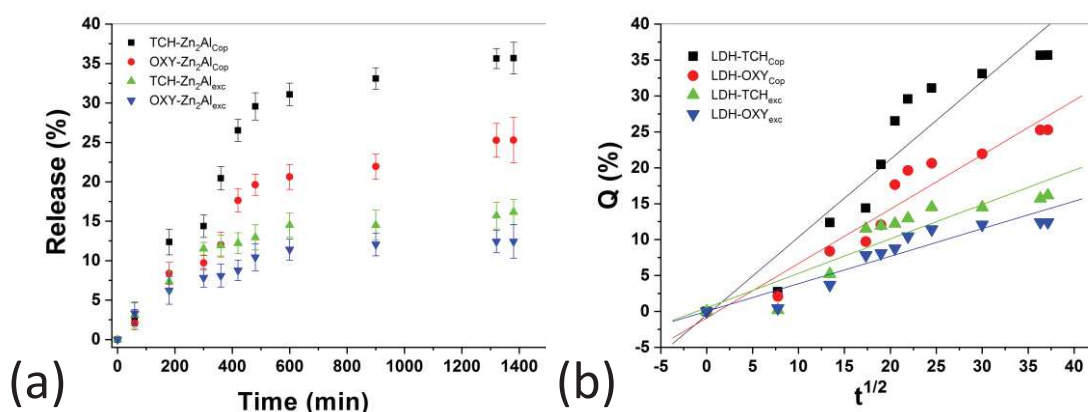


Figure 3.7: Cumulative release profiles (a) and Higuchi fit of TCH- Zn_2Al_{cop} (black, square), OXY- Zn_2Al_{cop} (red, circle), TCH- Zn_2Al_{exc} (green, up triangle), and OXY- Zn_2Al_{exc} (blue, down triangle).

The experimental data of TCH and OXY released from Zn₂Al–Cl LDH was fitted using three models: first-order, Korsmeyer-Peppas, and Higuchi ones. The first-order model (Eq 3.6) involves a release which depends on the drug concentration:

$$\log(Q - 1) = -k_1 t \quad (\text{Eq 3.6})$$

where Q is the dissolved amount of TCH or OXY and k_1 the kinetic constant.

When the release is controlled by the diffusion, two models can be used. The Higuchi (Eq 3.7) one involved only a Fickian diffusion. In the Korsmeyer-Peppas (Eq 3.8) the parameter n depends on the diffusion mechanism: for $n < 0.5$ the diffusion is Fickian while for $0.5 < n < 1$ it is non- Fickian

$$Q = k_H t^{1/2} \quad (\text{Eq 3.7})$$

$$\log\left(\frac{M_t}{M_\infty}\right) = n \log t + \log k_{KP} \quad (\text{Eq 3.8})$$

where k_H and k_{KP} are the Higuchi and Korsmeyer-Peppas constant of release respectively, M_t and M_∞ are the amounts of TCH or OXY released at time equal t and ∞ respectively.

Table 3.3: Parameters of fit for TCH and OXY release from Zn₂Al matrix

	Korsmeyer-Peppas		R ²	First-order		Higuchi	
	k_{KP}	n		k_1	R ²	k_H	R ²
LDH-TCH_{Cop}	6.31 10 ⁻²	0.782	0.862	2.46 10 ⁻⁴	0.952	10.65 10 ⁻²	0.974
LDH-OXY_{Cop}	5.57 10 ⁻²	0.766	0.895	1.52 10 ⁻⁴	0.950	7.23 10 ⁻³	0.980
LDH-TCH_{exc}	1.38 10 ⁻²	1.209	0.683	1.06 10 ⁻⁴	0.909	4.99 10 ⁻³	0.961
LDH-OXY_{exc}	2.41 10 ⁻²	0.970	0.781	0.81 10 ⁻⁴	0.944	3.84 10 ⁻³	0.969

Based on the R^2 , the Higuchi model is the most suitable to describe the experimental data (Table 3.3). This means that antibiotic release follows a Fickian diffusion. This involves that only one type of adsorbed antibiotic is released in solution which is consistent with a location of antibiotic only on LDH external surface.

3.4. Antibacterial activity

The inhibition effect of both antibiotics (TCH and OXY), free and loaded on LDH either by co-precipitation or adsorption methods was assessed against bacteria: *E. coli* negative Gram and *S. epidermidis* positive Gram. To do so, the agar diffusion tests were used. The average area of the inhibition zones obtained after 24 h at 37°C are reported in Figure 3.8.

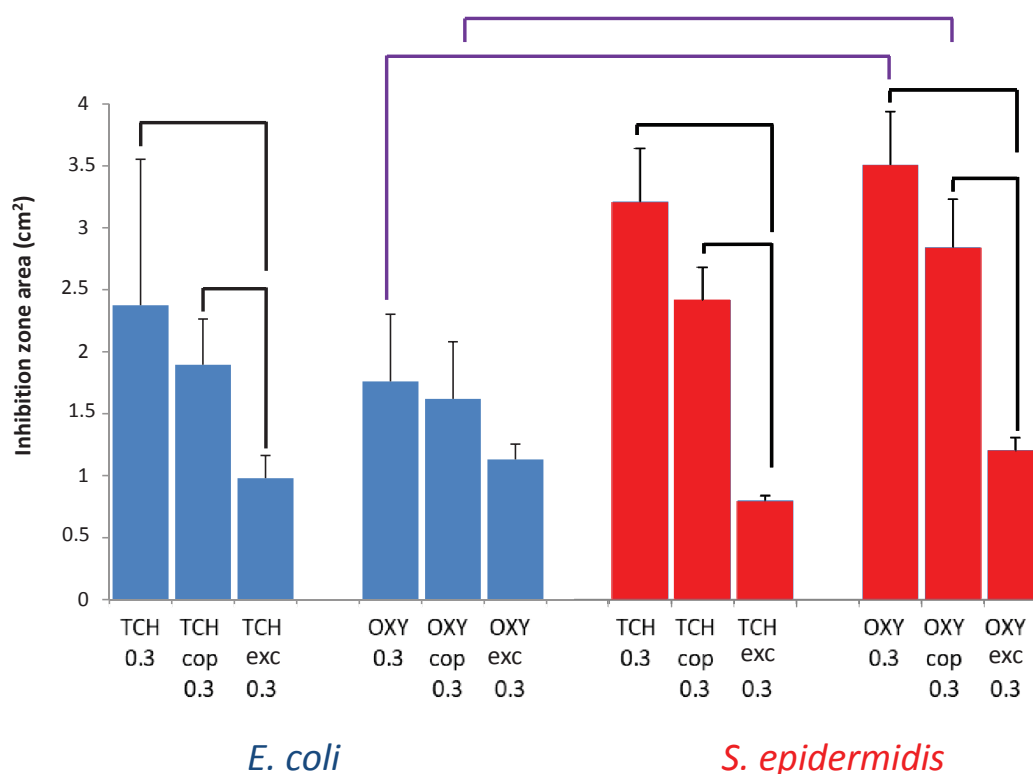


Figure 3.8: Inhibition zone areas induced by free antibiotics (TCH and OXY) and loaded on LDH (TCH-Zn₂Al and OXY-Zn₂Al) against *E. coli* and *S. epidermidis* bacteria in reference conditions. The materials in reference conditions were prepared with 0.3 mg mL⁻¹ of antibiotics, i.e. the same concentrations of free antibiotics, and stored at 4°C for 6 days prevented from light; inhibition tests were performed under visible light at 37°C (n = 3 for each test); significant changes with p < 0.05 are reported on the figure.

For free antibiotics, *S. epidermidis* is more sensitive to OXY than *E. coli* (**Figure 3.8, purple lines**). Compared to free antibiotics, the inhibition activities of TCH-Zn₂Al_{cop} and OXY-Zn₂Al_{cop} do not exhibit significant differences whatever the Grams' bacteria. This means that co-precipitation allow the diffusion of antibiotic without degradation. On the contrary, the inhibition performances of TCH-Zn₂Al_{ads} and OXY-Zn₂Al_{ads} are globally lower than free antibiotics and loaded on LDH by co-precipitation (**Figure 3.8, dark lines**). As observed in **Figure 3.6**, this could be assigned to a lower antibiotic release compared to materials obtained by co-precipitation (15 % vs 35 % for TCH-Zn₂Al_{exc} and TCH-Zn₂Al_{cop} respectively; 10 % vs 25 % for OXY-Zn₂Al_{exc} and OXY-Zn₂Al_{cop} respectively). Nevertheless, the difference between OXY-Zn₂Al_{exc} and OXY-Zn₂Al_{cop} against *E. coli* was not evidenced (**Figure 3.8**) due to a high standard deviation (29 %). Finally, the inhibition zones obtained for TCH-Zn₂Al_{cop} and OXY-Zn₂Al_{cop} against *E. coli* reached constant values from 22 h up to 28 h (data not shown). This means that equilibrium occurred after 22 h where the antibacterial action rate counterbalances to the bacteria growth.

The influence of the antibiotics concentration was then investigated (**Figure 3.9**).

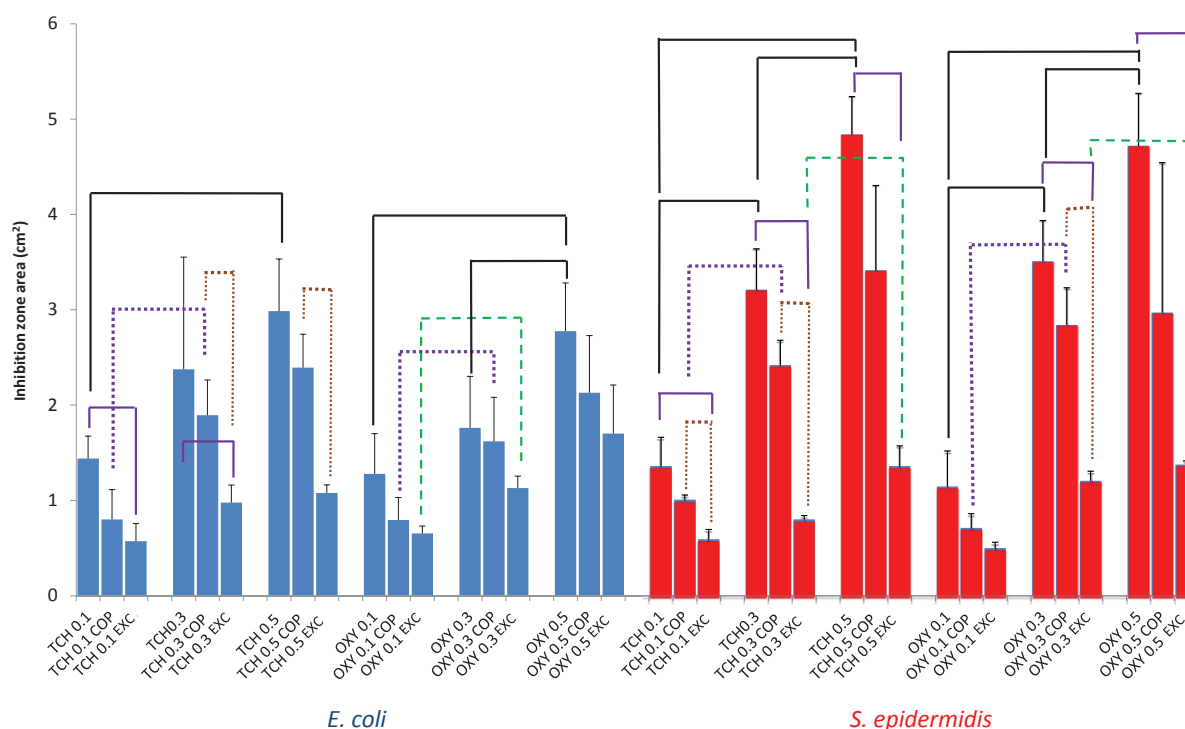


Figure 3.9: Inhibition zone areas induced by free antibiotics (TCH and OXY) and hybrid materials (TCH-Zn₂Al and OXY-Zn₂Al) against *E. coli* and *S. epidermidis* bacteria; materials were prepared with 0.1, 0.3 or 0.5 mg mL⁻¹ of antibiotics, i.e. the same concentrations of free antibiotics, and stored at 4°C for 6 days prevented from light; inhibition tests were performed under visible light at 37°C (n = 3 for each test); significant changes with p < 0.05 are reported on the figure.

First, it can be noticed that inhibition performances of free antibiotics are the higher when the concentration is high (**Figure 3.8, dark lines**). This shows that the antibiotic concentration increases the diffusion gradient. Moreover, the inhibition activities of free antibiotics and loaded by co-precipitation are not significantly different whatever their concentration or the bacteria Gram. This confirms that the co-precipitation method does not alter the antibiotics. On the contrary, major changes were evidenced between co-precipitated and adsorbed antibiotics (**Figure 3.9, brown dotted lines**) excepted for the lowest concentration tested (i.e. 0.1 mg mL⁻¹). This is likely due to the decrease of released antibiotics for materials prepared by ionic exchange (**Figure 3.6**). No changes were either evidenced between OXY-Zn₂Al_{exc,0.3} and OXY-Zn₂Al_{cop,0.3} against *E. coli*, TCH-Zn₂Al_{exc,0.5} and TCH-Zn₂Al_{cop,0.5} against *S. epidermidis*, and OXY-Zn₂Al_{exc,0.5} as well as OXY-Zn₂Al_{cop,0.5} against both *E. coli* and *S.*

epidermidis (**Figure 3.8**). However, this might be linked to high standard deviations ($\geq 30\%$) that does not allow to statistically conclude.

The TCH-Zn₂Al_{cop} and OXY-Zn₂Al_{cop} prepared with 0.3 mg mL⁻¹ of antibiotics exhibit better inhibition activities than the ones prepared with 0.1 mg mL⁻¹ whatever the bacterial Gram (**Figure 3.9, purple dotted line**). Nevertheless, no differences were observed for TCH-Zn₂Al_{cop} and OXY-Zn₂Al_{cop} prepared with 0.3 mg mL⁻¹ or 0.5 mg mL⁻¹ of antibiotics. These results suggest that accessible binding sites on the external surface of the LDH are likely saturated for antibiotics concentrations equal or higher than 0.3 mg mL⁻¹. This leads to an optimal antibiotics release compared to smaller concentration (i.e. 0.1 mg mL⁻¹). This phenomenon could explain that no significant differences were observed between co-precipitated and exchanged antibiotics at 0.1 mg mL⁻¹. In contrast to TCH-Zn₂Al_{cop} and OXY-Zn₂Al_{cop}, the influence of concentration on the performances of the TCH-Zn₂Al_{exc} and OXY-Zn₂Al_{exc} antibiotics does not give rise to a general trend, although an increased concentration leads to slight inhibition in some cases (**Figure 3.9, green dotted lines**). These results suggest that accessible binding sites on the external surface of these materials are close to the saturation for 0.1 mg mL⁻¹ of antibiotics.

The effect of the temperature storage on the materials was also investigated (**Figure 3.10**). To simplify this study, the inhibition tests were carried out on *E. coli*. The latter appears to be more resistant than *S. epidermidis* (**Figure 3.8**).

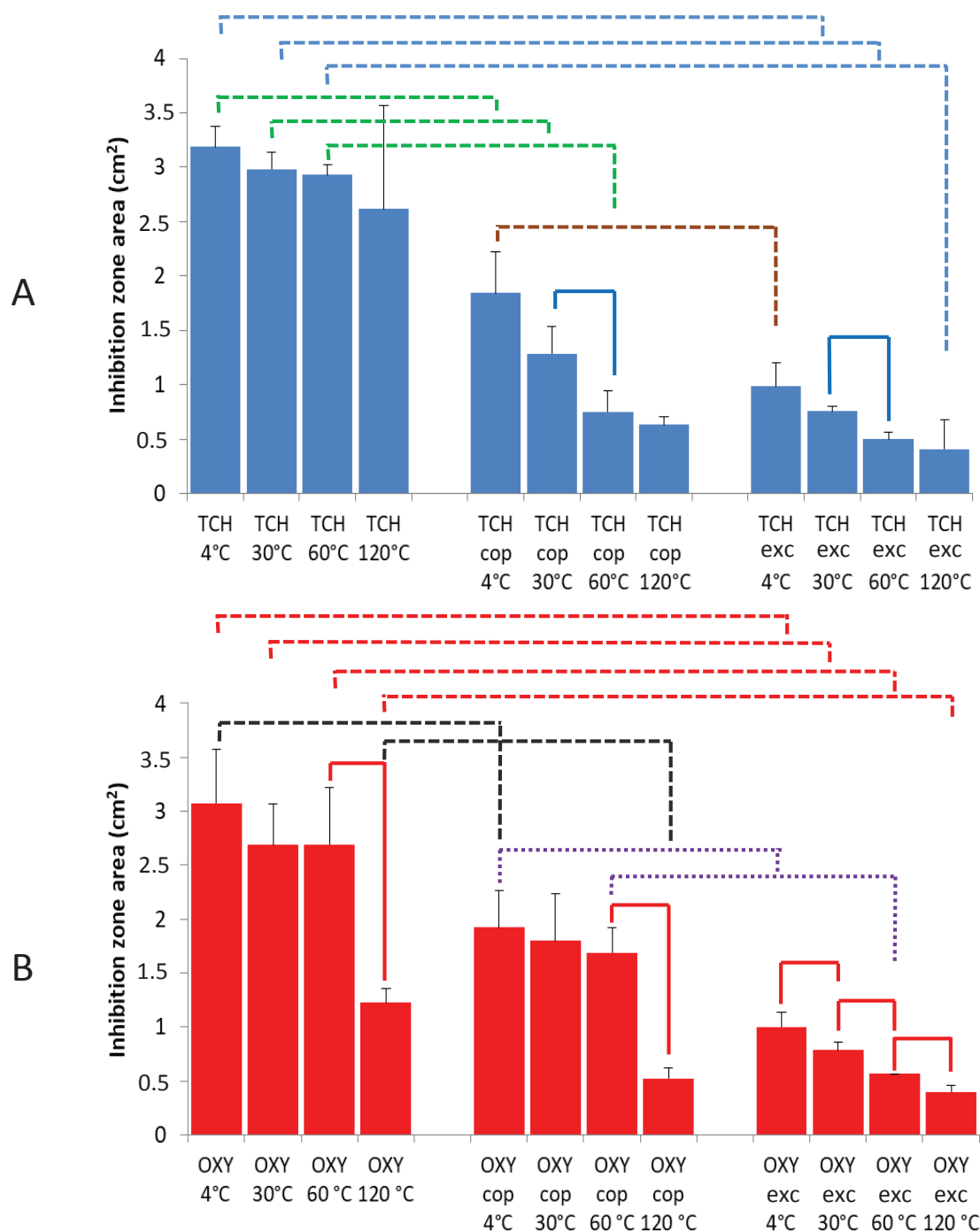


Figure 3.10: Inhibition zone area induced by free antibiotics and hybrid materials against *E. coli*; A : TCH as free or loaded antibiotic and B : OXY as free or loaded antibiotic; materials were prepared with 0.3 mg mL^{-1} of antibiotics, i.e. the same concentration of free antibiotics, and stored at 4°C for 10 days prevented from light; antibiotics and materials were then stored for 3 days at 4, 30, 60 and 120°C before being tested to study temperature effect; inhibition tests were thereafter performed under visible light at 37°C ($n = 3$ for each test); significant changes with $p < 0.05$ are reported on the figure.

For the free TCH the storage temperature from 4°C to 120°C has no significant influence on the antibacterial activity (**Figure 3.10A**). On the contrary for OXY the activity dramatically decrease for a storage temperature above 60°C (**Figure 3.10B, red lines**). For TCH-Zn₂Al_{cop} and TCH-Zn₂Al_{exc}, the antibacterial activity is affected by temperature storage from 30°C to 120°C (**Figure 3.10A, green dotted lines and blue dotted lines respectively**). The loss of activity is more visible between 30°C and 60°C for both TCH-Zn₂Al_{cop} and TCH-Zn₂Al_{exc} (**Figure 3.10A, blue lines**). At 4°C, TCH-Zn₂Al_{cop} exhibits a slightly lower efficiency than free TCH (**Figure 3.10A, green dotted line**) while results reported in Figure 3.8 showed no difference. An explanation could be a loss of stability for the co-precipitated TCH that was stored three days more at 4°C. At 4°C, TCH-Zn₂Al_{exc} still shows less activity than TCH-Zn₂Al_{cop} (**Figure 3.10A, brown dotted line**). This is consistent with lower release of antibiotic for TCH-Zn₂Al_{exc} than TCH-Zn₂Al_{cop}. For higher temperatures, there is no more significant difference between TCH-Zn₂Al_{cop} and TCH-Zn₂Al_{exc}, probably due to antibiotic degradation.

The antibacterial activity of free OXY is quite similar for a storage temperature from 4°C to 60°C. At 120°C, it decreases by a factor about 3. OXY-Zn₂Al_{cop} follows the similar trend than OXY free in solution. On the contrary, the OXY-Zn₂Al_{exc} is the less efficient against bacteria as the temperature rises. Globally, OXY-Zn₂Al_{exc} is less efficient than OXY-Zn₂Al_{cop} whatever the temperature. Moreover, OXY-Zn₂Al_{cop} exhibits a slightly lower efficiency than OXY free in solution at 4°C (**Figure 3.10B, dark dotted lines**). This can also be due to a longer storage of material. From 30°C to 60°C, the antibacterial activity of OXY-Zn₂Al_{cop} is constant meaning that antibiotic degradation was not significant. At this stage, we can conclude that antibiotics loaded on LDH support by co-precipitation or ion-exchange could be degraded by a temperature increase. In addition, the antibiotics loaded by co-precipitated keep a similar activity compared to free antibiotics if they are stored at 4°C for 15 days at most.

In a last step, impact of light on the antibiotic activity was investigated. Materials were stored at room temperature under visible light, under UV_A, and in the dark before testing their antibacterial activity. The results are reported on **Figure 3.11**.

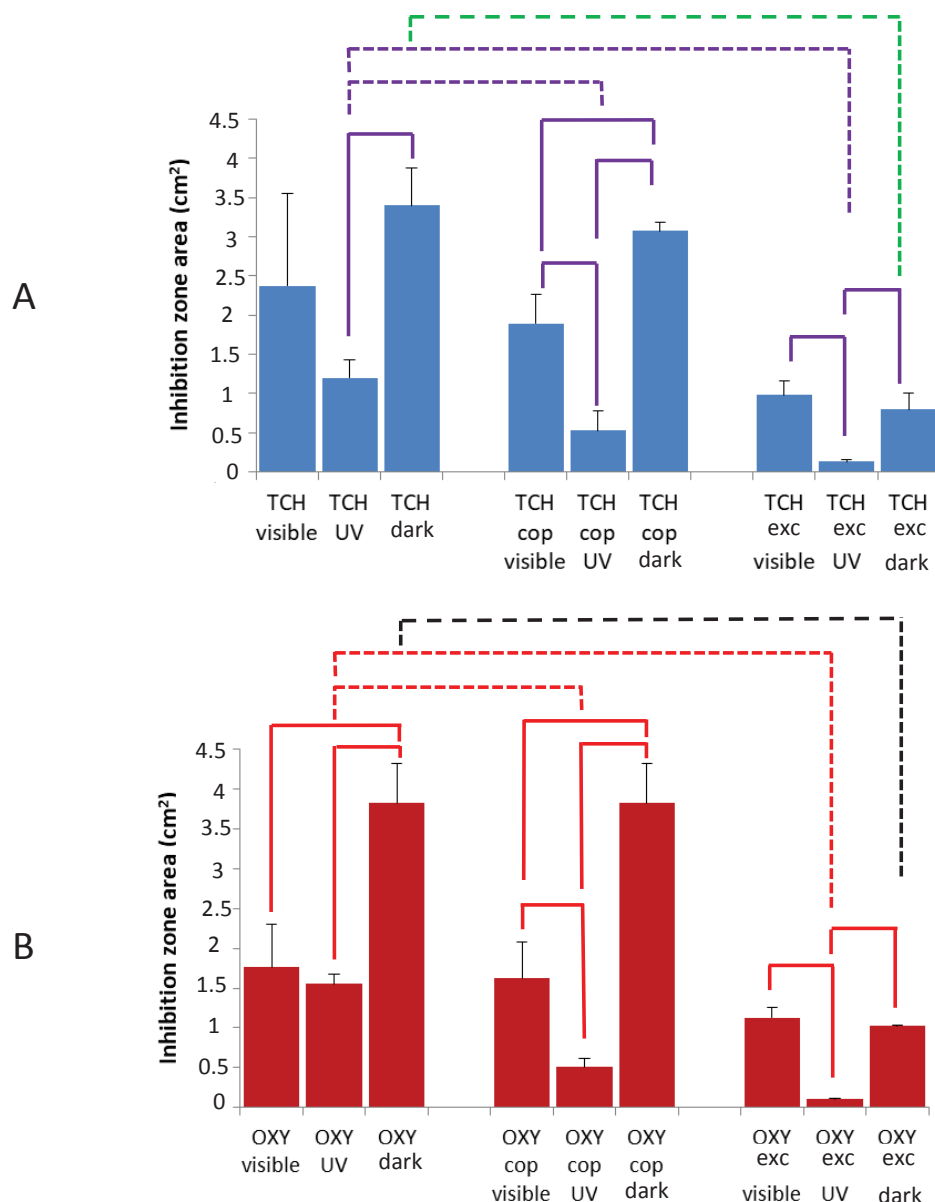


Figure 3.11: Inhibition zone area induced by free antibiotics and hybrid materials against *E. coli*; A : TCH as free or loaded antibiotic and B : OXY as free or loaded antibiotic; materials were prepared with 0.3 mg mL⁻¹ of antibiotics, i.e. the same concentration of free antibiotics, and stored at room temperature (20 ± 5°C) for 4h under visible light, under a UV_A lamp (362 nm) and prevented from light (i.e. in the dark) to study UV effect; inhibition tests were then performed under visible light at room temperature (n = 3 for each test); significant changes with p < 0.05 are reported on the figure.

Regarding the result for free antibiotics, TCH is not sensitive to an exposition to visible light on the contrary than OXY (**Figure 3.11B, red line**). Nevertheless, both TCH and OXY appears to be sensitive to UV_A (**Figure 3.11A, purple line and Figure 3.11B, red line**). Both TCH-Zn₂Al_{cop} and OXY-Zn₂Al_{cop} were sensitive to UV_A and visible exposition (**Figure 3.11A, purple line and Figure 3.11B, red line**). On the contrary, TCH-Zn₂Al_{exc} and OXY-Zn₂Al_{exc} were only sensitive to UV_A (**Figure 3.11A, purple line and Figure 3.11B, red line**). Whatever the antibiotics and the method of loading (adsorption or co-precipitation), the antibacterial performances are significantly lower than the free antibiotics (**Figure 3.11A, purple dotted line and Figure 3.11B, red dotted line**). This indicates antibiotics degradation due to a probable photocatalytic effect of the LDH under light irradiation. This is consistent with the lower antibacterial activity observed under UV than visible suggesting an effect of irradiation energy. In addition, for co-precipitated antibiotics the antibacterial activities are similar that free in solution after storage in the dark (**Figure 3.11A, green dotted line and Figure 3.11B, dark dotted line**). Whatever the method of preparation, the antibiotics loaded on HDL support seems to be degraded by an UV exposure. We could expect an opposite result where the LDH allows protecting the antibiotics against degradation. However, these results are particularly interesting because, the LDH could be considered as a new way to combine the releasing and a fast degradation of unreacted antibiotic.

4. Conclusion

To sum up, we have considered the Zn₂Al LDH as host for two antibiotics: TCH and OXY. The latter have been loaded on the LDH following two methods, i.e. the co-precipitation and ion exchange. Whatever the method, the antibiotics are located on the external surface of LDH. From the adsorption isotherms and the release kinetics, the LDH sites can be considered as equivalent to bind TCH and OXY. The antibacterial activities performed on both *E. coli* and *S. epidermidis* revealed that the loaded antibiotics are still active but less

efficient compared to the free ones, suggesting a partial degradation. This seems to be confirmed from the significant activity decreasing after exposure to UV radiations or to higher temperature storage (30, 60 and 120°C). In particular, co-precipitation of antibiotics within LDH appears to be an interesting way for first antibiotics delivery and then degradation. In standard conditions, this method ensures the closest antibacterial activity compared to antibiotics free in solution. Under UV irradiation or temperature increase, the antibiotic degradation occurs. The identification and toxicity of sub-products will be further carried out by LC-MS to assess if such an antibiotic immobilization could contribute to reduce antibiotic and sub-product contamination in waters.

III. Referneces

1. Xu, Z.P., et al., *Catalytic applications of layered double hydroxides and derivatives*. Applied Clay Science, 2011. 53(2): p. 139-150.
2. Wang, Q. and D. O'Hare, *Recent advances in the synthesis and application of layered double hydroxide (LDH) nanosheets*. Chemical reviews, 2012. 112(7): p. 4124-4155.
3. Choy, J.-H., et al., *Clay minerals and layered double hydroxides for novel biological applications*. Applied Clay Science, 2007. 36(1-3): p. 122-132.
4. Chang, P.-H., et al., *Adsorption and intercalation of tetracycline by swelling clay minerals*. Applied Clay Science, 2009. 46(1): p. 27-36.
5. Choy, J.H., et al., *Inorganic layered double hydroxides as nonviral vectors*. Angewandte Chemie International Edition, 2000. 39(22): p. 4041-4045.
6. Cunha, V.R., et al., *Delivery system for Mefenamic Acid based on the nanocarrier Layered Double Hydroxide: physicochemical characterization and evaluation of anti-inflammatory and antinociceptive potential*. Materials Science and Engineering: C, 2016. 58: p. 629-638.
7. Rives, V., M. del Arco, and C. Martín, *Intercalation of drugs in layered double hydroxides and their controlled release: A review*. Applied Clay Science, 2014. 88: p. 239-269.
8. Wang, J., J. Hu, and S. Zhang, *Studies on the sorption of tetracycline onto clays and marine sediment from seawater*. Journal of colloid and interface science, 2010. 349(2): p. 578-582.
9. Frunza, M., et al., *Thermogravimetric analysis of layered double hydroxides with chloramphenicol and salicylate in the interlayer space*. Journal of Thermal Analysis and Calorimetry, 2008. 93(2): p. 373-379.

10. San Román, M., et al., *Characterisation of Diclofenac, Ketoprofen or Chloramphenicol Succinate encapsulated in layered double hydroxides with the hydrotalcite-type structure*. Applied Clay Science, 2012. 55: p. 158-163.
11. Trikeriotis, M. and D.F. Ghanotakis, *Intercalation of hydrophilic and hydrophobic antibiotics in layered double hydroxides*. International journal of pharmaceutics, 2007. 332(1-2): p. 176-184.
12. Tammaro, L., et al., *Nanohybrids for controlled antibiotic release in topical applications*. International journal of antimicrobial agents, 2007. 29(4): p. 417-423.
13. Bouaziz, Z., et al., *Adsorption of nisin into layered double hydroxide nanohybrids and in-vitro controlled release*. Materials Science and Engineering: C, 2017. 76: p. 673-683.
14. Avisar, D., et al., *Sorption of sulfonamides and tetracyclines to montmorillonite clay*. Water, Air, & Soil Pollution, 2010. 209(1-4): p. 439-450.
15. Parolo, M.E., et al., *Tetracycline adsorption on montmorillonite: pH and ionic strength effects*. Applied Clay Science, 2008. 40(1-4): p. 179-186.
16. Wang, Y.-J., et al., *Adsorption and cosorption of tetracycline and copper (II) on montmorillonite as affected by solution pH*. Environmental Science & Technology, 2008. 42(9): p. 3254-3259.
17. Xu, Z., et al., *On the adsorption of tetracycline by calcined magnesium-aluminum hydrotalcites*. Journal of environmental quality, 2009. 38(3): p. 1302-1310.
18. Soori, M.M., et al., *Intercalation of tetracycline in nano sheet layered double hydroxide: An insight into UV/VIS spectra analysis*. Journal of the Taiwan Institute of Chemical Engineers, 2016. 63: p. 271-285.
19. Bouaziz, Z., et al., *Structure and antibacterial activity relationships of native and amyloid fibril lysozyme loaded on layered double hydroxide*. Colloids and Surfaces B: Biointerfaces, 2017. 157: p. 10-17.
20. Thangaraj, V., et al., *Fluorescence quenching of sulforhodamine dye over graphene oxide and boron nitride nanosheets*. European Journal of Inorganic Chemistry, 2016. 2016(13-14): p. 2125-2130.
21. Fournier, F., et al., *Physico-chemical characterization of lake pigments based on montmorillonite and carminic acid*. Applied Clay Science, 2016. 130: p. 12-17.
22. Tangaraj, V., et al., *Adsorption and photophysical properties of fluorescent dyes over montmorillonite and saponite modified by surfactant*. Chemosphere, 2017. 184: p. 1355-1361.

*Chapitre 4 : Etude de
l'adsorption de la nisine par
les différentes phases HDL :
Contrôle de libération et
évaluation de l'activité
antibactérienne.*

I. Introduction:

La nisine, est un peptide antimicrobien présentant une activité contre de nombreuses bactéries à Gram positif. Ce chapitre présente une étude sur l'élaboration et la caractérisation d'hydroxydes double lamellaires (HDL)-nisine, ainsi que l'évaluation de l'activité antibactérienne de la nisine (libre ou immobilisée). L'objectif de cette étude est d'évaluer l'influence de la localisation de la nisine sur son activité antibactérienne et d'évaluer si la phase HDL pourrait protéger la nisine de la dégradation thermique. Dans cette étude l'immobilisation de la nisine dans des différentes matrices HDL de type Mg_2Al-Cl , Zn_2Al-Cl , Mn_2Al-Cl et Ni_2Al-Cl a été faite par échange anionique. Les modifications structurales et morphologiques des matériaux HDL-nisine ont été analysées par diffraction des rayons X (DRX), microscopie électronique à balayage (MEB) et microscope électronique à transmission (MET), afin de préciser la localisation de la nisine dans les phases HDL. Nous avons ensuite utilisé une souche de Gram positif *M.luteus* pour évaluer l'activité antibactérienne des matériaux HDL-nisine. Enfin la performance des phases HDL sur la dégradation thermique de la nisine a été évaluée.

Les résultats présentés dans ce chapitre ont fait l'objet d'un article scientifique : « **Adsorption of nisin into layered double hydroxide nanohybrids and in-vitro controlled release.** » Materials Science and Engineering C 76 (2017) 673–683. Et d'une partie complémentaire sous le nom « **Evaluation de l'effet de la matrice HDL sur l'activité antibactérienne du matériau** ».

II. Article scientifique: Adsorption of nisin into layered double hydroxide nanohybrids and in-vitro controlled release

Zaineb Bouaziz^{1,2}, Mohamed Amine Djebbi^{2,3,4}, Laurence Soussan¹, Jean-Marc Janot¹, Abdesslem Ben Haj Amara², Sebastien Balme¹

Materials Sciences and Engineering C 2017 DOI (76), 673-683

Abstract

Layered double hydroxide (LDH) nanohybrid intercalated biomolecules, including oligoneucleotides, genes and peptides/ proteins, have attracted particular attention since they exhibit improved safety and effectiveness as successful delivery biosystems. The current study specifically investigated the adsorption of nisin peptide and precisely the control of the release of the payload. Adsorption occurred from peptide solution in contact with zinc-aluminum LDH at room temperature, looking out over the influence of the Zn^{2+}/Al^{3+} ratio, the anion exchange capacity, the nature of the intercalated anion, the host matrix, and the host morphology. Higher adsorption was obtained, around 80% of the loaded nisin and successful intercalation was verified by X-ray diffraction. The in-vitro release tests of the nisin from the biohybrid formulation was held over 25 days in PBS medium (0.01 M, pH 7,4) and showed that no burst release phenomenon occurred at the beginning step, in addition, a sustained-time release of nisin was obtained compared with the free nisin. Therefore, these preliminary results are encouraging for the development of bioprotectors based on nisin intercalated LDH and being implemented in the food and medical industries.

2

^{2 1} Institut Européen des Membranes, UMR5635 UM ENSM CNRS,

²Laboratoire de Physique des Matériaux Lamellaires et Nanomatériaux Hybrides, Faculté des Sciences de Bizerte Université de Carthage,

³ Institut des Sciences Analytiques UMR CNRS 5280, Université Claude Bernard-Lyon 1,

1. Introduction

Food safety and extension of the shelf life of food products and microbiological quality represent a matter of urgency in the food and medical industries. Nowadays, making use of natural anti-microbials in food products is gradually becoming more common and established [4, 5]. One subgroup within the current realm of food preservatives is the bacteriocins, which are produced by bacteria and exhibit anti-microbial activity [6, 7]. Bacteriocins are peptides in nature; they differ from traditional antibiotics but can act as antibiotic synergists or alternatives to enhance the therapeutic effects of current infection treatments and decrease the prevalence of resistant strains [8]. Among these bacteriocins, nisin is currently the most widely used bacteriocin used in food safety item.

Nisin is a bacteriocin naturally derived from *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*, was originally discovered in 1928 [9] and has been used in food production as a food preservative since 1950 [7]. It is known as a popular biological preservative since it displays a selective spectrum of anti-microbial activity against microbial foodborne pathogens or food spoilage microorganisms [10]. It was approved as an additive for food use and has been assigned an E number of E234 by the “Food and Agriculture Organization/World Health Organization (FAO/WHO)”. It was also considered as a “Generally Regarded as Safe (GRAS)” substance by the “American Food and Drug Administration (FDA)”, which means that its use in food is safe and harmless for humans [11, 12].

However, the introduction of nisin into the food industry, and further development of biomedical applications, have been challenged by its bioavailability. Actually, the rapid loss of nisin activity in some foods products is an important factor limiting its effectiveness as food preservative. This is thought to be due to its interactions with food components like

⁴ Institut National de Recherche en Sciences et Technologies pour l'Environnement et l'Agriculture, Université Claude Bernard-Lyon 1

proteins and lipids or due to its enzymatic degradation [13-17]. Consequently, researchers worldwide are looking at ways to improve nisin stability and efficiency, thus, incorporation is an effective method to address these issues, and therefore to develop reliable delivery system for this bacteriocin.

Recently, preparation of heterostructured layered nanohybrids based on inorganic nanomaterials plays an important role in sustained release systems [18]. Among inorganic matrices, layered double hydroxides (LDH) are one of the most commonly used materials. Its basic structure consists of positively charged brucite-like layers of mixed metal hydroxides with an interlayer gallery containing charge compensating anions and water molecules. The metal cations occupy the centers of shared octahedra, whose vertices contain hydroxide ions that connect to form infinite two-dimensional sheets as shown in Figure 4.1. The general formula of LDH can be written as: $[M(II)_{1-x}M(III)_x(OH)_2]^{x+}[A^{n-}]_{x/n} \cdot yH_2O$, where M(II) is a divalent metal cation, may be as Mg, Mn, Ni, Zn, Co, Fe and Cu; M(III) is a trivalent metal cation, may be as Al, Fe, Co, Ni, Mn and Cr; A^{n-} is an interlayer anion, such as Cl^- , F^- , CO_3^{2-} , NO_3^- and SO_4^{2-} ; x is the layer charge (between 0.2 and 0.33) proportional to the molar ratio $M(II)/(M(II)+M(III))$. LDHs have received growing attention as cellular delivery systems due to their inertness, biocompatibility and low toxicity gives rise to safety and stability in biosystems [18, 19]. However, it has been reported in the literature the hybridization of such a food additive into LDH which offers a fascinating features for controlled and sustained release, improved water-solubility and even protective and targeted delivery. Ghotbi et al., [20] prepared ZnAl LDH-D-gluconate hybrid via ion-exchange and co-precipitation methods to regulate the release of acidity in the food industry. Tartrazine, an excellent UV adsorber that exhibits poor thermal stability, restricting its use as a potential photostabiliser was intercalated into MgAl LDH using the ion-exchange method by Wang et al., [21]. Thus,

intercalation of various biofunctional molecules into LDH can be accomplished by direct co-precipitation or indirect ion-exchange method [22, 23].

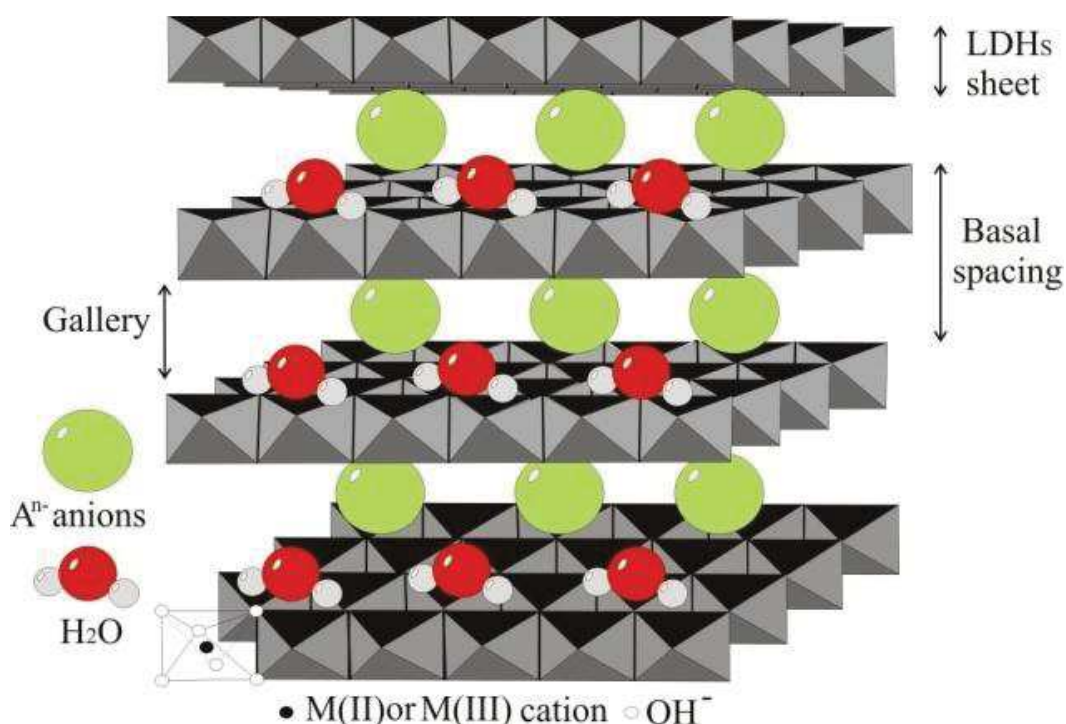


Figure 4.1: Schematic structure of the layered double hydroxide [24].

Despite the large number of delivery systems allowing a controlled release of nisin such as biopolymers alginate/cellulose [25], alginate/pectin [5], alginate/guar gum [26] and alginate/starch [27], no papers investigating the use of LDH as new packaging materials for nisin biomolecules have been reported so far. In the present study, ZnAl LDH is used to enclose nisin and act as a diffusion barrier to limit and control the diffusion rate and to ensure a sustained release of nisin concentration. Actually, the hybridization of nisin into ZnAl LDH was carried out through ion-exchange method regarding the influence of the Zn²⁺/Al³⁺ ratio, the anion exchange capacity, the nature of the intercalated anion, the host matrix, and the host morphology.

2. Materials and methods

2.1. Reagents

Aluminum chloride hexahydrate $\text{AlCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (CAS 7784-13-6), magnesium chloride hexahydrate $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (98% CAS 7791-400-6), zinc chloride ZnCl_2 (98 % CAS 7646-85-7), sodium carbonate (CAS 497-19-8), sodium hydroxide NaOH (97% CAS 1310-73-2), and urea $\text{CO}(\text{NH}_2)_2$ (CAS 57-13-6) were purchased from Prolabo. Commercial nisin from *Lactococcus lactis* (CAS 1414-45-5), and phosphate-buffered saline tablets (PBS) were purchased from Sigma Aldrich. Distilled water (18.2 M Ω) was used during all experiments. All chemicals were used as received except nisin, which was used after purification process. Typically, nisin was first dissolved in PBS and subsequently centrifuged (5000 rpm for 10 min) to remove insoluble proteins from the preparation. Then the supernatant was filtered through 0.22 μm sterilized-membranes (Millipore). Purified nisin solutions were stored at 4°C until further use.

2.2. Synthesis of the LDH precursors

Different conditions such as molar ratio, potentially intercalated anion and divalent cation were chosen to prepare the host materials, layered double hydroxides. Mother liquor containing M(II)Cl_2 and M(III)Cl_3 where M(II): Zn, Mg and M(III): Al were used to prepare ZnAl and MgAl LDH precursors. Typically, co-precipitation method was adapted in the synthesis by dropwise addition of a basic solution to the mother liquor with a constant flow of 0.12 mL/min using syringe-pump system equipped with a pH meter which allows the pH to be maintained constant. The suspension was aged at room temperature with magnetic stirring (400 rpm) for 7 h and carried out under nitrogen gas flow. Then the resulting precipitates were collected by centrifugation, washed thoroughly with distilled water and finally dried and kept at room temperature for 24 h. The parameters determining LDH synthesis are given in Table 4.1.

Table 4.1: Co-precipitation parameters of LDH compounds.

Compound	M^{II}/M^{III}	Salt (M)		NaOH (M)	Na_2CO_3 (M)	pH
		$M^{II}Cl_2$	$AlCl_3$			
ZnAl-Cl	2	0.66	0.33	2	-	7.5
	3	0.75	0.25	2	-	7.5
	4	0.80	0.20	2	-	7.5
ZnAl- CO_3	2	0.66	0.33	2	0.5	7.5
MgAl-Cl	2	0.66	0.33	2	-	9.0

The LDH host was also synthesized by urea hydrolysis reaction. In a typical procedure, 1.8 g of $ZnCl_2$ and 1.6 g of $AlCl_3 \cdot 6H_2O$ were dissolved in distilled water to form a solution with a total volume of 120 mL. The urea $CO(NH_2)_2$ (19.8 g) was put into the solution and reaction is maintained in a oil bath (90 °C) for 3 days. The residual solution was poured out. Finally, the precipitate was washed with distilled water and dried overnight and the $ZnAl-Cl_{urea}$ was obtained.

2.3. Nisin adsorption on LDH

At neutral pH, nisin charge is reduced by the deprotonation of the histidines residue. In this respect the adsorption assays were carried out by ion-exchange reaction in phosphate buffer medium PBS (0.01 M, pH 7.4). Briefly, 10 mL of nisin solution in the range of (0.5 – 5 mg/mL) is added to 50 mg of LDH under magnetic stirring at 23 °C for 4 h of contact time. Preliminary experiment of kinetic study showed that this time is enough to reach equilibrium. After that, the suspension was centrifuged at 1600 rpm for 15 min, washed with distilled water and then dried at room temperature for 24 h. The interfacial concentration (Te) (Eq 4.1) of encapsulated nisin, unbound nisin (C_e) left in the supernatant after centrifugation of the reaction mixture were estimated by absorbance UV-vis at 208 nm.

$$\Gamma_e = (C_0 - C_e) \frac{V}{m} \quad (\text{Eq 4.1})$$

Where:

C_0 (mg/mL): the initial concentration of nisin;

V (mL): the volume of the suspension;

m (mg): the mass of LDH.

2.4. Nisin release study

The release test of the encapsulated nisin was carried out at constant temperature 23°C as follows: an amount of 5 mg of encapsulated nisin was dispersed in 10 mL of PBS buffer medium (0.01 M, pH 7.4) and then placed in dialysis membrane that was immersed in 200 mL of PBS under continuous stirring at a slow speed of 470 rpm. At predetermined time intervals, aliquot tests of the buffer were withdrawn and examined spectrophotometrically in order to estimate the amount of nisin diffused out into the buffer medium from the dialysis membrane [10, 28]. Free nisin was used in the release experiment to compare the release rate of the encapsulated nisin. The nisin release rate (**Eq 4.2**) was quantified as the mass percentage of the released amount of nisin to the encapsulated amount of nisin before release:

$$\text{Release}_{(\%)} = \frac{100 \text{ Released nisin}}{\text{Total nisin}} \quad (\text{Eq 4.2})$$

2.4. Physicochemical characterizations

The powder x-ray diffraction (XRD) patterns were recorded on a Bruker D8 Advance diffractometer, using $\text{CuK}\alpha$ radiation ($\lambda = 1.54060 \text{ \AA}$) at 40 kV and 40 mA with a 2θ angle ranging from 2.0° to 70.0° in step of 0.02° . Infrared spectra (FTIR) were recorded in absorbance mode using a NEXUS FTIR (Thermo Scientific) spectrophotometer in the range

of 4000-400 cm^{-1} . Transmission electron images (TEM) were performed on FEI Tecnai G2 microscope with an accelerating voltage of 200 kV. Scanning electron micrographs (SEM) were recorded on a Jeol JSM-5400 microscope working at electron energy of 15 kV. Quantitative determinations of encapsulated and released nisin were acquired by UV-Visible spectroscopy using JASCO V-570 UV-Visible spectrophotometer with scanning rate of 1 nms^{-1} . Surface area analysis was determined by N_2 adsorption/desorption at 200 °C on an ASAP 2020 surface area analyzer (Micromeritics Instrument Corporation, United States).

3. Results and discussions

3.1. Adsorption kinetic

The kinetic study was carried out by introducing amounts of 50 mg of LDH into 10 mL of nisin solution 2 mg/mL, the mixtures were left under continuous stirring for time intervals of up to 24 h. The amount of encapsulated nisin was estimated by the characteristic absorption bands at 208 nm using the UV-vis spectra of nisin and the plots of adsorption concentration of encapsulated nisin vs. contact time for each LDH are presented in Figure 4.2. As seen from Figure 4.2, all curves present similar behavior but the adsorption rates on each LDH are very different, contributing to 62% to 94% of the total adsorption and indicating that the encapsulation efficiency is influenced by the molar ratio, intercalated anion, and host matrix. The first phase corresponds to a fast adsorption, whereas the second one starts after 1 h of contact time. Indeed, the adsorption capacity increased rapidly in the first hour, and then became slower for the next few hours until it reached the equilibrium. To ensure that the equilibrium state was fully achieved, the adsorption of nisin on ZnAl LDH compounds was performed with contact time of 4 h, except for MgAl LDH compound for which the experiment was performed with contact time of 24 h due to the unstable adsorption of nisin, actually, after 6 h of contact time the amount of adsorption decreased and increased until reaching equilibrium.

To further understand the kinetic sorption of the nisin on the LDH compounds, two kinetic models: pseudo-first-order model (**Eq 4.3**) and pseudo-second-order (**Eq 4.4**) have been used to fit the experimental data and to understand the mechanism involved in the sorption process of nisin. Their mathematical equations are given below:

$$\log (\Gamma_e - \Gamma_t) = \log \Gamma_e - \left(\frac{k_1}{2.303} \right) t \quad \text{(Eq 4.3)}$$

$$\frac{t}{\Gamma_t} = \left(\frac{1}{k_2 \Gamma_e^2} \right) + \left(\frac{1}{\Gamma_e} \right) t \quad \text{(Eq 4.4)}$$

Where Γ_e (mg/mg) is the interfacial concentration of nisin at equilibrium, Γ_t (mg/mg) is the interfacial nisin concentration at time t and k_1 and k_2 the reaction rate constants.

The calculated values of the kinetic modeling are listed in the Table 4.2. The pseudo-second-order is more appropriate to fit and explains the sorption data with high linear correlation coefficient ($R^2 \approx 0.994-0.999$) (**Figure 4.3**) and a small difference between the experimental and the calculated values of the equilibrium adsorption capacity. These results led to the conclusion that the pseudo-second-order sorption mechanism is predominant and that the overall rate constant k_2 of sorption process appears to be controlled by chemical sorption or chemisorption process, involving valency forces through sharing or exchange of electrons between sorbent and sorbate [29].

Table 4.2: Kinetic parameters of nisin adsorption on LDH compounds.

LDH	Γ_e (exp) (mg/mg)	Pseudo-first-order			Pseudo-second-order		
		Γ_e (mg/mg)	k_1 (min^{-1})	R^2	Γ_e (mg/mg)	k_2 (min^{-1})	R^2
Zn ₂ Al-Cl	0.27	1.64	0.05	0.82651	0.29	9.16	0.99824
Zn ₃ Al-Cl	0.24	1.93	0.01	0.88923	0.24	13.19	0.99965
Zn ₄ Al-Cl	0.17	2.845	0.006	0.96872	0.17	45.43	0.99985
Mg ₂ Al-Cl	0.33	1.648	0.03	0.98301	0.34	9.42	0.99482
Zn ₂ Al-CO ₃	0.16	1.82	0.008	0.85344	0.19	5.66	0.99928
Zn ₂ Al-Cl _{urea}	0.17	1.74	0.04	0.87917	0.20	6.60	0.99869

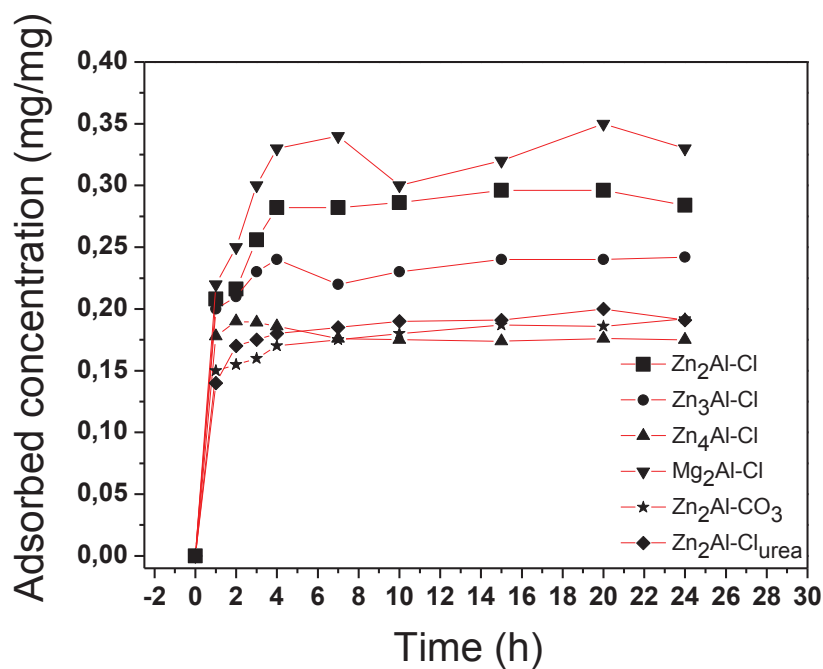


Figure 4.2: Kinetic study of the nisin adsorption on LDH at 23 C.

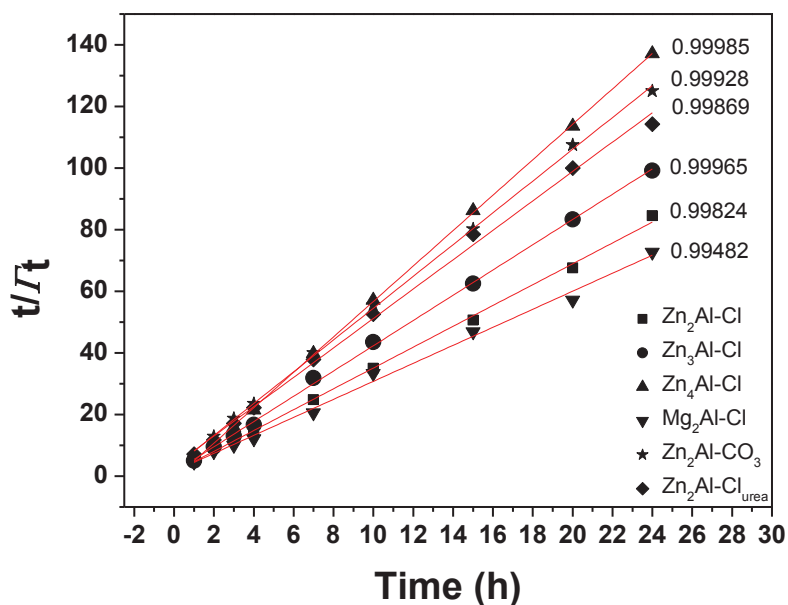


Figure 4.3: Pseudo-second-order plot of nisin adsorption on LDH.

3.2. Nisin adsorption on Zn_RAl-Cl (R = 2, 3 and 4)

Numerous studies have been reported that the adsorption capacity of LDH varies greatly with different M^{2+}/M^{3+} molar ratios [30-32]. Figure 4.4 displays the nisin adsorption isotherms on Zn₂Al-Cl, Zn₃Al-Cl and Zn₄Al-Cl LDH compounds. As shown in Figure 4.4, all curves display L-type according to the classification of Giles ($k_F > 1$) [33]. At low equilibrium concentration C_e (below 0.6 mg/mL), a net increase of the amount of nisin adsorbed Γ_e is observed upon increasing nisin concentration, and above this value the isotherm had a tendency to reach a plateau. However, for Zn₂Al-Cl, Γ_e continues to increase again at high C_e value. These results suggest that the adsorption proceeds in two steps: saturation of the external sites is followed by an interlayer process occurring at high C_e values. A similar trend was observed for the adsorption of MO dye by CoFe LDH [32].

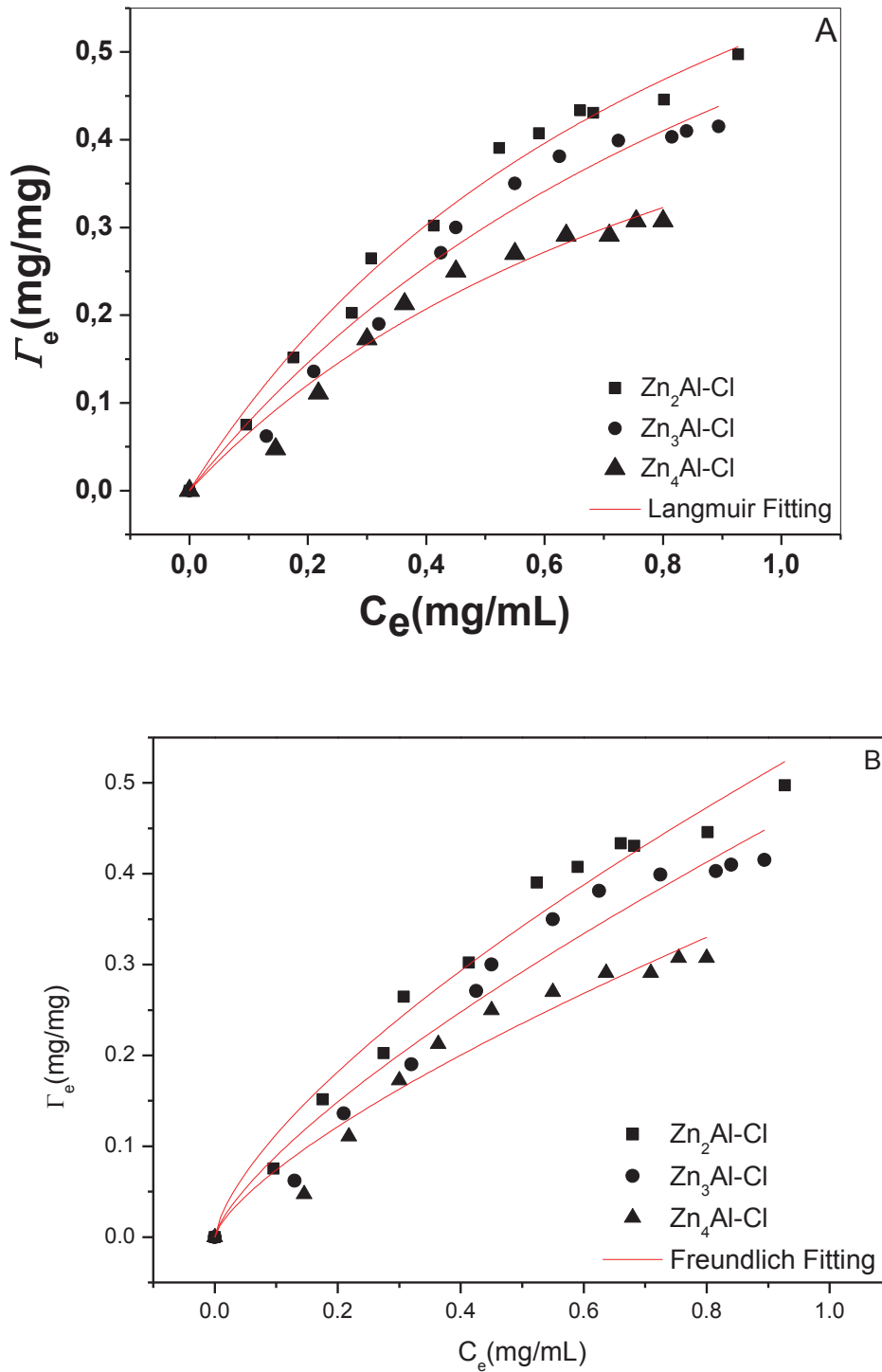


Figure 4.4: Adsorption isotherms of nisin on LDH with different molar ratio, R = 2, 3 and 4; (A) stand for Langmuir isotherm; (B) stand for Freundlich isotherm.

Two empirical equations, Langmuir (Eq 4.5) and Freundlich (Eq 4.6) isotherm models were used to correlate the experimental data and to find the best fit using a non-linear regression (Figure 4.4):

$$\Gamma_e = \frac{\Gamma_m k_L C_e}{1 + k_L C_e} \quad (\text{Eq 4.5})$$

$$\Gamma_e = \Gamma_m' \cdot C_e^{1/k_F} \quad (\text{Eq 4.6})$$

where Γ_m and Γ_m' is constant that estimate the adsorption capacity, and k_L and k_F are constants that estimate the affinity of the adsorbate-adsorbent according to Langmuir and Freundlich respectively. The calculated parameters of the Langmuir and Freundlich isotherms are listed in Table 4.3.

From the correlation coefficient (**Table 4.3**), it can be said that the sorption data of the LDH with different molar ratio fit both Langmuir isotherm mode and Freundlich isotherm mode well, but the maximum adsorption capacity Γ_m calculated from the Freundlich mode (**Table 4.3**) has been found to be more consistent compared to the experimental ones. This indicates that nisin adsorption is characterized by multilayer adsorption and adsorption onto heterogeneous surfaces [31].

Table 4.3: Langmuir and Freundlich parameters of nisin adsorption on Zn₂Al–Cl, Zn₃Al–Cl and Zn₄Al–Cl LDH compounds and anionic exchange capacity.

LDH	Γ_e (exp) (mg/mg)	Langmuir			Freundlich			a.e.c (meq/100 g)
		Γ_m (mg/mg)	k_L (L/mg)	R^2	Γ_m' (mg/mg)	$1/k_F$	R^2	
Zn ₂ Al–Cl	0.43	1.03	1.03	0.98799	0.55	0.68	0.97625	299
Zn ₃ Al–Cl	0,40	0.73	0.98	0.96278	0.48	0.73	0.96026	226
Zn ₄ Al–Cl	0.29	1.03	0.815	0.97446	0.38	0.72	0.94625	181

Based on these results, the adsorption capacity at the surface, up to $C_e < 0.6$ mg/mL, increases with the layer charge density (i.e. molar ratio) of the LDH compound $\text{Zn}_4\text{Al–Cl} < \text{Zn}_3\text{Al–Cl} < \text{Zn}_2\text{Al–Cl}$. This effect can be also seen through the linear relationship of Γ_m' vs. the anionic

exchange capacity (a.e.c) (**Figure 4.5**). Thus, the interaction nisin–LDH may mainly occur through electrostatic attraction and the adsorption proceeds via anion exchange mechanism.

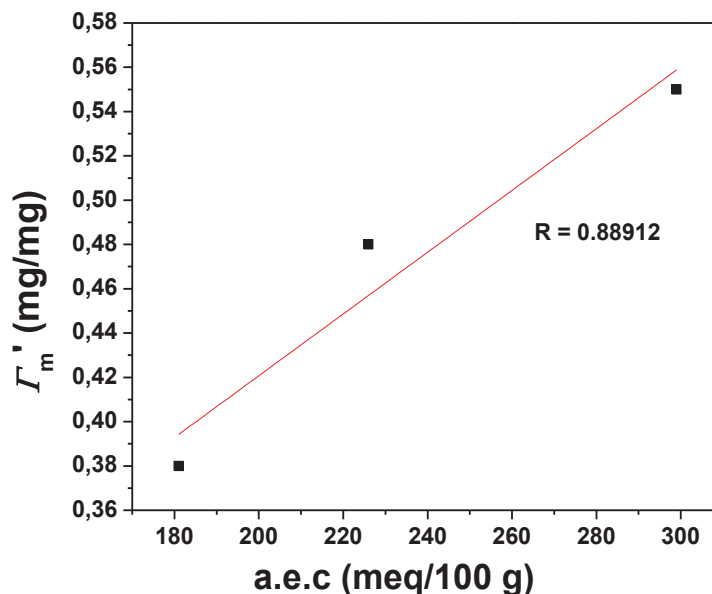


Figure 4.5: Plot of Freundlich adsorption capacity vs. anionic exchange capacity.

To gain further insight into the sorption mechanism, XRD patterns of the as-prepared LDH with different $\text{Zn}^{2+}/\text{Al}^{3+}$ molar ratio before and after adsorption were measured and shown in Figure 4.6. First, all diffraction patterns exhibit the characteristic reflections 003 , 006 , 009 and 110 corresponding to hexagonal LDH crystal structure with an $R\bar{3}m$ symmetry and suggesting that synthesized LDHs were crystallized with well-ordered structures. After interacting with nisin biomolecules, the intensity of XRD reflections reduces dramatically. Moreover, X-ray diffraction analysis shows a significant distinction in the basal spacing d_{003} of $\text{Zn}_2\text{Al}-\text{Cl}$ and $\text{Zn}_3\text{Al}-\text{Cl}$ (after adsorption), corresponds to an increase of 0,17 nm and 0,14 nm, respectively, which is likely to intercalation of nisin, indicating that a part of internal chloride anions were exchanged by nisin biomolecules. However, no change of the basal spacing of $\text{Zn}_4\text{Al}-\text{Cl}$ is notified after adsorption. These results were in good agreement with sorption isotherms, indicating presumably that some nisin ions are intercalated into the

interlayer of LDH compounds by chemisorption. The diameter of nisin molecules is approximately 2.23 nm estimated using protein size calculator, so such value may be associated with the nisin ions guests arranging parallelly or slantly to the layers in the interlayer spacing.

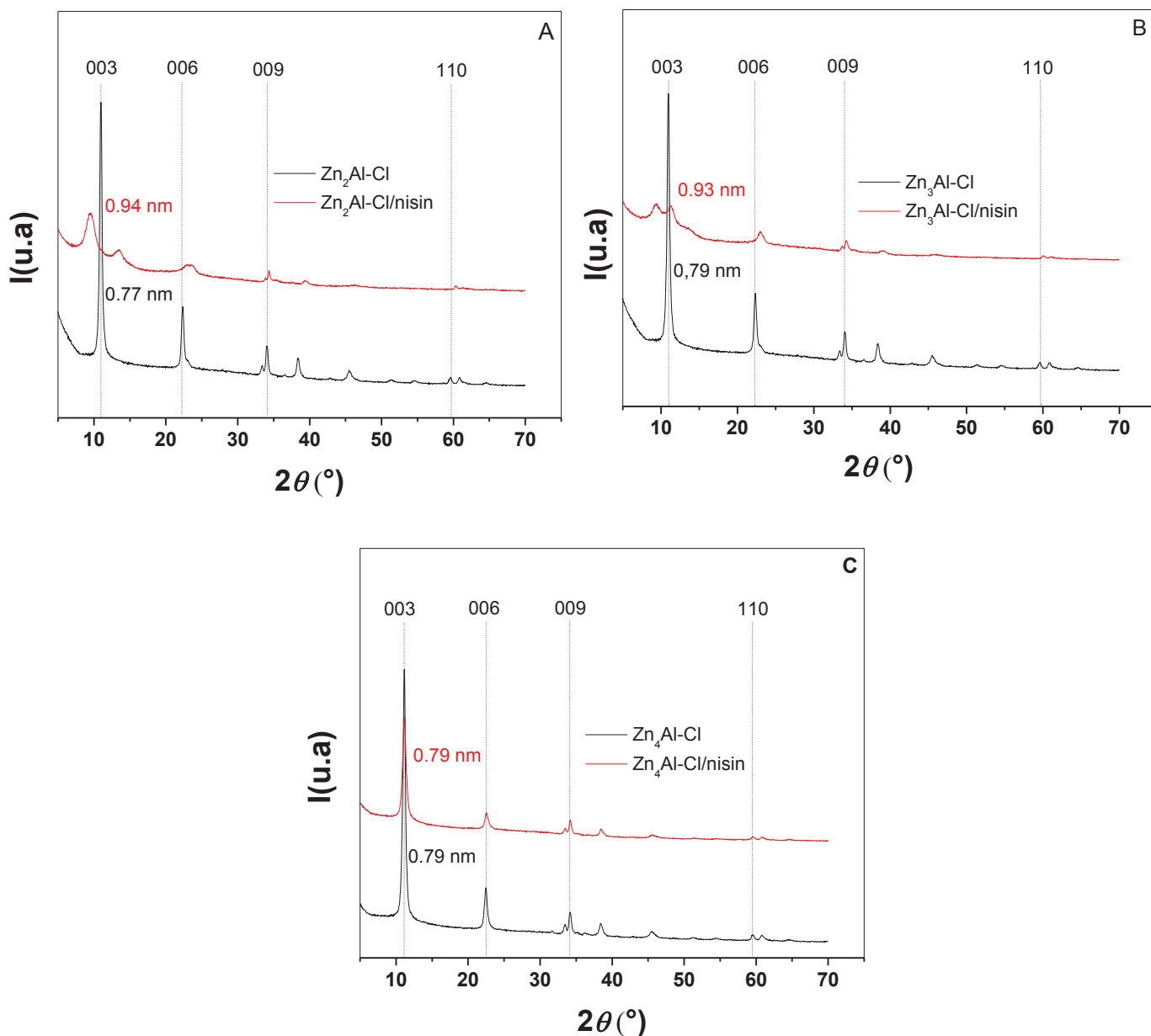


Figure 4.6: Powder X-ray diffraction (XRD) patterns of Zn_RAl-Cl and $Zn_RAl-Cl/nisin$ with different molar ratio, (A) $R = 2$, (B) $R = 3$ and (C) $R = 4$

3.3. Influence of the starting anion

In order to investigate the effect of LDH chemical composition on their adsorption properties, we recorded isotherms for materials with two types of potentially intercalated anions, $\text{Zn}_2\text{Al-Cl}$ and $\text{Zn}_2\text{Al-CO}_3$. Figure 4.7 shows the effect of the co-existence of chlorine and carbonate on LDH nisin adsorption in terms of adsorption capacity at equilibrium Γ_e . The results (**Table 4.4**) showed a significant difference in the sorption ability of both materials, which was found to decrease with the LDH/anion affinity order ($\text{NO}_3^- < \text{Cl}^- < \text{CO}_3^-$) proposed by Miyata [34] because carbonate anions are strongly held to the hydroxylated layers. This is consistent with the anionic exchange capacity (a.e.c) of each material (**Table 4.4**). Djebbi et al.[35] have found a similar tendency for the sorption of berberine drugs by MgAl LDH with Cl^- and CO_3^- as interlayer anion.

Like for $\text{Zn}_2\text{Al-Cl}$, the isotherm on $\text{Zn}_2\text{Al-CO}_3$ fit well with dual-mode model equations Langmuir (**Eq 4.5**) and Freundlich (**Eq 4.6**), while the maximum capacity calculated by the Freundlich isotherm (**Table 4.4**) is more compatible to the experimental one. The adsorption occurs in two steps; it starts at nisin equilibrium adsorption C_e about 0.6 mg/mL and reaches a plateau of 0.37 mg/mg at higher C_e , unlike $\text{Zn}_2\text{Al-Cl}$ which continues to increase again at high C_e value. This reflects an increasing difficulty for nisin to find sorption sites because they become occupied and led to the conclusion that any intercalation of the nisin is never obtained due the high competition between LDH sheets and carbonate anions. XRD profiles (**Figure 4.8**) confirms the finding, actually, the basal spacing value of $\text{Zn}_2\text{Al-CO}_3$ precursor is unchanged (0.75 nm).

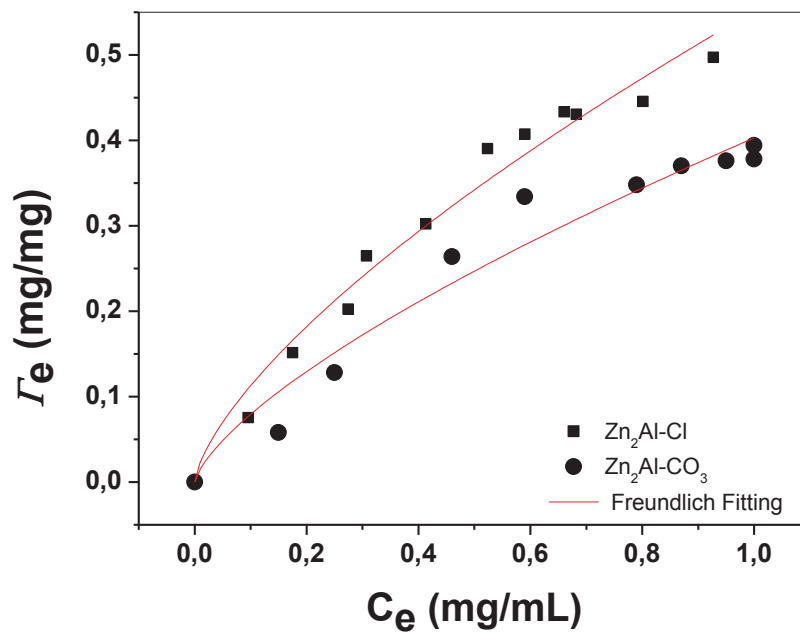


Figure 4.7: Freundlich isotherm model for nisin adsorption by Zn_2Al-Cl and Zn_2Al-CO_3 LDH compounds

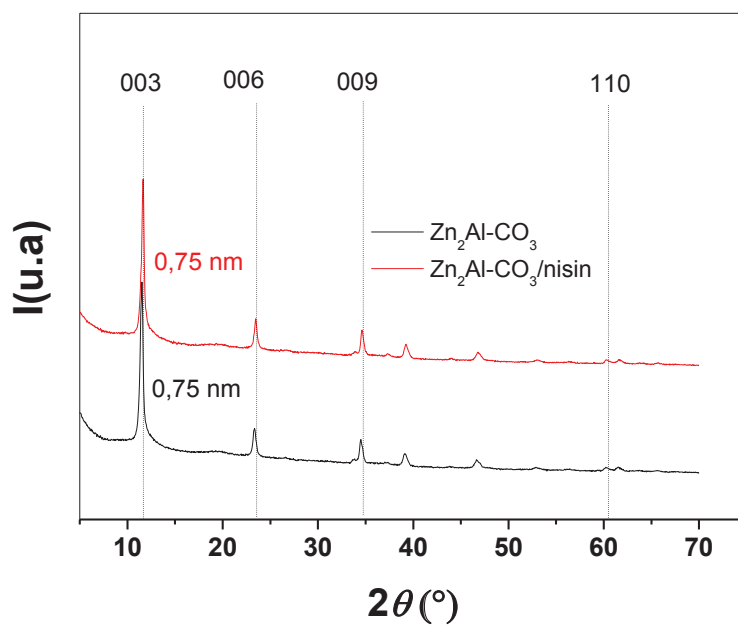


Figure 4.8: XRD patterns of Zn_2Al-CO_3 and $Zn_2Al-CO_3/nisin$.

Table 4.4: Langmuir and Freundlich parameters of nisin adsorption on Zn₂Al–Cl and Zn₂Al–CO₃ LDH compounds and anionic exchange capacity.

LDH	Γ_e (exp) (mg/mg)	Langmuir			Freundlich			a.e.c (meq/100 g)
		Γ_m (mg/mg)	k_L (L/mg)	R^2	Γ_m' (mg/mg)	$1/k_F$	R^2	
Zn ₂ Al–Cl	0.43	1.03	1.03	0.98799	0.55	0.68	0.97625	299
Zn ₂ Al–CO ₃	0,37	0.84	0.88	0.97076	0.40	0.70	0.95470	316

3.4. Influence of the host matrix

The effect of Mg₂Al–Cl LDH dosage on the nisin adsorption was studied and compared with Zn₂Al–Cl LDH. Adsorption capacity at different aqueous equilibrium concentrations is illustrated by the adsorption isotherm in Figure 4.9. We observe a rapidly increase in the nisin adsorption with the Mg₂Al–Cl host compared to Zn₂Al–Cl. In fact, the C_e equilibrium concentration needed to reach the adsorption plateau was 0.4 mg/mL and the efficiency in terms of the adsorption capacity was 0.48 mg/mg (**Table 4.5**). Unlike Zn₂Al–Cl, the increase in nisin initial concentration does not allow to force a second adsorption step, actually, we are even seeing a release of nisin. This could be explained by the fact that Mg₂Al–Cl displays smaller crystallite size than Zn₂Al–Cl (**Figure 4.10, Table 4.5**), which reduces the adsorption sites.

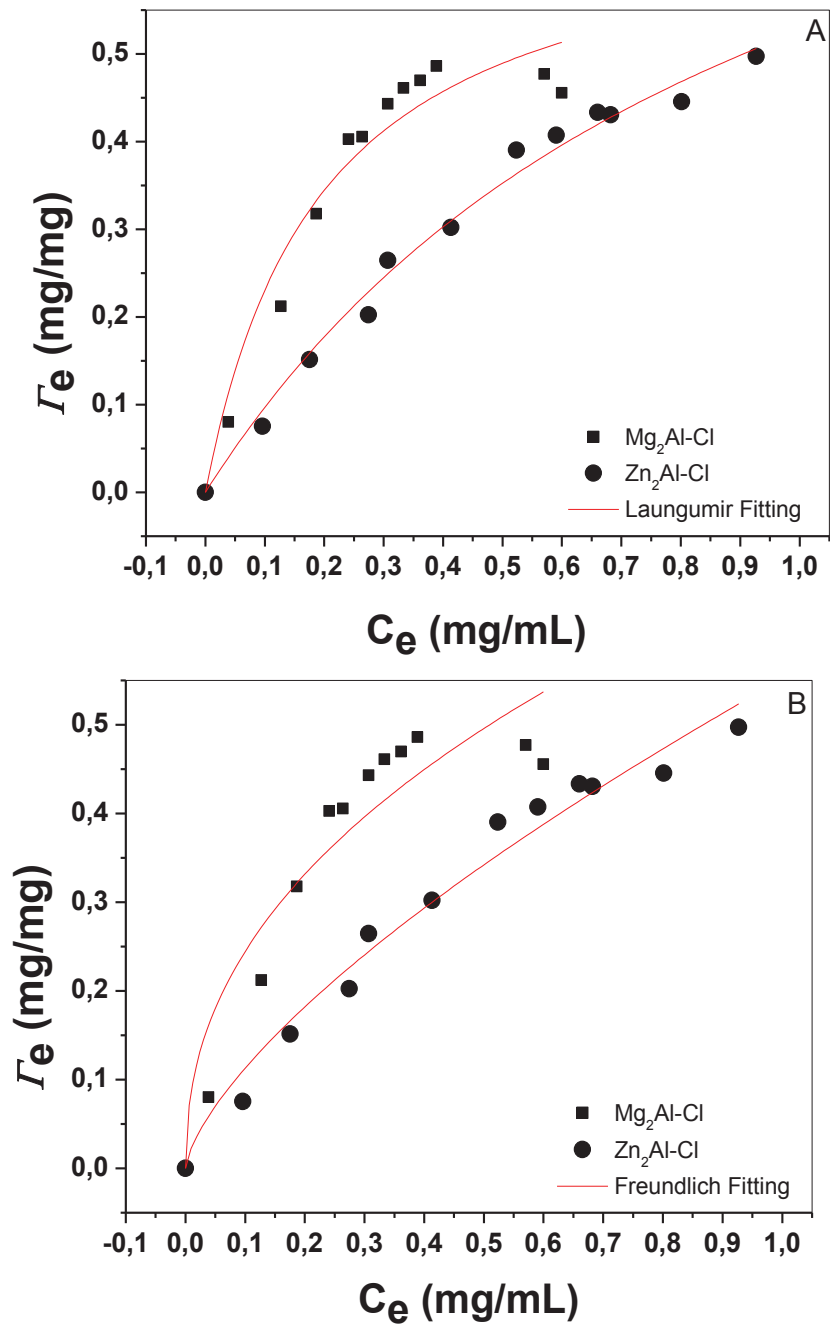


Figure 4.9: Adsorption isotherms of nisin on Zn₂Al-Cl and Mg₂Al-Cl LDH; (A) stand for Langmuir isotherm; (B) stand for Freundlich isotherm.

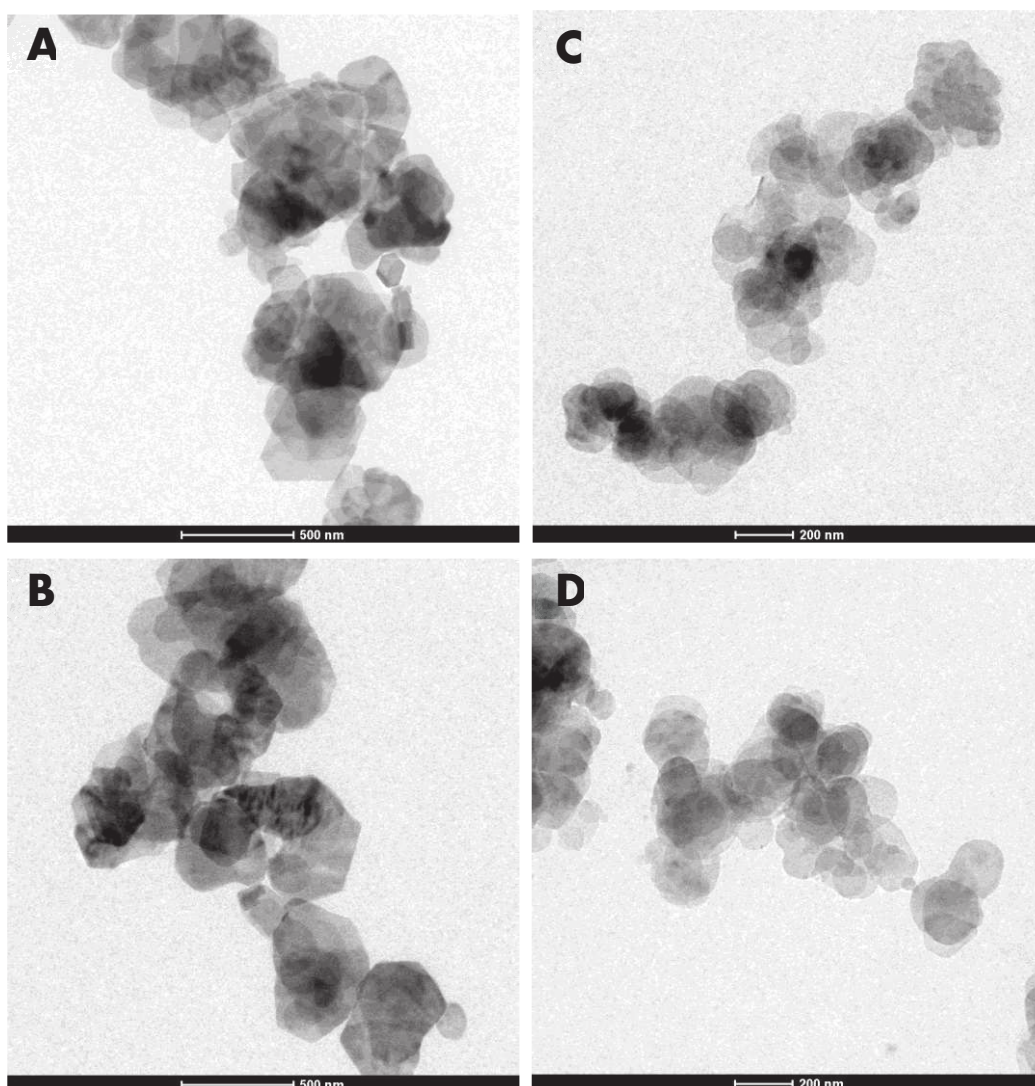


Figure 4.10: TEM micrographs of (A, B) Zn_2Al-Cl and (C, D) Mg_2Al-Cl LDH.

As shown above (**Figure 4.9**), Langmuir and Freundlich were applied to describe the adsorption behavior at equilibrium. The obtained parameters for both models are listed in Table 4.5. By contrast with Zn_2Al-Cl which is better fitted with Freundlich mode model, adsorption isotherm on Mg_2Al-Cl is more adequate to Langmuir mode model ($R^2 \approx 0.95173$). This observation confirms the fact that the adsorption saturates and no further adsorption occurs due to the occupancy of the active sites.

Table 4.5: Langmuir and Freundlich parameters of nisin adsorption on Zn₂Al–Cl and Mg₂Al–Cl LDH compounds and average crystallite size.

LDH	Γ_e (exp) (mg/mg)	Langmuir			Freundlich			Average crystallite size* (nm)
		Γ_m (mg/mg)	k_L (L/mg)	R^2	Γ_m' (mg/mg)	$1/k_F$	R^2	
Zn ₂ Al–Cl	0.43	1.03	1.03	0.98799	0.55	0.68	0.97625	266.2
Mg ₂ Al–Cl	0,48	0.68	5.12	0.95173	0.67	0.43	0.89343	194.7

*Crystallite size in the c direction calculated by Debye-Scherrer equation: $D = k\lambda/\beta\cos\theta$ (where k denotes the Scherrer's constant ($k = 0.9$), λ is the wavelength of the radiation used, β the full-width at half-maximum of diffraction line and θ is the Bragg diffraction angle).

3.5. Influence of the host morphology

Based on the above optimized condition, Figure 4.11 displays the adsorption isotherm of Zn₂Al–Cl synthesized via the method of the thermal hydrolysis and metering of urea. The isotherm is well fitted by Freundlich model (**Table 4.6**). And it has been shown that Zn₂Al–Cl synthesized by urea has a less nisin adsorption than that synthesized by co-precipitation. This result shows that the adsorption capacity of the LDH is obviously related to the synthesis condition that determines the specific surface area and the size of the crystallites. Indeed, the co-precipitation method leads to the formation of small hexagonal platelets whose size varies between 50-200 nm and incorporated in sand rose shape. However, the urea method produces larger particles (above 1 μ m), weakly aggregated. These textural differences are reflected in different surface area, 130 and 22 respectively (**Figure 4.12**).

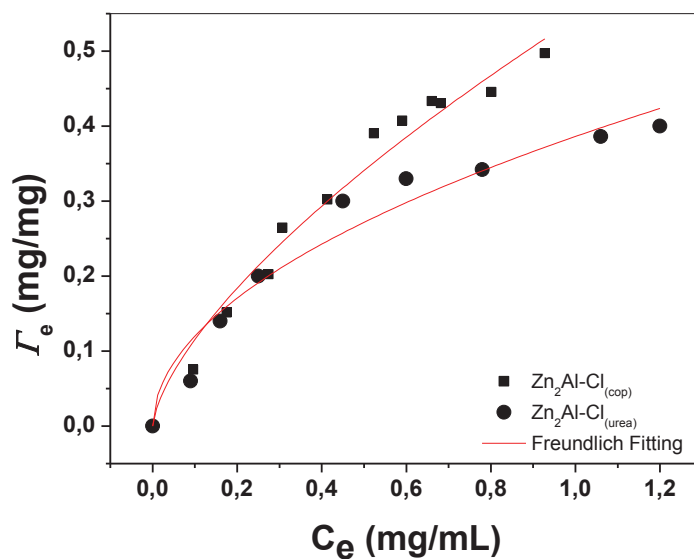


Figure 4.11: Freundlich isotherm model for nisin adsorption by $Zn_2Al-Cl_{(cop)}$ and $Zn_2Al-Cl_{(urea)}$.

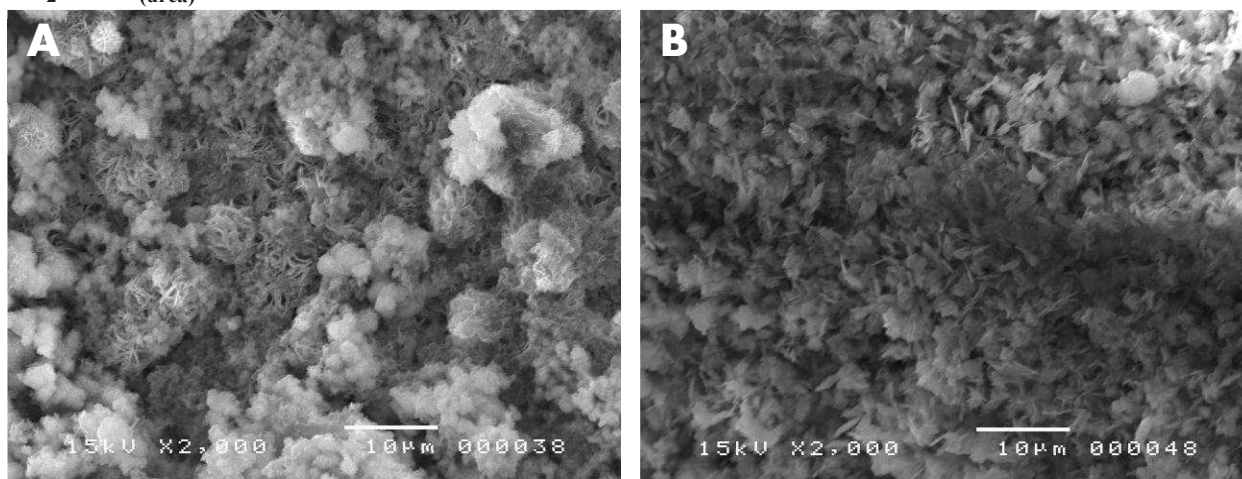


Figure 4.12: SEM micrographs of (A) $Zn_2Al-Cl_{(cop)}$ and (B) $Zn_2Al-Cl_{(urea)}$ LDH.

Table 4.6: Langmuir and Freundlich parameters of nisin adsorption on $Zn_2Al-Cl_{(cop)}$ and $Zn_2Al-Cl_{(urea)}$ LDH compounds and surface area.

LDH	Γ_e (exp) (mg/mg)	Langmuir			Freundlich			Surface area (m^2/g)
		Γ_m (mg/mg)	k_L (L/mg)	R^2	Γ_m' (mg/mg)	$1/k_F$	R^2	
$Zn_2Al-Cl_{(cop)}$	0.43	1.03	1.03	0.98799	0.55	0.68	0.97625	130
$Zn_2Al-Cl_{(urea)}$	0,39	0.56	2.17	0.98741	0.38	0.50	0.95543	22

3.5. In-vitro controlled release of nisin

The nisin release profile from Zn₂Al–Cl LDH matrix at physiological pH (7.4) at a constant temperature of 23°C (temperature in which nisin can be typically stored with no significant loss of activity) was investigated in phosphate buffer medium using UV-vis spectrophotometer at 208 nm and the curve plots the cumulative release vs. releasing time is shown in Figure 4.13. Free nisin was also used in the control. Data analysis of the release curves shows that the release of nisin from LDH occurred in a sustained manner, in fact, no burst effect is observed during the tests and the release rate is increased gradually up to 75% of the cumulative release in 25 days. However, the free nisin shows a faster release within the first four hours (up to 70% of the cumulative release) from the dialysis membrane into the saline solution, followed by sluggish phase of total release. Thus, it is evident that the nisin release from the LDH takes 3 times longer than that of free nisin due to the release of roughly bound nisin molecules from the edges and the interlayer spaces of the LDH host. Comparatively, the release efficiency of the LDH loading nisin is compared with some recently reported works in the literature [10, 36]. The release ability of LDH matrix is much more suitable than those considered in the literature, chitosan–alginate [10] and chitosan–alginate–pluronic [36] nanoparticles, which have showed a release efficiency of 80% and 85%, respectively, within 240 and 4 hours in comparison with the present work, 75% in 600 hours.

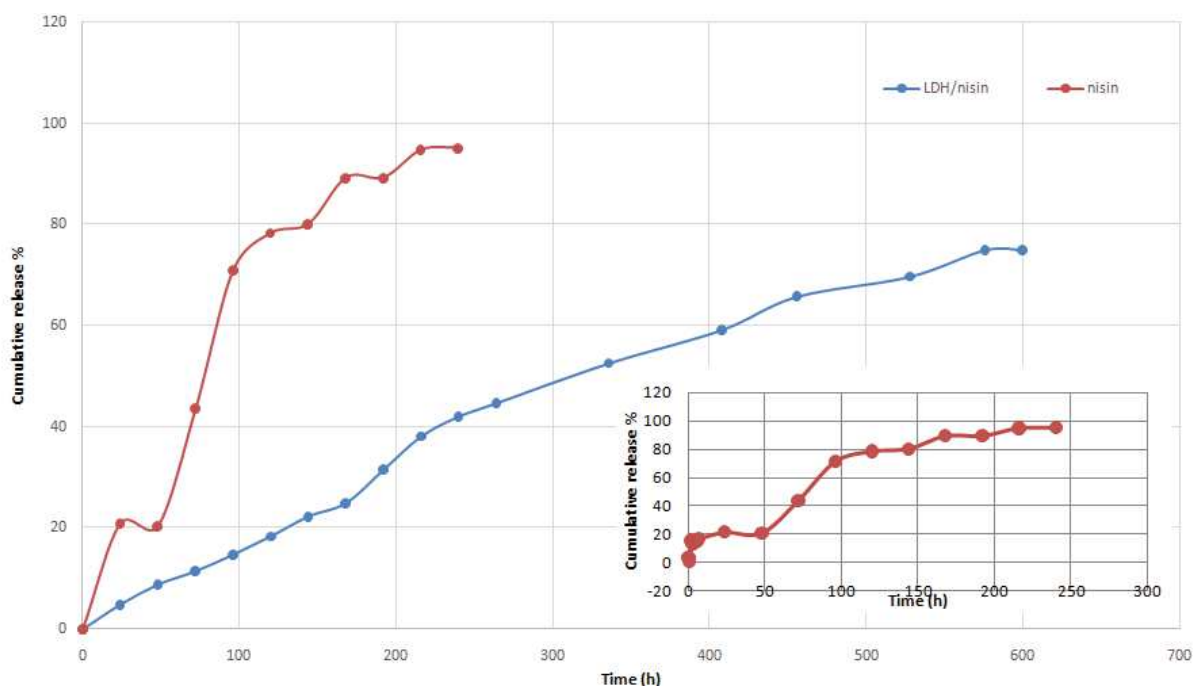


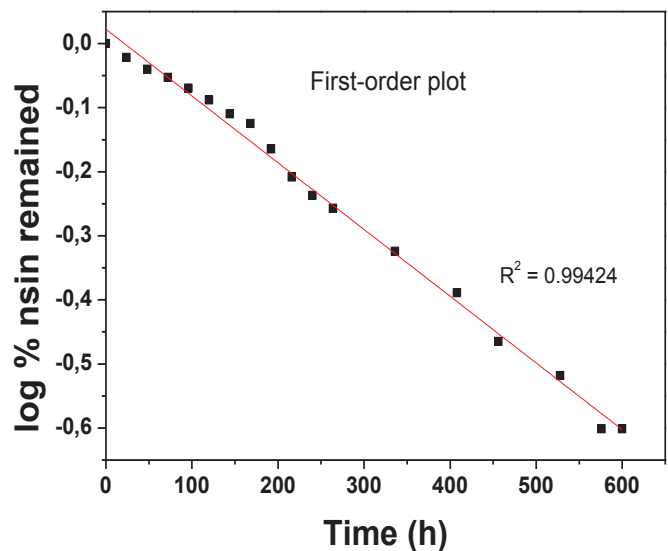
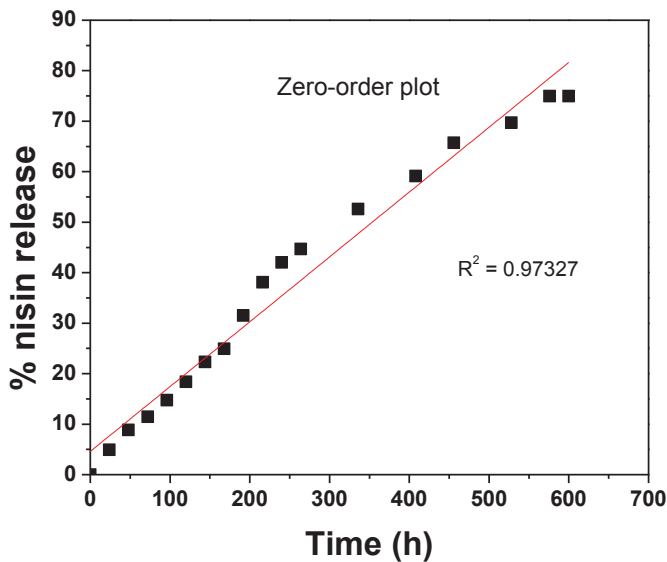
Figure 4.13: Comparison of in vitro release profile of nisin and nisin loaded Zn_2Al-Cl LDH.

To elucidate the release mechanism of nisin from Zn_2Al-Cl LDH host, the release data were subjected to release kinetic study. Four models have been used to investigate the release dynamics, zero-order [37], first-order [37, 38], Higuchi [37, 38] and Korsmeyer-Peppas [37, 38] models in which the dissolved amount of nisin is compared to the function of the test time. Their mathematical equation as well as the corresponding mechanism are shown in Table 4.7 and their obtained plots are given in Figure 4.14

Table 4.7: Kinetic modeling used to analyze nisin release.

Model	Equation	Release mechanism
Zero-order	$Q = k_0t$	Release is independent of concentration
First-order	$\log(1-Q) = -k_1t$	Release depends on the concentration
Higuchi	$Q = k_Ht^{1/2}$	Release by diffusion
Korsmeyer-Peppas	$\log(M_t/M_\infty) = n \log t + \log k_{KP}$	Release by diffusion $n < 0.5$ Fickian diffusion $0.5 < n < 1$ non-Fickian diffusion

where Q is the dissolved amount of nisin; M_t is the amount of nisin released at time “t”, M_∞ is the amount of nisin released at time “∞”, n is the diffusion exponent and k_i is the release constant.



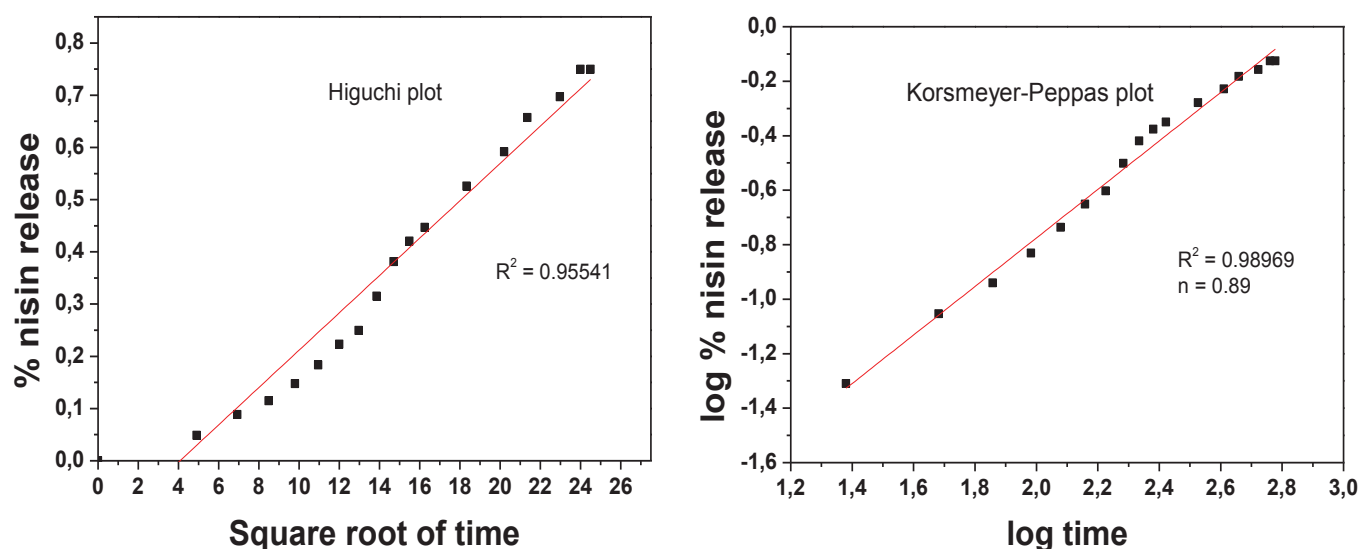


Figure 4.14: Kinetic plots of the nisin release from Zn_2Al-Cl LDH host.

After a visual inspection of the Figure 4.14, it can be concluded that all models can be used to describe the nisin release from the studied LDH. However, according to the R^2 values of the linear plots, it appears that both first-order and Korsmeyer-Peppas models are more appropriate for describing the release of nisin as they have the highest value of R^2 . Thus, it could be said that the release process of nisin followed a mix effect including both dissolution of nanoparticle and diffusion from the LDH host. Moreover, from the n value (around 0.9) of the Korsmeyer-Peppas plot it may be said that the nisin release follows non-Fickian anomalous law of diffusion, which mainly implies the ion-exchange reaction between nisin molecules and the anions phosphate in buffer solution.

In order to certify that the nisin release is mainly controlled by ion exchange reaction, the resultant powder was recovered after release and further characterized by FTIR and XRD analyses.

The infrared spectra (after release) is shown in Figure 4.15A. It shows a broad and intense band around 1040 cm^{-1} corresponding to the vibration mode $\delta(P-OH)$ with contribution of $\nu(P-O)$ stretching vibration, extensively coming from the buffer phosphate. The small peak at

1640 cm^{-1} can also be assignable to deformation mode of P–OH. While the typical absorption peaks of nisin around 1595, 1250, 1123, and 1045 cm^{-1} , which could be assigned to the amide groups $-\text{NH}_2$, the O–H group and C–C or C–N stretching vibration, respectively, disappeared, indicating that most great part of nisin anions had been released from the interlayer spaces. However, the release of nisin molecules from the LDH elicits a slightly smaller reduction in the band intensity at 3400 cm^{-1} due to the interaction of phosphate ions with the hydroxyl groups. The XRD patterns is depicted in Figure 4.15B. After release of nisin into PBS, the (003) diffraction peak, which indicate the LDH basal spacing, shift to the right side, suggesting that the basal spacing in the LDH decreases. The basal spacing value d_{003} of $\text{Zn}_2\text{Al}-\text{Cl}/\text{nisin}$ after release is about 0.85 nm, which is probably similar to that phosphate containing LDH. In fact, the theoretical interlayer spacing of phosphate intercalated LDH can be determined from the size of the phosphate tetrahedron. Probable two kind of ionic height were calculated supposing phosphate anions contact with the host brucite-like layer through P–O bonds as represented in Figure 4.16. Neighboring P–O distance is estimated to be about 0.153 nm, an ionic radius of the O^{2-} ion of 0.138 nm, and an O–P–O bond angle of $109^\circ 58'$, geometrical calculations show that the interlayer spacing of LDH containing phosphate may range between 0.338 and 0.386 nm [39]. Here, the observed interlayer spacing is about 0.37 nm (0.86 nm basal spacing minus 0.48 nm hydroxide layer spacing), which is perfectly adapted to this range. Furthermore, the XRD analysis shows the apparition of new peak at 19° (2θ), which could be related to formation of KZnPO_4 phase [40]. Thus, it can be concluded that the release of nisin from $\text{Zn}_2\text{Al}-\text{Cl}$ LDH nanohybrid is mainly via ion exchange with phosphate anions. The drug release from the interlayer space experienced similar behavior against the phosphate exchange as most or part of the drug released [41-44].

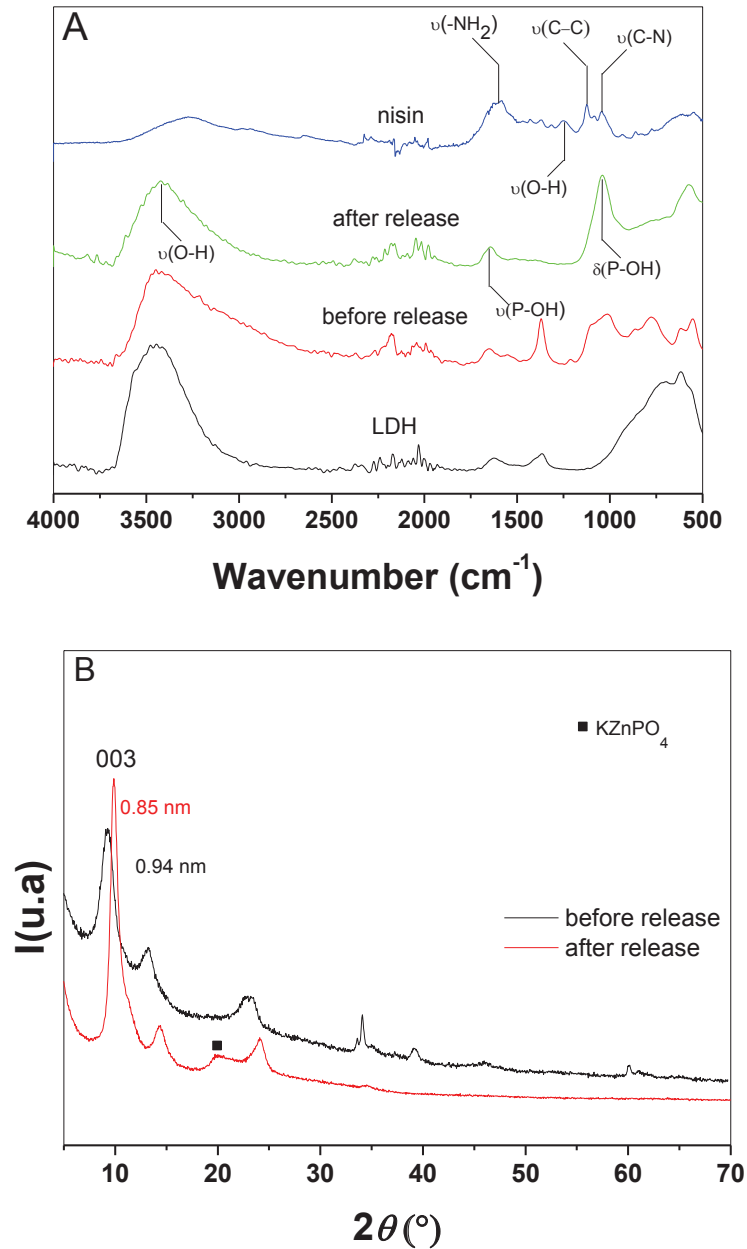


Figure 4.15: FTIR spectra (A) and XRD diffractograms (B) of the samples before and after being released in phosphate buffer (pH 7.4).

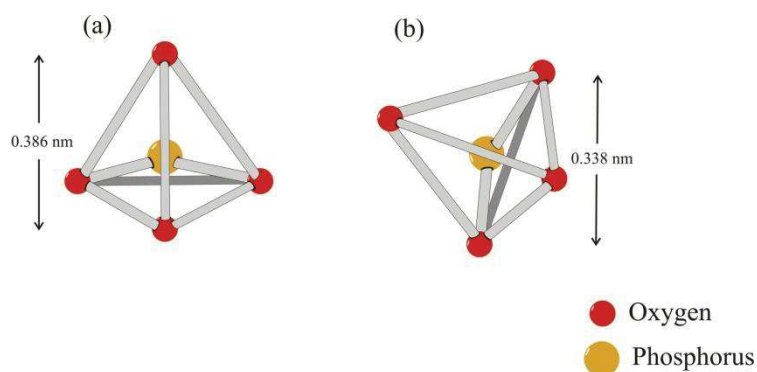


Figure 4.16: Possible orientations of phosphate anions in the interlayer gallery of LDH.

4. Conclusion

Carrier-guest biohybrid materials were obtained from the adsorption of nisin into ZnAl LDH via the ion exchange method. Adsorption characteristics including adsorption kinetics and isothermals were investigated over the influence of the layer charge density (i.e. molar ratio Zn^{2+}/Al^{3+}), the starting interlayer anion, the host matrix, and the host morphology. The results revealed that anion exchange capacity, particle size and surface area greatly influence the encapsulation efficiency as well as the adsorption mechanism. Powder X-ray diffraction indicate a successful intercalation of nisin into galleries of Zn_2Al-Cl . The intercalated structure of this biohybrid proposed that nisin molecules can adopt a multilayer arrangement parallelly or slantly to the LDH sheets in the interlayer space according to Freundlich model. Furthermore, the in vitro release study shows that there is no burst phenomenon that occurred at the beginning of release test in the phosphate buffer (pH 7.4). The introduction of Zn_2Al-Cl LDH could prolong the nisin release 3 time better than the nisin-free. The nisin release from the LDH carrier involves an ion exchange process between guest nisin and phosphate anions in the buffer. Therefore, as a result, the combination ZnAl LDH and nisin provides a sustained release system of nisin and may offer potential for delivery of other preservatives agents, in order to enhance the duration of their efficacy.

III. Partie complémentaire : Etude de l'adsorption de la nisine dans différentes phases HDL : évaluation de l'activité antibactérienne

1. Influence de la matrice sur la cinétique d'adsorption :

Nous avons étudié la cinétique d'adsorption de la nisine sur différentes matrices HDL : Zn_2Al-Cl , Mg_2Al-Cl , Mn_2Al-Cl et Ni_2Al-Cl afin de déterminer le temps nécessaire pour atteindre l'équilibre d'adsorption. L'étude de la cinétique a été effectuée dans les conditions suivantes (voir section 4.2 chapitre 2): une solution de nisine 2 mg mL^{-1} a été mise en contact avec 50 mg de la phase HDL. La Figure 4.17 présente les courbes de la cinétique d'adsorption à la température $T = 23^\circ\text{C}$, pour des temps compris entre 60 min et 24 h.

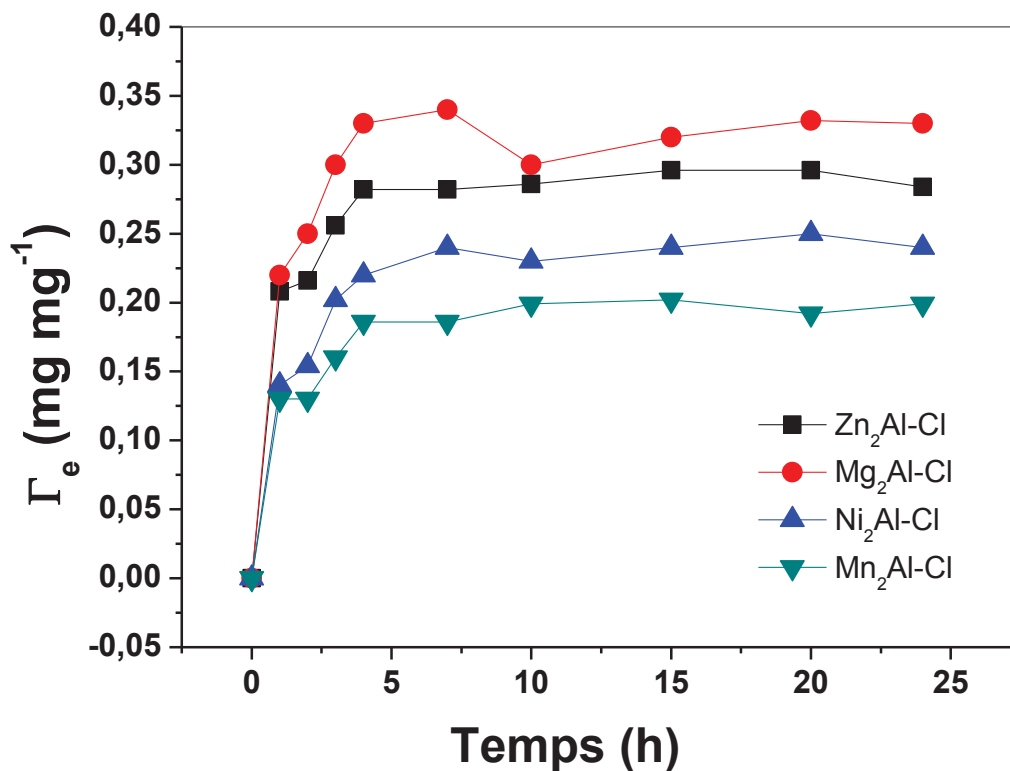


Figure 4.17: Etudes cinétiques de l'adsorption de la nisine dans les phases HDL. Zn_2Al-Cl (noir, carré), Mg_2Al-Cl (rouge, cercle), Ni_2Al-Cl (bleu, triangle haut) et Mn_2Al-Cl (vert, triangle bas).

Nous observons que toutes les courbes présentent un comportement identique mais la concentration interfaciale de la nisine à l'équilibre Γ_e est différente selon le type de la phase HDL (**Tableau 4.8**). On note que pour les toutes matrices HDL, la concentration interfaciale de la nisine augmente rapidement la première heure puis cette augmentation devient plus lente pendant les heures suivantes. L'état d'équilibre est atteint après 4 h pour les matrices Zn_2Al -HDL et Mn_2Al -HDL. Pour les deux matrices Ni_2Al -HDL et Mg_2Al -HDL l'équilibre est atteint après un temps de 10 h.

Nous avons considéré deux modèles pour décrire les données expérimentales : (i) le pseudo premier ordre et (ii) pseudo deuxième ordre.

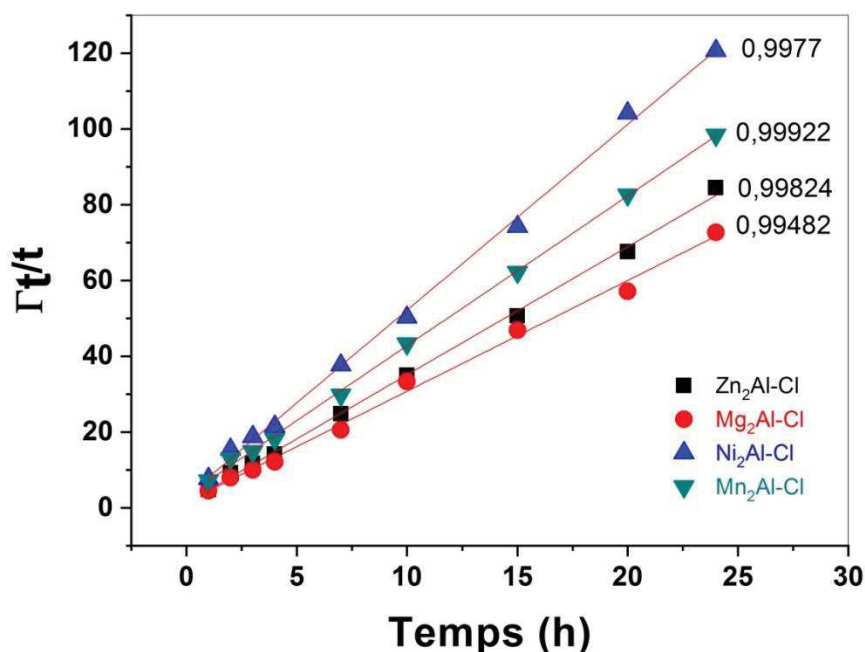


Figure 4.18: Pseudo-deuxième ordre pour l'adsorption de la nisine dans les différentes phases HDL : Zn_2Al (noir, carré), Mg_2Al (rouge, cercle), Ni_2Al (bleu, triangle haut) et Mn_2Al (vert, triangle bas).

Les valeurs obtenues par l'ajustement mathématique sont reportées dans le **tableau 4.8**. Le pseudo-deuxième ordre est le modèle le plus adapté pour ajuster les données expérimentales d'adsorption car le coefficient de corrélation est le plus élevé ($R^2 \approx 0,994-0,999$) (**Figure 4.18**). De plus, les valeurs calculées de la concentration interfaciale à l'équilibre Γ_e sont très

similaires à celles obtenues expérimentalement. Le coefficient k_2 est plus élevé dans les matrices Zn_2Al-Cl et Mg_2Al-Cl que pour les autres matrices. Ils présentent une concentration interfaciale plus importante que Mn_2Al-Cl et Ni_2Al-Cl . Cela confirme le rôle important de la matrice pour l'adsorption de la nisine.

Tableau 4.8: Paramètres cinétiques de la nisine adsorbée dans les différentes phases HDL.

HDL	Γ_e (exp) (mg mg ⁻¹)	Pseudo-première-ordre			Pseudo-deuxième- ordre		
		Γ_e (mg mg ⁻¹)	k_1 (min ⁻¹)	R ²	Γ_e (mg mg ⁻¹)	k_2 (min ⁻¹)	R ²
Zn₂Al-Cl	0.27	1.64	0.05	0.82651	0.29	9.16	0.99824
Mg₂Al-Cl	0.33	1.648	0.03	0.98301	0.34	9.42	0.99482
Ni₂Al-Cl	0.25	0.75	0.008	0.86701	0.253	4.80	0.99927
Mn₂Al-Cl	0.20	0.670	0.04	0.87606	0.204	7.53	0.9977

2. Localisation de la nisine dans les différentes phases HDL

Nous avons étudié la localisation de la nisine dans les matrices HDL. Pour ce faire, les diffractogrammes de diffraction des Rayon X des phases HDL seules sont comparés avec ceux des matériaux HDL-nisine. Les diffractogrammes (enregistrés en $2\theta^\circ$ de 5° jusqu'à 70°) sont reportés sur la figure 4.19. Toutes les phases HDL (Zn_2Al-Cl , Mg_2Al-Cl , Ni_2Al-Cl et Mn_2Al-Cl) présentent les pics caractéristiques 003 , 006 , 009 et 110 correspondant à la structure cristalline hexagonale d'une phase HDL avec une symétrie $R\bar{3}m$. Les phases HDL synthétisées ont donc été cristallisées avec des structures bien ordonnées. Toutefois, la phase Ni_2Al-Cl présente des pics très larges et moins intenses, montrant une faible cristallinité. La distance inter-réticulaire de la raie (003) correspond à la distance inter-feuillet, alors que la distance inter-réticulaire de la raie (110) représente la moitié de la distance métal-métal dans le feuillet. Dans le cas des phases synthétisées, la distance d_{003} obtenue avant adsorption ($d_{003}=0.77$) est conforme à celle reportée dans la littérature [45, 46].

L'adsorption de la nisine induit des résultats différents en fonction de la nature des phases HDL. Après l'échange ionique, une diminution remarquable de l'intensité des réflexions est observée pour toutes les phases. L'analyse par diffraction des rayons X montre une augmentation de l'espacement basal d_{003} pour Zn_2Al-Cl et Mg_2Al-Cl , correspondant respectivement à un élargissement de 0,17 nm (**Figure 4.19A**) et 0,14 nm (**Figure 4.19B**) (**Tableau 4.9**). Ce résultat indique qu'une partie des anions chlorures ont été échangés par des biomolécules de nisine. Ces dernières sont présentes à la fois en surfaces des grains et dans les espaces inter-feuillets. Pour la matrice Mn_2Al-Cl , le diffractogramme de DRX ne montre aucun changement de l'espace basal, la nisine est donc localisée uniquement à la surface des grains. Enfin pour la matrice Ni_2Al-Cl , il n'est pas possible de conclure. En effet, la phase n'est pas parfaitement cristallisée et ne permet pas de confirmer que la nisine est bien intercalée dans les espaces inter-lamellaires (**Figure 4.19C**).

Tableau 4.9: distance basale avant et après adsorption de la nisine dans les phases HDL.

Echantillon	Zn_2Al-Cl	Mg_2Al-Cl	Ni_2Al-Cl	Mn_2Al-Cl
d_{003} avant adsorption	0.77 nm	0.77 nm	0.77 nm	0.77 nm
d_{003} après adsorption	0.94nm	0.913 nm	0.85 nm	0.76 nm

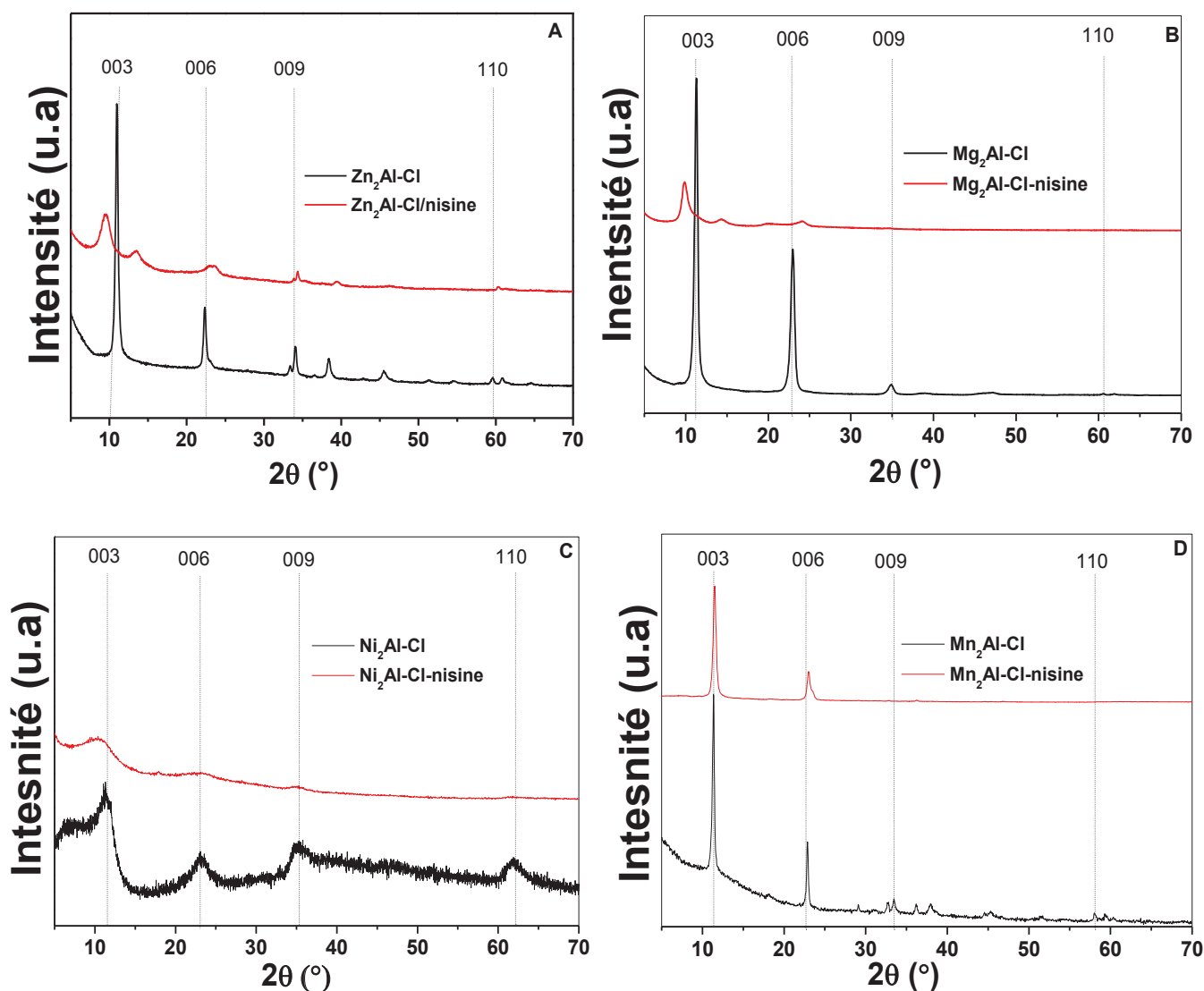


Figure 4.19: Diffractogrammes des rayons X sur poudre des différentes phases HDL-nisine : (A) Zn₂Al-Cl (noire) et Zn₂Al-nisine (rouge), (B) Mg₂Al-Cl (noir) et Mg₂Al-nisine (rouge), (C) Ni₂Al-Cl (noire) et Ni₂Al-nisine (rouge) et (D) Mn₂Al-Cl et Mn₂Al-nisine (rouge).

3. Influence de la phase HDL sur l'activité antibactérienne de la nisine

La nisine est un peptide antibactérien [1] à large spectre bactéricide qui est efficace contre de nombreuses bactéries à Gram positif [2]. Nous avons étudié son activité contre une souche bactérienne non pathogène à Gram + *Micrococcus luteus* (NCIMB 10149, Ecosse), par la méthode d'inhibition sur gélose décrite dans le **chapitre 2**. Dans cette partie, trois paramètres

ont été étudiés : le premier est l'effet de la matrice, le second est la température de conservation des matériaux et le troisième est la durée de leur conservation. Toutes les expériences ont été effectuées avec la même concentration de nisine, libre ou adsorbée (2 mg mL⁻¹).

3.1. Etude dynamique de la nisine libre

Pour définir le temps d'incubation nécessaire des géloses, une étude dynamique a été conduite avec la nisine libre. En cours d'expérience, une zone claire (ou zone d'inhibition) apparaît au centre de la plaque où a été préalablement déposé la nisine. Elle se présente globalement sous la forme d'un disque dont le diamètre est mesuré au cours du temps jusqu'à 100 h (**Figure 4.20**). Chaque expérience a été reproduite deux fois indépendamment pour déterminer la surface moyenne de la zone d'inhibition au cours du temps.

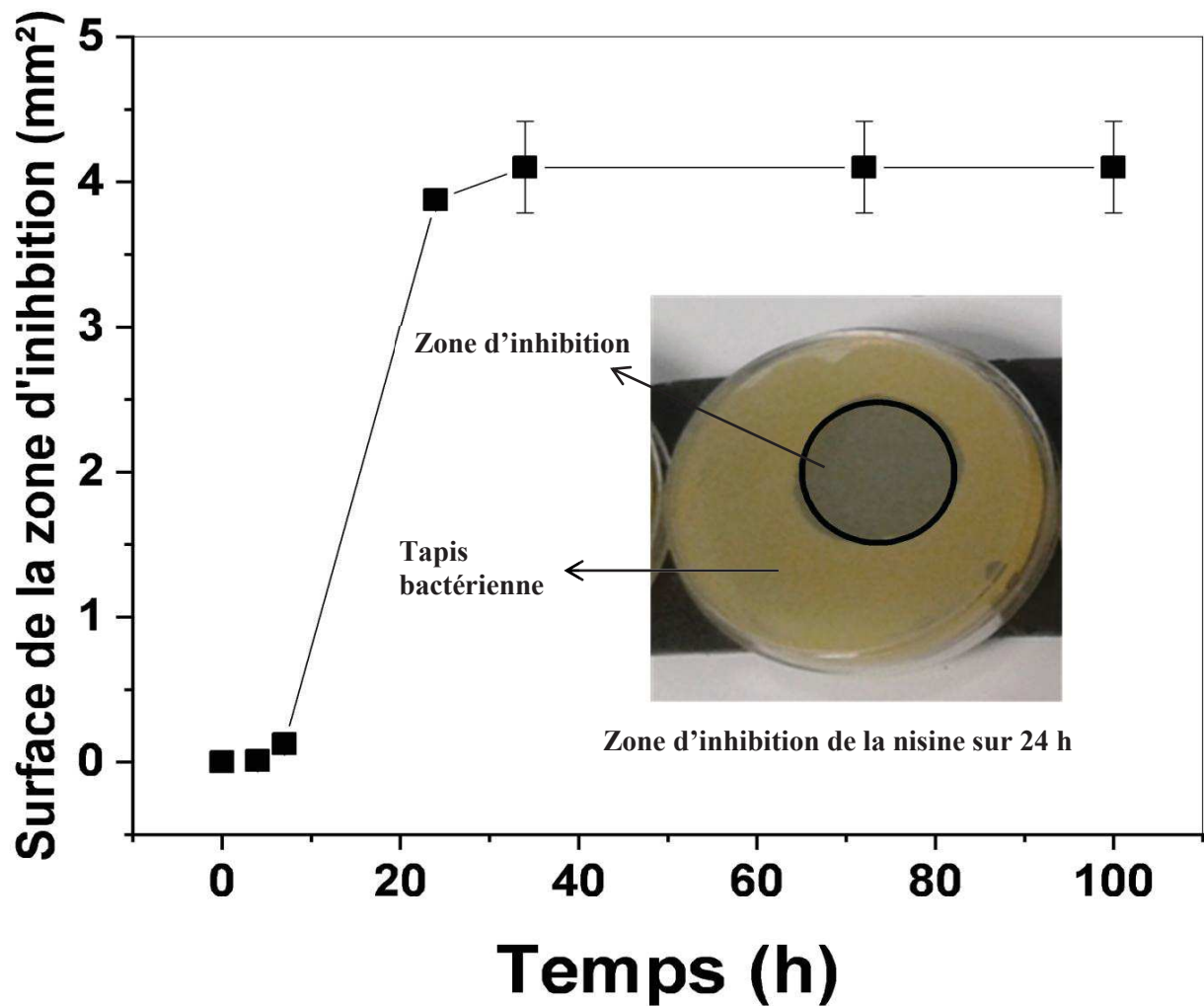


Figure 4.20: Cinétique d'évolution des zones d'inhibition moyennes S (cm^2) formées autour de la nisine, pour la bactérie *Micrococcus luteus*.

D'après la Figure 4.20, on remarque que la surface de la zone d'inhibition atteint un maximum au bout de 24 h. La surface de la zone d'inhibition reste ensuite constante jusqu'à 100 h. Ce résultat montre que l'activité antibactérienne de la nisine se maintient entre 24 h et 100 h. Sur la base de cette cinétique, nous avons fixé un temps d'incubation de 24 h pour les géloses mises en œuvre dans toutes les expériences suivantes.

3.2.Effet de la matrice et effet de la température

L'activité antibactérienne de la nisine adsorbée sur différentes matrices HDL, de type Zn_2Al -nisine, Mg_2Al -nisine, Ni_2Al -nisine et Mn_2Al -nisine, a été évaluée sur des matériaux stockés à 4°C après synthèse sur des périodes allant de 3 jours à 15 jours. Sans nisine, les phases HDL

ne présentent aucune activité antibactérienne (**Figure 4.21**). Après l'adsorption de la nisine, on note l'apparition de zones claires pour tous les échantillons (**Figure 4.22**).

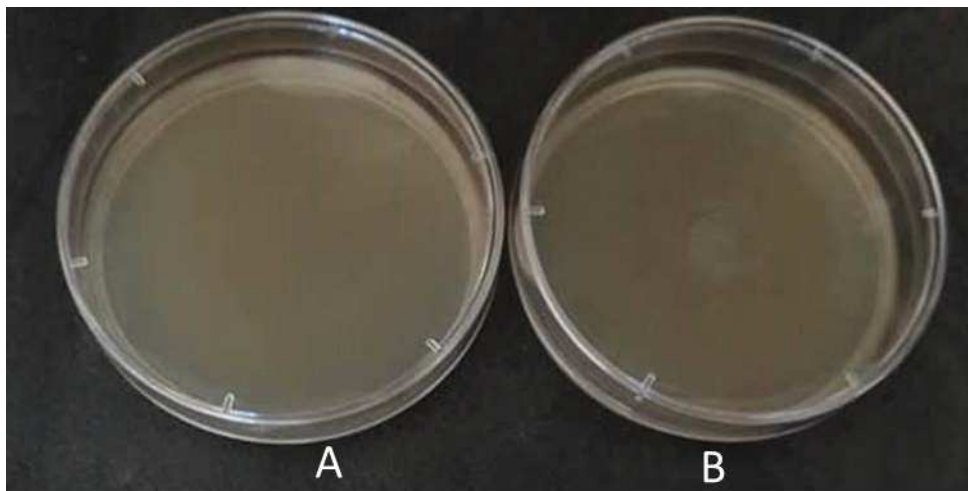


Figure 4.21: (A) Tapie bactérienne, et (B). le matériau HDL seul de type (Mg₂Al-Cl).

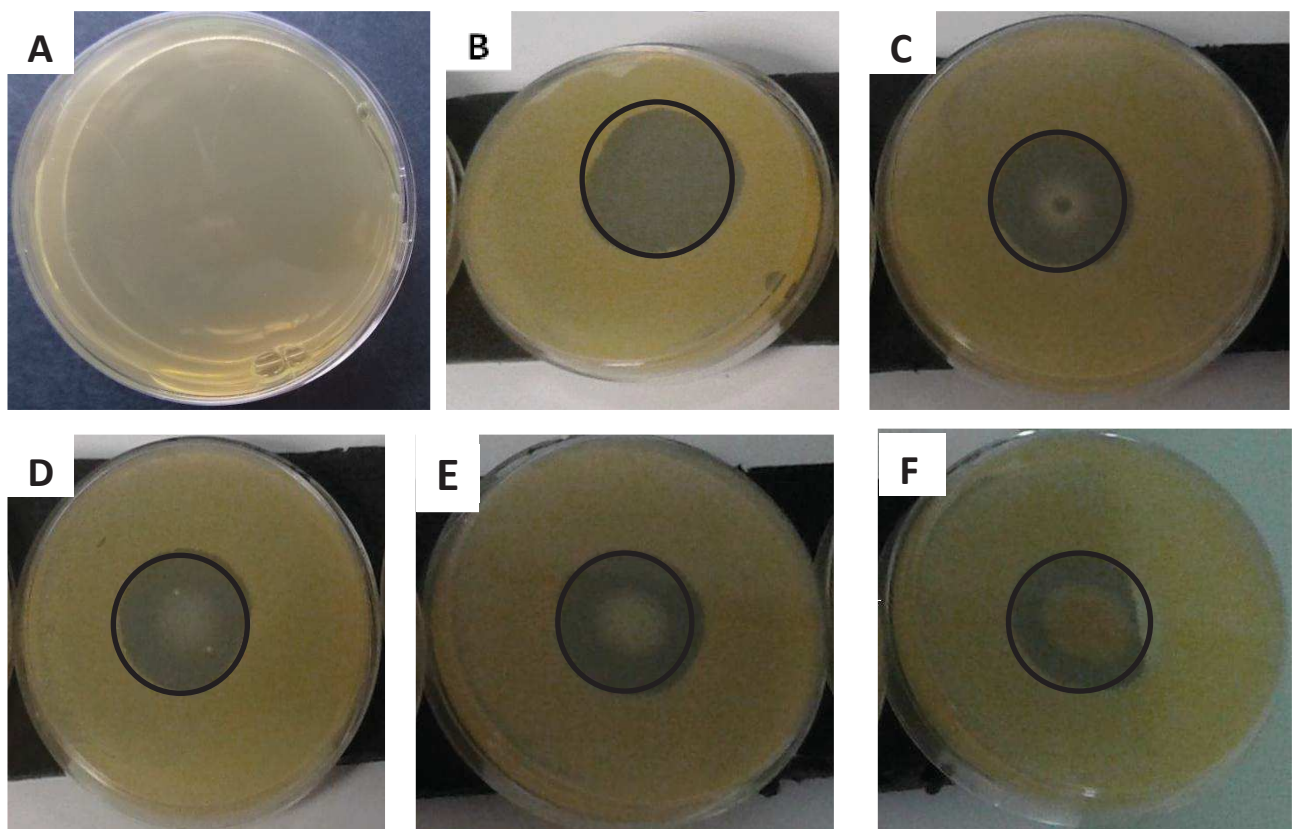


Figure 4.22: Zones d'inhibition mesurées pour : (A) témoin négatif (sans bactérie ni matériau), (B) nisine libre (C) Zn₂Al-HDL-nisine (D) Mg₂Al-HDL-nisine (E) Ni₂Al-HDL-nisine et (F) Mn₂Al-HDL-nisine stockées à 4°C pendant 3 jours.

Les surfaces moyennes d'inhibition obtenues au bout de 24 h pour les différents matériaux, stockés à 4°C ou à 30°C, pendant 3, 10 ou 15 jours, sont présentés en **Figure 4.23**. Ces résultats sont aussi exprimés en % par rapport à la zone d'inhibition maximale obtenue, c'est-à-dire pour la nisine libre stockée 3 jours à 4°C (**Tableau 4.10**). Le % d'inhibition pour un matériau donné ($\%_{\text{matériau}}$) est donc calculé comme suit :

$$\% \text{ d'inhibition} = \frac{\text{Surface d'inhibition mesuré pour le matériau}}{\text{Surface d'inhibition}} \quad (\text{Eq 4.7})$$

Pour la nisine libre stockée 3 jours à 4°C, ce % d'inhibition vaut donc 100 %.

Par ailleurs, chaque expérience est tripliquée de manière indépendante. Une analyse statistique des résultats de type test de Student (avec $p < 0.10$ soit $p < 10\%$) est mise en œuvre pour déterminer les corrélations significatives d'interactions entre deux paramètres étudiés. Les probabilités de corrélations entre natures d'HDL, températures de stockage et durées de stockage sont respectivement données dans les Tableaux 4.11, 4.12 et 4.13. Dans ces tableaux, les corrélations significatives, c'est-à-dire dont les probabilités sont inférieures à 10%, sont soulignées. Dans certains cas, des corrélations données significatives peuvent volontairement être exclues de considération si les écart-types associés paraissent trop grands pour permettre une interprétation physique pertinente.

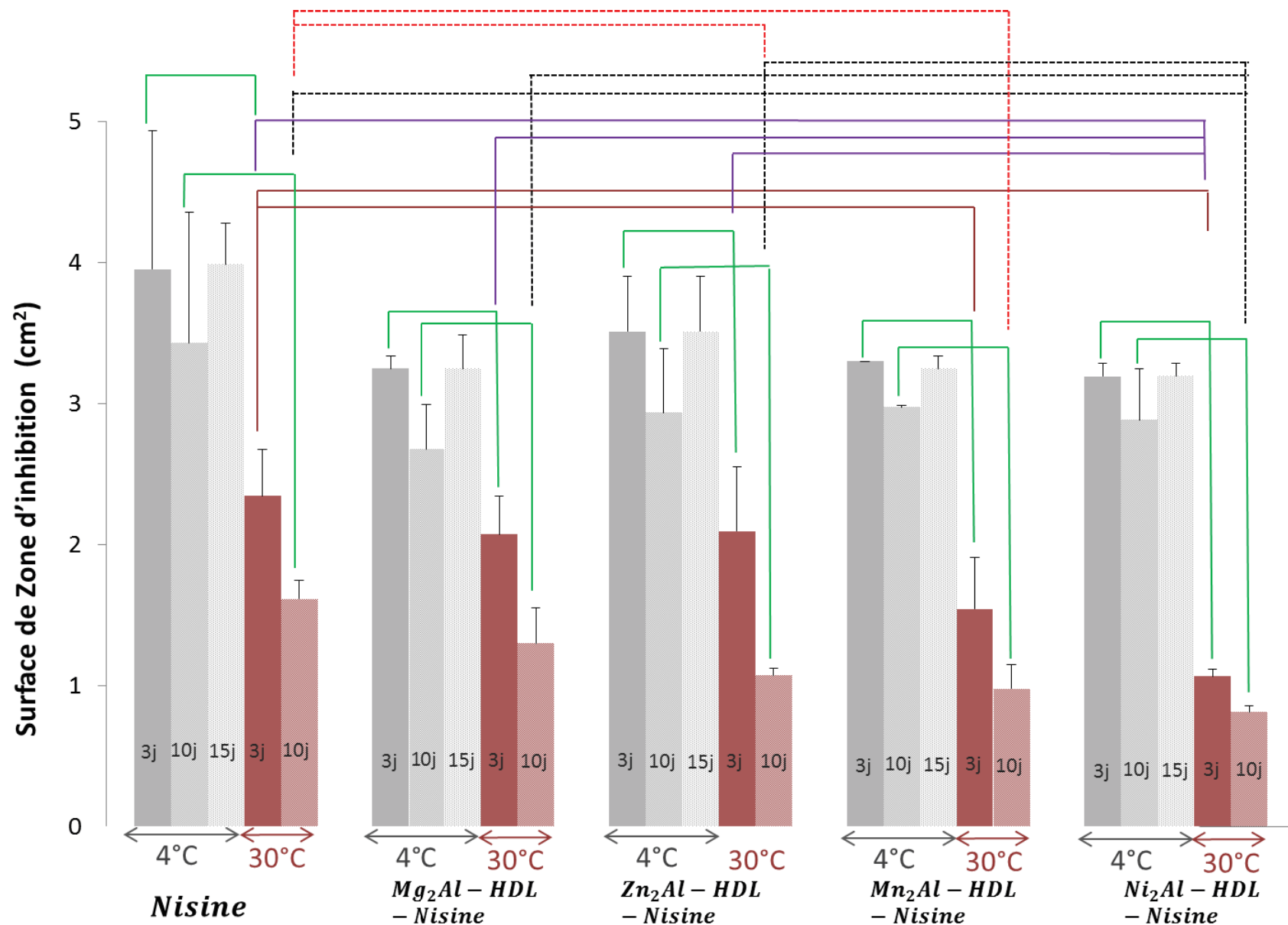


Figure 4.23: Surface moyenne des zones d'inhibition mesurées pour la nisine libre et la nisine adsorbée sur différents matrices HDL : Mg₂Al-nisine, Zn₂Al-nisine, Mn₂Al-nisine et Ni₂Al-nisine; les matériaux ont été préparé avec 2 mg mL⁻¹ de nisine, c'est-à-dire la même concentration de nisine libre, (n=3 pour chaque test) ; et p<0.10.

Tableau 4.10: Activité antibactérienne exprimée en % d'inhibition par rapport à l'inhibition maximale obtenue avec la nisine libre.

	4°C			30°C	
	3 j	10 j	15 j	3 j	10 j
Nisine	100%	87%	100%	59%	41%
Mg₂Al-nisine	82%	68%	82%	52%	33%
Zn₂Al-nisine	89%	74%	89%	53%	27%
Mn₂Al-nisine	83%	75%	82%	39%	25%
Ni₂Al-nisine	81%	73%	81%	27%	22%

Tableau 4.11: Probabilités (%) de corrélations significatives d'interaction entre la nisine libre et la nisine adsorbée sur différentes HDL (matériaux), notée nisine/matériaux, à 4°C et 30°C, pour différents temps de stockage (3, 10 ou 15 jours). Les corrélations significatives sont soulignées et les corrélations non considérées sont signalées par le sigle *.

Interaction	4°C			30°C	
	3 j	10 j	15 j	3 j	10 j
Nisine/Mg₂Al-nisine	34	29	3*	34	15
Nisine/Zn₂Al-nisine	53	47	17	49	<u>1</u>
Nisine/Mn₂Al-nisine	37	49	37	<u>5</u>	<u>1</u>
Nisine/Ni₂Al-nisine	31	42	52	<u>2</u>	<u>0.5</u>

Lorsque les matériaux sont stockés à 4°C pendant 3 à 15 jours, aucune différence significative n'est visible entre la nisine libre et la nisine adsorbée, quelle que soit la matrice HDL. Dans le

cas de l'interaction Nisine/ Mg₂Al-nisine, le fait que la probabilité de corrélation soit donnée significative est très certainement liée au fait d'une part que les zones d'inhibition mesurées pour la nisine et la nisine adsorbée sur Mg₂Al-HDL soient proches (100% et 82% respectivement, **Tableau 4.10**) et d'autre part, que l'écart-type sur la zone d'inhibition moyenne de la nisine libre soit forte ($4,5 \pm 0,6 \text{ mm}^2$, **Figure 4.22**).

Lorsque les matériaux sont stockés à 30°C pendant 3 jours, on constate trois corrélations significatives d'interaction : Nisine/Mn₂Al-nisine et Nisine/Ni₂Al-nisine. Lorsque les matériaux sont stockés à 30°C pendant 10 jours, une autre interaction devient également significative : Nisine/Zn₂Al-nisine.

Tableau 4.12: Probabilités (%) de corrélations significatives d'interaction entre les nisine adsorbées sur les différentes HDL, notée matériau-nisine/ matériau-nisine, à 4°C et à 30°C, et pour différentes durées de stockage : 3, 10 et 15 jours. Les corrélations significatives sont soulignées et les corrélations non considérées sont signalées par le sigle *.

	4°C			30°C	
	3 j	10 j	15 j	3 j	10 j
Mg₂Al-nisine/Zn₂Al-nisine	37	46	39	94	25
Mg₂Al-nisine/Mn₂Al-nisine	42	24	100	12	15
Mg₂Al-nisine/Ni₂Al-nisine	52	49	75	<u>2</u>	<u>7</u>
Zn₂Al-nisine/Mn₂Al-nisine	45	90	37	18	46
Zn₂Al-nisine/Ni₂Al-nisine	30	88	30	<u>6</u>	<u>0,4</u>
Mn₂Al-nisine/Ni₂Al-nisine	18	71	52	15	23

Deux corrélations d'interaction apparaissent être significatives, pour un stockage à 30°C pendant 3 et 10 jours : Mg₂Al-nisine/Ni₂Al-nisine et Zn₂Al-nisine/Ni₂Al-nisine.

Tableau 4.13: Probabilités (%) de corrélations significatives d'interaction entre une température de stockage de 4°C et de 30°C, pour la nisine libre ou adsorbée sur les différentes HDL. Deux temps de stockages sont considérés : 3 et 10 jours. Les corrélations significatives sont soulignées et les corrélations non considérées sont signalées par le sigle *.

Interaction	3 j	10 j
Nisine 4°C/Nisine 30°C	<u>9</u>	<u>7</u>
Mg ₂ Al-nisine 4°C/ MgAl-nisine 30°C	<u>1</u>	<u>0.5</u>
Zn ₂ Al-nisine 4°C/ZnAl-nisine 30°C	<u>2</u>	<u>2</u>
Mn ₂ Al-nisine 4°C/ MnAl-nisine 30°C	<u>1</u>	<u>0.2</u>
Ni ₂ Al-nisine 4°C/ NiAl-nisine 30°C	<u>0.004</u>	<u>1</u>

Tous les interactions entre 4°C /30°C sont donc significatives, quelques soit le temps de stockage. En effet, toutes les valeurs présentent une probabilité en-dessous de 10 %.

Discussions des résultats

Il apparaît que le stockage à 4°C (**figure 4.22**) n'a pas d'influence significative sur l'activité de la nisine, libre et adsorbée. Ces résultats sont cohérents avec des études précédentes, où la nisine a été adsorbée sur des surfaces de silice [47], et sur de l'argile cationique de type montmorillonite [48, 49].

La conservation à 30°C, induit une diminution significative de l'activité de la nisine libre : 41% après 3 jours, et 59% après 10 jours (**tableau 4.10**). Cette perte d'activité est aussi visible pour toutes les phases HDL-nisine qui ont une perte de 29%, 38%, 44%, et 54% après 3 jours, et de 36 %, 48%, 50%, et 52% après 10 jours, respectivement pour Mg₂Al-nisine , Zn₂Al-nisine, Mn₂Al-nisine et Ni₂Al-nisine (**Figure 2.22, ligne vert et Tableau 4.13**). Cette diminution d'activité est peut être due à une dégradation de la biomolécule. Ce résultat est

confirmé par le fait qu'un stockage de la nisine seule et adsorbée induit une perte totale d'activité antibactérienne à 60°C et à 30°C après 15 jours, quelle que soit la nature de la matrice HDL. Néanmoins, il pourra être noté que la perte d'activité liée au stockage à 30°C sur 10 jours est plus forte dans le cas de la nisine libre (40 %, tableau 4.11) que pour la nisine adsorbée sur la matrice Mg₂Al (30 %, **Tableau 4.10**).

Le matériau Ni₂Al-nisine stocké à 30°C sur 3 jours présente une perte d'activité de 48 % par rapport la nisine libre et de 49.7% sur 10 jours (**Tableau 4.10**). Dans ces conditions de stockage, ces interactions entre la nisine libre et le matériau NiAl-nisine sont significatives (**Figure 4.22, lignes marron et violette**). Par rapport aux matériaux MgAl-nisine et ZnAl-nisine, le matériau Ni Al-nisine présente respectivement une perte de 48% et 49 % sur 3 jours à 30°C (**Tableau 4.10 et Figure 4.22, ligne violette**), et 50% et 62 % sur 10 jours à 30°C (**Tableau 4.10 et Figure 4.22, lignes noir pointillée**). Cette perte est possiblement liée à la structure instable de la phase Ni₂Al.

Pour le matériau Mn₂Al-nisine stocké à 30° C sur 3 jours, on note une perte de 34% par rapport à la nisine libre (**Tableau 4.10 et Figure 4.22, ligne marron**) et de 26% par rapport aux matériaux Mg₂Al-nisine et Zn₂Al-nisine (**Tableau 4.10**). Cette perte peut être expliquée par le fait que la nisine est intercalée dans les matériaux Zn₂Al et Mg₂Al et immobilisée à la surface pour Mn₂Al.

Enfin, on observe que les deux matériaux Zn₂Al-nisine et Mn₂Al-nisine stockés à 30°C sur 10 jours présentent une perte respective de 34 % et 39 % par rapport à la nisine libre (**Tableau 4.10 et Figure 4.22, ligne rouge pointillée**) alors que le matériau Mg₂Al-nisine ne présente qu'une perte de 20 % (**Tableau 4.10**) et une corrélation d'interaction non significative avec la nisine libre. Ceci nous permet de conclure que le matériau Mg₂Al est le plus performant pour la conservation de la nisine à 30°C sur 10 jours.

IV. Conclusion

L'étude de l'immobilisation de la nisine dans différentes phases HDL Zn_2Al-Cl , Mg_2Al-Cl , Mn_2Al-Cl et Ni_2Al-Cl , a été réalisée. Ces matériaux ont été caractérisés par différentes techniques physico-chimiques (DRX, UV-vis, MEB, et MET) qui nous ont permis de contrôler la structure et la composition des matériaux afin d'identifier le mécanisme d'immobilisation. L'étude cinétique suit le pseudo deuxième ordre pour les matériaux HDL-nisine. Les isothermes suivent le modèle de Freundlich pour l'effet du rapport molaire et l'effet de la morphologie suit le modèle de Langmuir pour l'effet de l'anion et l'effet de la matrice. La DRX nous permet de conclure que l'immobilisation de la nisine dans les phases HDL a eu lieu dans l'espace interlamellaire pour certaines phases et par immobilisation sur la surface des cristallites HDL pour d'autres phases, tout dépend de la nature de la matrice, de la nature de l'anion intercalé, du rapport molaire et de la morphologie de la matrice hôte, ce qui entraîne une perte de cristallinité et un fort désordre structural. Des analyses MEB et TEM ont été mises en œuvre pour déterminer les tailles des cristallites. Le matériau Zn_2Al -nisine présente une capacité de libération prolongé jusqu'à trois fois plus que la nisine libre. Les phases HDL-nisine obtenus sont utilisées par la suite pour l'étude de l'activité antibactérienne en fonction de leurs conditions de stockage au cours du temps. La phase HDL Mg_2Al s'avère être meilleur support pour l'adsorption de la nisine à 30°C sur 10 jours avec une perte d'activité limitée (19 %) par rapport à la nisine libre.

Les études de libération de Zn -HDL-nisine montre une libération prolongée de la nisine seule sur 250 h. Pour finir, une étude sur les propriétés antibactériennes des matériaux a été menée ; ces propriétés ont été comparées à celles de la nisine seule. Cette étude souligne la pertinence du matériau Mg_2Al pour le stockage de la nisine ; en effet, la biomolécule est bien intercalée au sien du feuillet inter-lamellaire, ce qui lui permet de garder son activité à des températures supérieure à 4°C.

V. Références

1. Klaenhammer, T.R., *Bacteriocins of lactic acid bacteria*. Biochimie, 1988. **70**(3): p. 337-349.
2. Aymerich, M., et al., *Bacteriocin-producing lactobacilli in Spanish-style fermented sausages: characterization of bacteriocins*. Food Microbiology, 2000. **17**(1): p. 33-45.
3. Guerra, N.P., et al., *Antimicrobial activity of nisin adsorbed to surfaces commonly used in the food industry*. Journal of food protection, 2005. **68**(5): p. 1012-1019.
4. Zohri, M., et al., *Nisin-Loaded Chitosan/Alginate Nanoparticles: A Hopeful Hybrid Biopreservative*. Journal of Food Safety, 2013. **33**(1): p. 40-49.
5. Khaksar, R., et al., *Nisin-loaded alginate-high methoxy pectin microparticles: preparation and physicochemical characterisation*. International Journal of Food Science & Technology, 2014. **49**(9): p. 2076-2082.
6. Cleveland, J., et al., *Bacteriocins: safe, natural antimicrobials for food preservation*. International Journal of Food Microbiology, 2001. **71**(1): p. 1-20.
7. Khan, I. and D.-H. Oh, *Integration of nisin into nanoparticles for application in foods*. Innovative Food Science & Emerging Technologies, 2016. **34**: p. 376-384.
8. Arthur, T.D., V.L. Cavera, and M.L. Chikindas, *On bacteriocin delivery systems and potential applications*. Future Microbiology, 2014. **9**(2): p. 235-248.
9. Hurst, A., *Function of Nisin and Nisin-like Basic Proteins in the Growth Cycle of Streptococcus lactis*. Nature, 1967. **214**: p. 1232.
10. Bernela, M., et al., *Synthesis, characterization of nisin loaded alginate–chitosan–pluronic composite nanoparticles and evaluation against microbes*. LWT - Food Science and Technology, 2014. **59**(2, Part 1): p. 1093-1099.
11. Thomas, L.V. and D.-B. Joss, *Nisin in Antimicrobial in food*, M. Davidson, J.N. Sofos, and A.L. Branen, Editors. 2005, CRC Press. p. 237-274.
12. Balciunas, E.M., et al., *Novel biotechnological applications of bacteriocins: A review*. Food Control, 2013. **32**(1): p. 134-142.
13. Rose, N.L., et al., *Inactivation of Nisin by Glutathione in Fresh Meat*. Journal of Food Science, 1999. **64**(5): p. 759-762.
14. Aasen, I.M., et al., *Interactions of the bacteriocins sakacin P and nisin with food constituents*. International Journal of Food Microbiology, 2003. **87**(1): p. 35-43.

15. Bhatti, M., A. Veeramachaneni, and L.A. Shelef, *Factors affecting the antilisterial effects of nisin in milk*. International Journal of Food Microbiology, 2004. **97**(2): p. 215-219.
16. Chollet, E., et al., *Nisin preliminary study as a potential preservative for sliced ripened cheese: NaCl, fat and enzymes influence on nisin concentration and its antimicrobial activity*. Food Control, 2008. **19**(10): p. 982-989.
17. Krivorotova, T., et al., *Nisin-loaded pectin nanoparticles for food preservation*. Food Hydrocolloids, 2016. **54**: p. 49-56.
18. Yang, J.-H., et al., *Drug-clay nanohybrids as sustained delivery systems*. Applied Clay Science, 2016. **130**: p. 20-32.
19. Huang, Q.-J., et al., *Loading kinetics of 5-fluorouracil onto hydrotalcite and in vitro drug delivery*. Journal of the Taiwan Institute of Chemical Engineers, 2016. **60**: p. 525-531.
20. Ghotbi, M.Y., et al., *LDH-intercalated d-gluconate: Generation of a new food additive-inorganic nanohybrid compound*. Journal of Physics and Chemistry of Solids, 2009. **70**(6): p. 948-954.
21. Wang, Q., et al., *Polypropylene/Mg₃Al-tartrazine LDH nanocomposites with enhanced thermal stability, UV absorption, and rheological properties*. RSC ADVANCES, 2013. **3**(48): p. 26017-26024.
22. Cavani, F., F. Trifirò, and A. Vaccari, *Hydrotalcite-type anionic clays: Preparation, properties and applications*. Catalysis Today, 1991. **11**(2): p. 173-301.
23. Braterman, P.S., Z.P. Xu, and F. Yarberrry, *Layered Double Hydroxides (LDHs)*. ChemInform, 2005. **36**(16).
24. Djebbi, M.A., et al., *Layered double hydroxide materials coated carbon electrode: New challenge to future electrochemical power devices*. Applied Surface Science, 2016. **386**: p. 352-363.
25. Huq, T., et al., *Microencapsulation of nisin in alginate-cellulose nanocrystal (CNC) microbeads for prolonged efficacy against Listeria monocytogenes*. Cellulose, 2014. **21**(6): p. 4309-4321.
26. Narsaiah, K., et al., *Optimizing microencapsulation of nisin with sodium alginate and guar gum*. Journal of Food Science and Technology, 2014. **51**(12): p. 4054-4059.
27. Hosseini, S.M., et al., *Preparation and characterization of alginate and alginate-resistant starch microparticles containing nisin*. Carbohydrate Polymers, 2014. **103**: p. 573-580.

28. Kaur, H., et al., *Carboxymethyl tamarind kernel polysaccharide nanoparticles for ophthalmic drug delivery*. International Journal of Biological Macromolecules, 2012. **50**(3): p. 833-839.
29. Ho, Y.S. and G. McKay, *Pseudo-second order model for sorption processes*. Process Biochemistry, 1999. **34**(5): p. 451-465.
30. Inacio, J., et al., *Adsorption of MCPA pesticide by MgAl-layered double hydroxides*. Applied Clay Science, 2001. **18**(5): p. 255-264.
31. Peng, F., T. Luo, and Y. Yuan, *Controllable synthesis of Mg-Fe layered double hydroxide nanoplates with specific Mg/Fe ratios and their effect on adsorption of As(v) from water*. New Journal of Chemistry, 2014. **38**(9): p. 4427-4433.
32. Ling, F., et al., *A novel CoFe layered double hydroxides adsorbent: High adsorption amount for methyl orange dye and fast removal of Cr(VI)*. Microporous and Mesoporous Materials, 2016. **234**: p. 230-238.
33. Giles, C.H., D. Smith, and A. Huitson, *A general treatment and classification of the solute adsorption isotherm. I. Theoretical*. Journal of Colloid and Interface Science, 1974. **47**(3): p. 755-765.
34. Miyata, S., *Anion-exchange properties of hydrotalcite-like compounds*. Clays and Clay Minerals, 1983. **31**(4): p. 305-311.
35. Djebbi, M.A., et al., *Preparation and optimization of a drug delivery system based on berberine chloride-immobilized MgAl hydrotalcite*. International Journal of Pharmaceutics, 2016. **506**(1): p. 438-448.
36. Zohri, M., et al., *A Comparative Study Between the Antibacterial Effect of Nisin and Nisin-Loaded Chitosan/Alginate Nanoparticles on the Growth of Staphylococcus aureus in Raw and Pasteurized Milk Samples*. Probiotics and Antimicrobial Proteins, 2010. **2**(4): p. 258-266.
37. Ritu, B., R.R. Gupta, and H.V. Patel, *Formulation and characterization of sustained release matrix tablet of metformin hydrochloride*. International Journal of Pharma Recent Research, 2009. **1**(1): p. 49-53.
38. Chandira, M., et al., *Formulation and evaluation of extended release tablets containing metformin HCl*. International Journal of chemtech research, 2010. **2**(2): p. 1320-1329.
39. Everaert, M., et al., *Phosphate-Exchanged Mg–Al Layered Double Hydroxides: A New Slow Release Phosphate Fertilizer*. ACS Sustainable Chemistry & Engineering, 2016. **4**(8): p. 4280-4287.

40. Alibakhshi, E., E. Ghasemi, and M. Mahdavian, *Optimization of potassium zinc phosphate anticorrosion pigment by Taguchi experimental design*. Progress in Organic Coatings, 2013. **76**(1): p. 224-230.
41. Barahuie, F., et al., *Preparation and controlled-release studies of a protocatechuic acid-magnesium/aluminum-layered double hydroxide nanocomposite*. International journal of nanomedicine, 2013. **8**: p. 1975.
42. Zhang, H., et al., *Nanostructural drug-inorganic clay composites: structure, thermal property and in vitro release of captopril-intercalated Mg–Al-layered double hydroxides*. Journal of Solid State Chemistry, 2006. **179**(6): p. 1792-1801.
43. Del Arco, M., et al., *Release studies of different NSAIDs encapsulated in Mg, Al, Fe-hydrotalcites*. Applied Clay Science, 2009. **42**(3-4): p. 538-544.
44. Gao, X., et al., *In vitro controlled release of vitamin C from Ca/Al layered double hydroxide drug delivery system*. Materials Science and Engineering: C, 2014. **39**: p. 56-60.
45. Naciri Bennani, M., et al., *Synthèse et caractérisation d'hydrotalcites Mg-Al. Application à l'édolisation de l'acétone*. J. Chim. Phys., 1999. **96**(3): p. 498-509.
46. Kaneyoshi, M. and W. Jones, *Formation of Mg-Al layered double hydroxides intercalated with nitrilotriacetate anions*. Journal of Materials Chemistry, 1999. **9**(3): p. 805-811.
47. Bower, C., J. McGuire, and M. Daeschel, *Influences on the antimicrobial activity of surface-adsorbed nisin*. Journal of Industrial Microbiology, 1995. **15**(3): p. 227-233.
48. Meira, S.M.M., A.I. Jardim, and A. Brandelli, *Adsorption of nisin and pediocin on nanoclays*. Food Chemistry, 2015. **188**: p. 161-169.
49. Ibarguren, C., et al., *Adsorption of nisin on raw montmorillonite*. Applied Clay Science, 2014. **90**: p. 88-95.

*Chapitre 5 : Préparation et
caractérisation des phases
HDL — lysozyme*

I. Introduction

Le lysozyme est une enzyme antibactérienne dans ce chapitre nous nous sommes intéressés à son immobilisation dans différentes matrices HDL M^{2+} Al-Cl ($M^{2+} = \text{Zn, Mg, Ni et Mn}$) par échange anionique. Le lysozyme est une protéine dure qui s'adsorbe préférentiellement quand sa charge est opposée à celle de la surface [1]. L'objectif de cette étude est d'établir une corrélation entre la localisation de lysozyme et son activité antibactérienne. Dans cette étude nous avons étudié par fluorescence résolue au cours du temps la relation structure / propriétés antibactériennes de la protéine. La localisation du lysozyme a été examinée à l'aide de la DRX. Ensuite une étude de l'activité antibactérienne a été effectuée en utilisant la souche *S.epidermidis*.

Les résultats présentés dans ce chapitre ont fait l'objet d'un article scientifique : « **Structure and antibacterial activity relationships of native and amyloid fibril lysozyme loaded on layered double hydroxide.** » Colloids and Surfaces B: Biointerfaces 157 (2017) 10–17. Et d'une partie complémentaire intitulé « **Etude de l'adsorption de la nisine dans différentes phases HDL : évaluation de l'activité antibactérienne** ».

II. Article scientifique: Structure and antibacterial activity relationships of native and amyloid fibril lysozyme loaded on layered double hydroxide

Zaineb Bouaziz^{1,2}, Laurence Soussan¹, Jean-Marc Janot¹, Mathilde Lepoitevin¹, Mikhael Bechelany¹,
Mohamed Amine Djebbi^{2,3,4}, Abdesslem Ben Haj Amara², Sebastien Balme¹

Colloids and Surfaces B: biointerfaces 2017 DOI (157), 10-17.

Abstract:

Lysozyme from hen egg white is composed by a unique linear chain of 129 amino acids. It is known to inhibit Gram positive bacteria and to form amyloid fibrils at low pH, under 75° C. This work investigates the effect of the fibrillation and/or adsorption onto a layered double hydroxide material on the antibacterial properties of lysozyme. The kinetics of adsorption follows a behavior of pseudo second order model. The X-ray diffraction and the Fourier Transform Infrared Spectroscopy highlight that adsorption occurs only on the external surface of the material. Interestingly, the amyloid fibrils of lysozyme retain their antibacterial properties when they are adsorbed on the layered double hydroxide; even if their activity is lowered, the active site of the enzyme is not fully denatured and is still accessible. This is confirmed by the study of the tryptophan using time-resolved fluorescence spectroscopy.

3

¹ Institut Européen des Membranes, UMR5635, UM, ENSM, CNRS,

² Laboratoire de Physique des Matériaux lamellaires et Nanomatériaux hybrides,

³ Institut des Sciences Analytiques UMR CNRS 5280, Université Claude Bernard-Lyon 1,

⁴ Institut National de Recherche en Sciences et Technologies pour l'Environnement et l'Agriculture, Université Claude Bernard-Lyon 1,

1. Introduction

Hen egg white lysozyme is an enzyme which catalyzes the cleavage of the glycosidic linkage β (1-4) between N-acetylglucosamine and N-acetylmuramic acid in peptidoglycan. It is most widely identified as an antibiotic against Gram positive bacteria. The structure of lysozyme is well-known. It is composed of one polypeptide chain containing 129 amino-acids. In its native state, it is formed of α -helices which constitute the α -domain and three β -sheets which constitute the β -domain.[3] Usually, the biological activity of an enzyme is directly linked to its tridimensional structure and the accessibility of its active site. Whatever the protein, its adsorption on a material is likely to induce a loss of its activity. Because lysozyme has a high internal stability due to four disulphide bonds between cysteine 6-127, 30-115, 64-80 and 76-94, it is considered as a hard protein. This means that the adsorption of lysozyme on charged surfaces does not modify its structural conformation.[4, 5] In its condition, it keeps its antibacterial activity if the active site is still accessible. Thus, lysozyme immobilized onto mesoporous materials [6] such as clay [7], or onto silica or titania nanoparticles [8] can be used as anti-bacterial nanocomposites.[9] Lysozyme is used as a model to study protein adsorption on the material and also to investigate the formation and the structure of amyloid fibrils. The structure of the protein cannot be reduced to a native and an unfolded state. Proteins can adopt different conformations corresponding to low energy states.[10] By intramolecular contact, the protein can take different folding intermediates or partially folded states. By intermolecular contact, the protein can self-assemble to form oligomers, aggregates or amyloid fibrils.[11] Lysozyme forms amyloid fibrils under denaturing conditions in organic solvents such as ethanol [12], or basic or acidic pH at high temperature [13]. Such amyloids are at the origin of systemic amyloidosis.[14]

Recently, amyloid fibrils were used to design new generation of hybrid nanocomposites.[15] They were added to carbon nanotubes or graphene to obtain biodegradable nanocomposites.[16, 17] Combined with graphene oxide, amyloid obtained from β -lactoglobuline permits to design membrane able to filter efficiently heavy ion.[18] The exceptional mechanical properties of amyloid [19, 20] make them good candidates to replace gelatin in order to design bone biomimetic composites.[21] In this emerging topic, the layered materials have never been considered. Layered double hydroxides (LDH), also known as anionic clays or hydrotalcites (HTs), are synthetic solids with positively charged brucite-like layers of mixed metal hydroxides separated by interlayered hydrated anions, defined by the general formula: $[M^{II}_{1-x}M^{III}_x(OH)_2]^{x+}[(A^{n-})_{x/n}\cdot yH_2O]^x$ (abbreviated as $M^{2+}M^{3+}-A$, where M^{2+} is a bivalent cation, M^{3+} is a trivalent cation, A is an interlayer anion, x represents the molar ratio $[M^{2+}/(M^{2+}+M^{3+})]$ and y is the number of water molecules located in the interlayer region together with anions). They are easily synthesized, not toxic, biocompatible and inexpensive. They have been used to make bioinorganic hybrid nanosheets for drug delivery, or biosensors.[22-25]

In the present investigation, we have studied how the immobilization of lysozyme on LDH materials in both its native and its amyloid fibril state affects the antibacterial activity. To do this, lysozyme and amyloid were adsorbed on a nitrate LDH material ($ZnAl-NO_3$). The presence of the proteins and their localization were investigated by Fourier transform infrared spectroscopy (FTIR) and X-ray diffraction (XRD) methods. The structural modification of the active site was investigated by time resolved fluorescence spectroscopy. The antibacterial activity of the lysozyme and the amyloid against *Staphylococcus epidermidis* were then assessed as well as the impact of their adsorption on LDH. Bactericidal performance is discussed on the basis of the structural modifications of the protein.

2. Material and methods

2.1. Synthesis of nitrate layered double hydroxides LDH

Synthesis of layered double hydroxides was performed by co-precipitation following the protocol of Yang *et al.* [26] Typically, 50 ml of a solution containing 0.66 M $\text{Zn}(\text{NO}_3)_2$ and 0.33 M $\text{Al}(\text{NO}_3)_3$ was added to 60 ml of NaOH solution of 2 M. The addition was performed into a reactor at a constant flow of 0.12 mL min^{-1} by a syringe-pump system for 7 h under magnetic stirring at 400 rpm. The pH of the reaction mixture was maintained at 7.5 ± 0.3 and the mixture was carried out under nitrogen gas flow to prevent CO_2 dissolution from the air. After the end of the addition, the LDH suspension was kept during 24 h at room temperature to obtain small-sized particles. [27] The resulting LDH product was centrifuged at 8000 g for 15 min, washed 6 times with deionized and CO_2 -free water. The LDH was stored as a suspension in PBS of pH 7.4 (P4417, Sigma) at 0.5 mg mL^{-1} to prevent aggregation of the crystals.

2.2. Preparation of amyloid (AMY) fibrils

The amyloid was obtained following the method described by Hill *et al.*[28]. Hen egg white Lysozyme (62971, Fluka) solutions in water (34 mg mL^{-1}) were heated at 45°C , centrifuged at 16000 g for 5 min, and filtered consecutively through a 450 nm pore-size syringe filter to remove any preformed clusters. Lysozyme concentrations in solution were determined from ultraviolet absorption measured at $\lambda = 280 \text{ nm}$ ($\epsilon = 36000 \text{ L mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$). Then, the solution was mixed with a NaCl solution of 150 mM at $\text{pH} = 2$ to reach a protein concentration of 17 mg mL^{-1} . The pH of the mixture was readjusted to 2.0 using a HCl solution of 1 M. Lysozymes were incubated for 24 h at 70°C to obtain an amyloid solution that was stored at -20°C to stop the fibrillation.

2.3. Preparation of LYS-LDH and AMY-LDH hybrid nanocomposite

The hydride nanocomposite was obtained as follows: 50 μl of lysozyme (LYS) or amyloid (AMY) at a concentration of 17 mg mL^{-1} (in NaCl solution of 150 mM, pH = 2) was added to 10 ml of PBS of pH = 7.4 suspension containing 5 mg of LDH. After the loading of protein or amyloid, the hybrid nanocomposites were collected by centrifugation at 16000 g for 15 min, washed twice with water, filtered under vacuum and finally dried under an air flow. The interfacial concentration (Γ_t) was measured by the methods of the supernatant depletion (Eq 5.1). Typically, it is deduced from the difference between initial mass concentration of lysozyme or amyloid in solution (C_0), and the one after the loading process (C_t) obtained by absorbance at 280 nm.

$$\Gamma_t = \frac{V(C_0 - C_t)}{m} \quad (\text{Eq 5.1})$$

where V is the total volume of the protein solution and m the mass of LDH. Each experiment was repeated 3 times.

2.4. Antimicrobial activity

2.4.1. Bacterial strain and culture medium

Non-pathogenic *Staphylococcus epidermidis* (CIP53.124, from Pasteur Institute Laboratory, Lyon, France) was chosen as a surrogate microorganism for bacterial contamination. Lysogeny broth (LB) Miller culture medium (ref. n°1214662, from Fischer Scientific, France) was used for both broth bacterial growth and hard solid culture medium for bacterial counting.

2.4.2. Preparation of the bacterial suspension used for antibacterial tests

For each experiment, a new bacterial suspension was prepared from a frozen *S. epidermidis* aliquot stored at -20°C . The aliquot was first rehydrated in LB medium for 3 h at 37°C under

constant stirring (110 rpm). Then, the rehydrated aliquot was inoculated into fresh LB medium (5% v/v) and incubated at 37 °C under constant stirring (110 rpm) until the bacteria reached the stationary growth phase. Afterwards, the cultivated bacteria were separated from the LB medium by centrifugation (20 minutes at 4°C and 4,500 rpm) to remove nutrients and thus to avoid bacterial development in the reactor. After centrifugation, the recovered bacterial pellets were suspended in spring water (Cristaline Sainte Cécile, France: $[\text{Ca}^{2+}] = 39 \text{ mg L}^{-1}$, $[\text{Mg}^{2+}] = 25 \text{ mg L}^{-1}$, $[\text{Na}^+] = 19 \text{ mg L}^{-1}$, $[\text{K}^+] = 1.5 \text{ mg L}^{-1}$, $[\text{F}^-] < 0.3 \text{ mg L}^{-1}$, $[\text{HCO}_3^-] = 290 \text{ mg L}^{-1}$, $[\text{SO}_4^{2-}] = 5 \text{ mg L}^{-1}$, $[\text{Cl}^-] = 4 \text{ mg L}^{-1}$, $[\text{NO}_3^-] < 2 \text{ mg L}^{-1}$) and the absorbance of the suspensions was measured at 600 nm to determine the bacterial concentration according to a calibration curve obtained previously at the laboratory. The bacterial cells were finally diluted in spring water to obtain a bacterial suspension where the cell concentration was about 10^4 CFU mL^{-1} . The obtained bacterial suspension was instantly used for the antimicrobial tests.

2.4.3. Counting of cultivable bacteria

Bacteria were counted by the conventional plaque assay method. Each sample was diluted by serial 10-folds steps in spring water. Each dilution was spread onto LB nutrient agar plates and plates were incubated at 37°C for 24 h to allow bacterial colonies to be counted. Knowing that each colony stemmed from one initial bacterium, the bacterial concentrations in the samples were calculated as the mean number of counted colonies divided by the inoculated volume on the LB agar, taking into account the corresponding dilution factor. The quantification limit was 10 CFU mL^{-1} .

2.4.4. Preparation of enzyme solutions and suspensions

For antibacterial tests, free enzyme solutions of lysozyme (LYS) and amyloid (AMY) were prepared, as well as adsorbed enzyme suspensions of LDH-Lysozyme (LDH-LYS) and LDH-Amyloid (LDH-AMY). All these solutions and suspensions were freshly prepared in spring

water, from a fresh enzyme stock solution, at the same enzyme concentration ($27.8 \pm 0.2 \mu\text{mol L}^{-1}$ corresponding to 456 mg L^{-1} of lysozyme equivalent). Enzyme stock solutions were prepared at $1.33 \pm 0.01 \text{ mM}$ in deionized water. For suspension preparation, $100 \mu\text{L}$ of enzyme stock solution was mixed with 20 mL of PBS and 10 mg of LDH for 10 min under constant stirring (150 rpm) at room temperature. According to the section “2.3 Preparation of LDH-LYS and LDH-AMY hybrid nanocomposites”, the mixture was then centrifuged at 16000 g for 15 min . Thereafter, the supernatant absorbance was measured at 280 nm to determine the quantity of adsorbed enzymes and the pellet was diluted in spring water to reach the concentration fixed for the tests (*i.e.* $27.8 \pm 0.2 \mu\text{mol L}^{-1}$).

2.4.5. Assessment of antibacterial properties of free lysozyme (LYS), free amyloid (AMY), LDH-Lysozyme (LDH-LYS) and LDH-Amyloid (LDH-AMY)

Bactericidal tests were carried out in a batch mode, in a glass Erlenmeyer flask (25 mL). Reactions were performed in sterile conditions, at $37 \pm 1^\circ\text{C}$ or $25 \pm 1^\circ\text{C}$, and under constant stirring (110 rpm) on a rotary shaker. For each test, 9 mL of bacterial suspension was mixed with 1 mL of enzyme solution or suspension, which resulted in a final enzyme concentration of $2.78 \mu\text{mol L}^{-1}$ (*i.e.* 45.6 mg L^{-1} of lysozyme equivalent). Reactors were incubated for 24 h . The initial bacterial concentration was precisely determined by the counting method and the mean initial bacterial concentration was $3.6 \pm 0.3 \cdot 10^4 \text{ CFU mL}^{-1}$. At the end of the reaction, a sampling was carried out to measure the concentration of remaining cultivable bacteria; the evolution of the bacterial concentration was correlated to bactericidal performances of the tested materials. The bacterial removal (%) was defined as the ratio between the bacterial concentration decrease and the initial bacterial concentration; where the bacterial concentration decrease is given by the difference between the initial concentration and the

concentration at 24 h. Two control tests were simultaneously achieved under the same operating conditions: bacteria without any material and bacteria with unmodified LDH only.

2.5. Characterizations

X-ray diffractograms were recorded by a conventional θ - θ Bragg-Brentano configuration (Ni-filtered $\text{CuK}_{\alpha 1,2} = 1.5418 \text{ \AA}$) by using a model D8 Advance Bruker-AXS Powder X-ray diffractometer coupled with a linear Vantec-1 detector. The diffraction patterns were performed between 2 and 70° (2θ) with angular and time steps of 0.0328° and 1 s respectively. A beam stop and a slit, of variable divergence, were used. Finally, the active area of the detector was limited as much as possible in order to reduce the background scattering at low angle.

Fourier transform infrared spectra (FTIR) in ATR mode were recorded using a NEXUS FTIR (Thermo Scientific) spectrophotometer in the range of 4000 – 400 cm^{-1} . The spectra were recorded during 64 scan. The UV absorbance spectra were recorded on JASCO V-570 UV-Vis spectrophotometer at 1 nm s^{-1} scanning rate.

The diffusion coefficients of protein and amyloid were measured by Photon Cross-Correlation Spectroscopy (PCCS) (Nanophox, Sympatec, France). From the raw data, the diffusion coefficients were obtained using the Quickfit software.[29] A Levenberg-Marquardt nonlinear fit without constraint box was used.

Atomic force microscopy (AFM) measurements were carried out on a commercial optical deflection microscope (Dimension 3100 Veeco Instruments with a NanoscopeIIIa, Digital Instrument) operating in ambient conditions. The phase image gives an estimate of local hardness and thus of the surface organization. Samples were prepared as follows: a diluted solution of amyloid (1000x in water) was dialyzed (Cellu-Sep, MWCO 4000-6000) against

water during 2 hours in order to increase the pH from 2 to 7 and remove the salt. A drop of solution was then deposited onto mica freshly cleaved and dried.

Time-resolved fluorescence data were obtained by the time-correlated single-photon counting technique.[30, 31] The excitation wavelength was achieved using a SuperK EXTREME laser (NKT Photonics, model EXR-15) as a continuum pulsed source combined with SuperK EXTEND-UV supercontinuum (NKT Photonics, model DUV); the wavelength was selected by coupling to a monochromator (Jobin–Yvon H10). The repetition rate was set to 38.9 MHz; the excitation pulse duration on this device is around 6 ps (full-width-at-half-maximum, FWHM). The emission of fluorescence is detected, after passing through a polarizer oriented either parallel, perpendicular or at the magic angle (54.73°) to the polarization of the excitation, through a double monochromator Jobin–Yvon DH10 on a hybrid PMT detector HPM-100-40 (Becker & Hickl). The instrumental response function of the equipment was measured by using a dilute suspension of polystyrene nanospheres in water (70 nm of diameter) as a scattering solution; it was typically about 130-160 ps FWHM. Decays were collected at a maximum counting rate of 15 kHz into 4096 channels using an acquisition card SPC-730 (Becker & Hickl). This limiting count rate was achieved by dilution in water of the sample and after sedimentation of the suspension in order to minimize as much as possible the scattering of the particles. The time per channel was set around 6 ps ch^{-1} in order to fit a full decay in the experimental time window. All decays were collected so as to have at least $1.5 \cdot 10^6$ counts in total. Decay analysis was performed using a Levenberg–Marquardt algorithm. For the analysis, the fluorescence decay law at the magic angle $I_M(t)$ was assumed as a sum of exponentials. Fluorescence lifetimes were calculated from data collected at magic angle by iterative adjustment after convolution of a pump profile (scattered light) with a sum of exponentials. We assumed a Poisson distribution of counts in the calculation of the χ^2 criterion; residual profiles and autocorrelation function as well as Durbin-Watson and

skewness factor were used in order to estimate the quality of the adjustment. The number of exponentials used for the fit was increased until all the statistical criteria were improved. All details about calculation of both lifetime and correlation time are given elsewhere.[30]

3. Results and discussion

3.1. Lysozyme and amyloid characterizations

Before loading them onto LDH material, the produced amyloids were characterized by Photon Cross-Correlation Spectroscopy (PCCS) and atomic force microscopy (AFM). A prior problem was the solubility of the lysozyme amyloid fibrils. Indeed, long fibrils are soluble at acidic pH (around 2) which is not compatible with LDH stability. The amyloid fibrils were obtained after a short incubation period (24 h); the fibrillation process was controlled by diffusion light scattering (**Figure 5.1a**). The diffusion constant of the lysozyme monomer in PBS solution is estimated to $128 \mu\text{m}^2 \text{s}^{-1}$. After 24 hours, a shift of the correlation function to longer time was observed. The fit reveals three slow diffusion coefficients (0.46, 3.00 and $18.38 \mu\text{m}^2 \text{s}^{-1}$). It is difficult to claim that these diffusion coefficients correspond to three distinct populations. However, these results suggest that the protein aggregation has happened. The structure of the expected fibrils was characterized by AFM (**Figure 5.1b**). Their diameters are around 6 nm which is in good agreement with the result previously reported,[32] and their length distribution extends from 40 to ~ 200 nm (**Figure 5.1c**). In addition, we also observed some protein aggregates which can be reasonably assigned to the shorter diffusion coefficients.

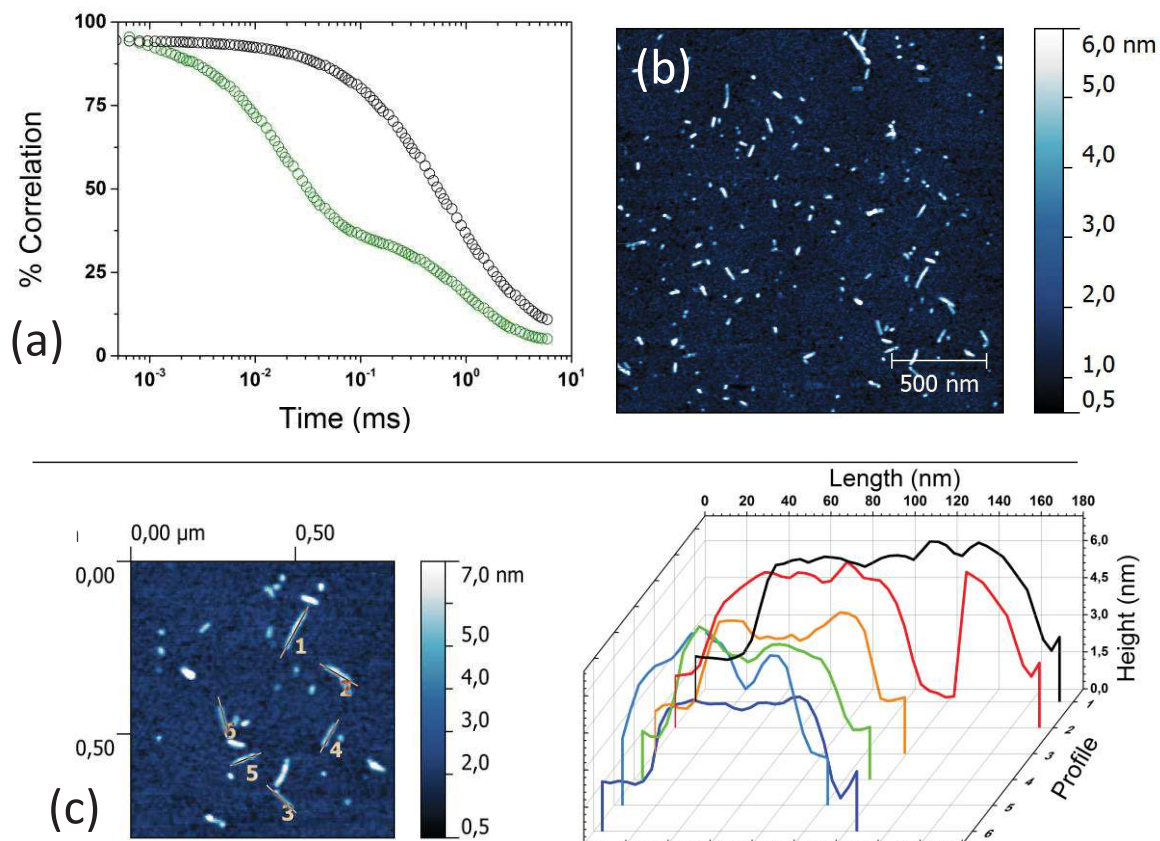


Figure 5.1: Lysozyme and amyloid characterizations: (a) Autocorrelation function of lysozyme (green) and amyloid (black) obtained by diffusion light scattering, (b) AFM characterization of amyloids and (c) Zoom and profile of amyloid fibrils.

3.2. Lysozyme and amyloid adsorption on LDH

The lysozyme (LYS) and amyloid (AMY) adsorptions onto Zn_2Al-NO_3 LDH were performed at room temperature in PBS (pH = 7). Figure 5.2 reports the adsorption kinetics for experiments with initial concentrations of lysozyme (or amyloid) and LDH of respectively $C_0 = 0.2 \text{ mg mL}^{-1}$ and $C_{LDH} = 1 \text{ mg mL}^{-1}$. A similar behavior is observed for native lysozyme and lysozyme amyloid. The equilibrium state seems to be reached after 180 min. Usually the adsorption of polypeptides or proteins on layered material follows a kinetic of pseudo-first (Eq 5.2) or pseudo-second order (Eq 5.3).

$$\log(\Gamma_e - \Gamma_t) = \log\Gamma_e - \left(\frac{k_1}{2.303}\right)t \quad (\text{Eq.2})$$

$$\frac{t}{\Gamma_t} = \left(\frac{1}{k_2\Gamma_e^2}\right) + \left(\frac{1}{\Gamma_e}\right)t \quad (\text{Eq.3})$$

Where Γ_e (mg mg^{-1}) and Γ_t (mg mg^{-1}) are the interfacial concentrations of protein respectively at equilibrium and at a time t respectively and k_1 and k_2 are the adsorption constants. According to the correlation coefficient (R^2) (**Table 5.1**), the pseudo-second-order kinetic is more appropriate to describe both native and amyloid fibril lysozyme adsorption. This result suggests that the adsorption process is not governed by ion exchange.[33] At $\text{pH} = 7$, the lysozyme exhibits a global positive charge as LDH. In such conditions, it is unlikely that the protein/material interactions result from a simple electrostatic attraction. Thus, the adsorption process could be due to the interaction of van der Waals between hydrophobic amino acids located at the surface of the protein and the material. The kinetic constant k_2 is higher for amyloid than for lysozyme. This can be interpreted by the modification of the protein structure which occurred during the heating. Indeed, we have worked at a constant concentration of protein monomer. For native lysozyme, proteins are loaded onto the material one by one. For fibrils and aggregates, several proteins are loaded at the same time, explaining an apparent increase of the kinetic constant.

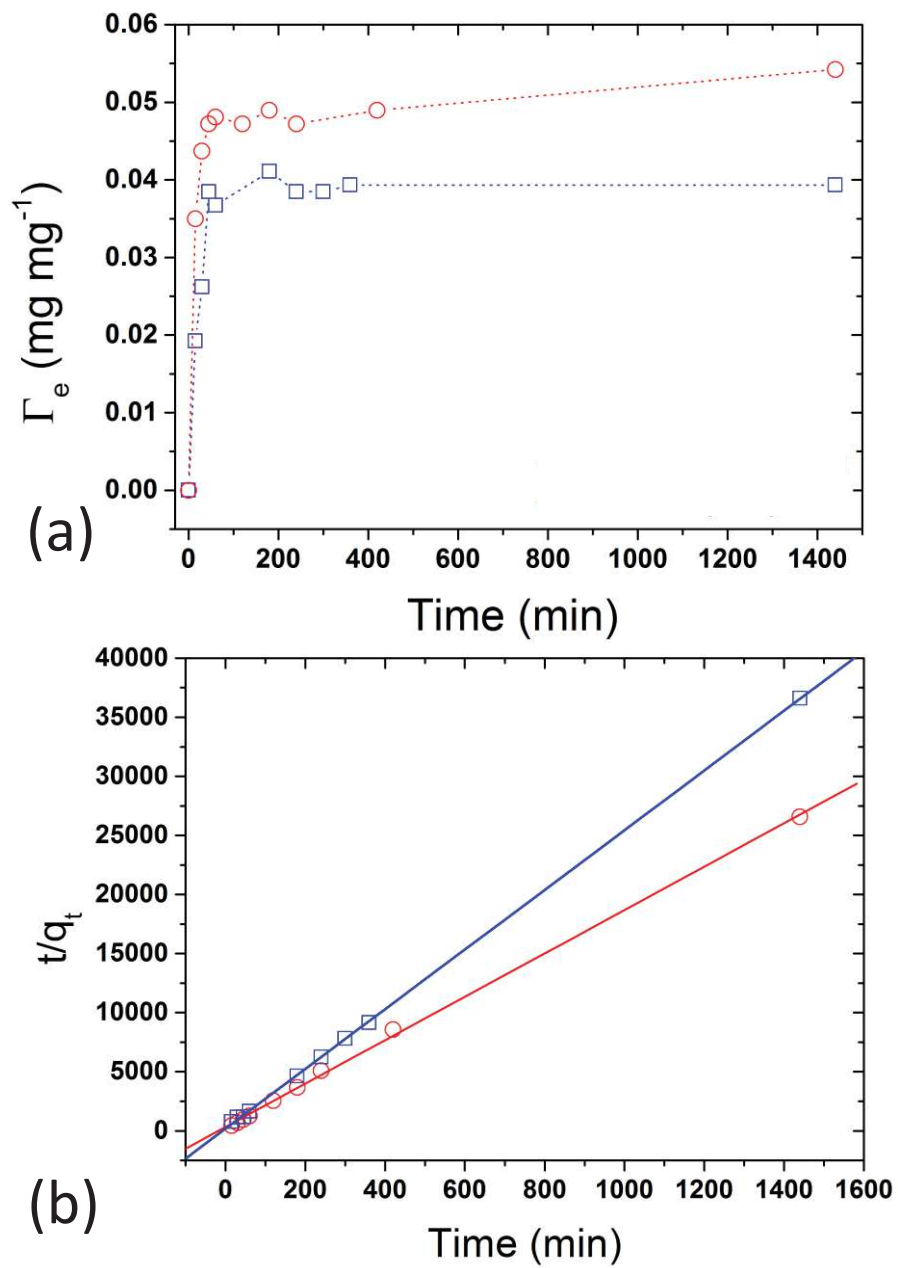


Figure 5.2: (a) Kinetic studies of the adsorption of LYS (red circle) and AMY (blue square) on ZnAl-NO₃ LDH at 25°C and (b) Pseudo-second-order plot of LYS (red circle) and AMY (blue square) adsorption on LDH.

Table 5.1: Kinetic parameters of LYS and AMY adsorptions on LDH material.

LDH	Γ_e (exp) (mg mg ⁻¹)	Pseudo-first-order			Pseudo-second- order		
		Γ_e (mg mg ⁻¹)	k_1 (min ⁻¹) 1)	R ²	Γ_e (mg mg ⁻¹)	k_2 (min ⁻¹)	R ²
Zn₂Al-NO₃-LYS	0.055	6.95	0.00136	0.974	0.054	1.05	0.999
Zn₂Al-NO₃-AMY	0.038	5.47	0.00073	0.844	0.03	5.8955	0.9999

We have shown that proteins are loaded on LDH. We focus now on their location on the material. Before protein adsorption, the (003) reflection is at the position 2 theta angle of 11.5° corresponding to the interlayer space 0.768 nm (**Figure 5.3a**). After loading of lysozyme or amyloid, the X-ray diffraction patterns for the LDH did not display any particular differences since the shift of (003) band until 2 theta angle of 12° which corresponds to the interlayer space of 0.736 nm is not relevant.

This clearly indicates that proteins or amyloids are not located in the interlayer space but that the adsorption only occurs on the external surface of the LDH grains. This result is in good agreement with the kinetics. It confirms that the adsorption process is not driven by ion exchange. Actually, the LDH is characterized by a positive charged surface and a high anionic affinity. Since the protein is globally positively charged, the electrostatic interactions are not favored compared to the van der Waals ones. The location of the lysozymes and amyloids onto the grain surface is of particular interest because we want to maintain their enzymatic sites available and keep the antibacterial activity of the proteins.

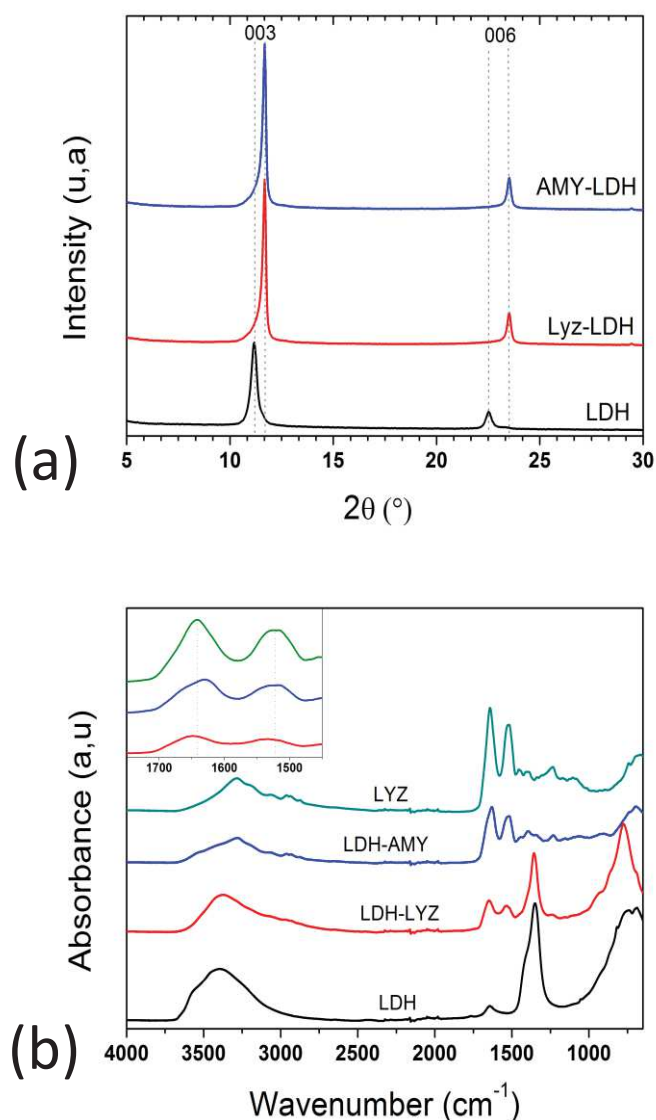


Figure 5.3: (a) X-ray diffraction patterns for LDH before (black) and after lysozyme (Red) and amyloid loading (blue) and (b) FTIR spectra of lysozyme (green), LDH before (black), and after lysozyme (blue) and amyloid (red) loading.

FTIR was performed to confirm proteins and amyloids loading onto the material (**Figure 5.3b**). The spectrum of LDH shows the characteristic lattice vibration bands between 900 cm^{-1} and 420 cm^{-1} . The wide absorption band at 3400 cm^{-1} is assigned to the OH stretching of hydroxyl group and water molecules located in the interlayer space of LDH. The FTIR spectrum of lysozyme exhibits two bands around 1600 cm^{-1} and 1525 cm^{-1} which are characteristic of carbonyl vibration modes in amide bands I and II respectively. The positions

of these bands are a sensitive indicator of conformational changes in the protein secondary structure. Both amide I and amide II peaks can also be clearly seen in LDH-AMY and LDH-LYS samples indicating the presence of the proteins on the hybrid material. Besides, these peaks are not shifted compared to the lysozyme, which indicates that the secondary structure of the proteins seem to be not modified after adsorption process. This result can be explained by the high internal energy of the lysozyme which confers its hard protein character. In addition, we do not observe a shift of these bands in the case of the amyloids which could be inconsistent with the DLS and AFM analysis. Indeed, both techniques have clearly shown the presence of aggregates and small fibrils.

3.3. Time resolved fluorescence

To go further in the structural analysis of the lysozyme and the amyloid, the photophysical properties of all samples have been studied by time resolved fluorescence. The lysozyme sequence contains six tryptophan residues: (i) Trp62, Trp63 and Trp108 located in the enzymatic site, (ii) Trp28 located in the β -sheet zone and (iii) Trp111 and Trp123 located in α -helix zone. Previous studies show that the fluorescence emissions of Trp63 and Trp123 are quenched due to their proximity with the disulfide bonds.[34-36] At 345 nm, the contributions of Trp62 and Trp108 represent 92 % of the total fluorescence emission of the protein. Since their photophysical properties are directly related to their environment, they can be considered as relevant local probes to characterize structural modification and/or interactions of the enzymatic site with the material.[4]

The fluorescence decay and anisotropy function of a typical experiment are shown in Figure 5.4. The results are reported on **Table 5.2**. In buffer solution, four components are required to fit the fluorescence decay with a corresponding average lifetime of 1.98 ns. The short one around $\tau_4=20$ ps can be assigned to the contribution of Trp28 and Trp111.[35] The three other

$\tau_1=3.25$ ns, $\tau_2=1.54$ ns and $\tau_3=0.45$ ns are in accordance with previous works.[37, 38] The anisotropy decay fits well with two correlation times, 3.25 ns and 0.14 ns, which can be assigned to the protein global motion and the Trp62 internal rotation respectively.[4] For the amyloid, the average lifetime is longer (2.59 ns) and four lifetimes are necessary to fit the fluorescence decay. Interestingly, the lifetime values $\tau_1=3.79$ ns, $\tau_2=1.31$ ns, $\tau_3=0.31$ ns and $\tau_4=0.01$ ns are close to the native protein ones. The longer average lifetime comes from the yield inversion $Y_1=33\%$ - $Y_2=55\%$ and $Y_1=54\%$ - $Y_2=37\%$ for native and amyloid respectively. This result can be interpreted as a modification of the photophysical properties of Trp108 and/or Trp62. The correlation time upper than 100 ns reveals that fibrillation has occurred. However, the value is not accurate because it is limited by the fluorescence lifetime of the emitter. The interesting result is the similar global depolarization for the lysozyme and the amyloid (0.16) which suggests that a weak modification of the polarity of the Trp environment, typically the exposition to the solvent. Under acidic conditions, different mechanisms have been proposed to explain the amyloid formation. It can be noticed that, we have early stage fibrils and not mature one. The acrylamide test on similar fibrils has been shown that the Trp62 is accessible.[39] Under similar condition, Krebs and co-worker suggested that the peptides (49-64) are involved in the fibrillation process. Frare *et al.* have shown that the amyloid core structure (residues 32–108) is essentially identical to the native protein.[40] This can explain that we did not observe a shift of the FTIR band. Indeed, we can assume that the weak structural modification of the protein affects mainly the Trp62 and Trp63 environment, which can explain the modification of the fluorescence lifetime.

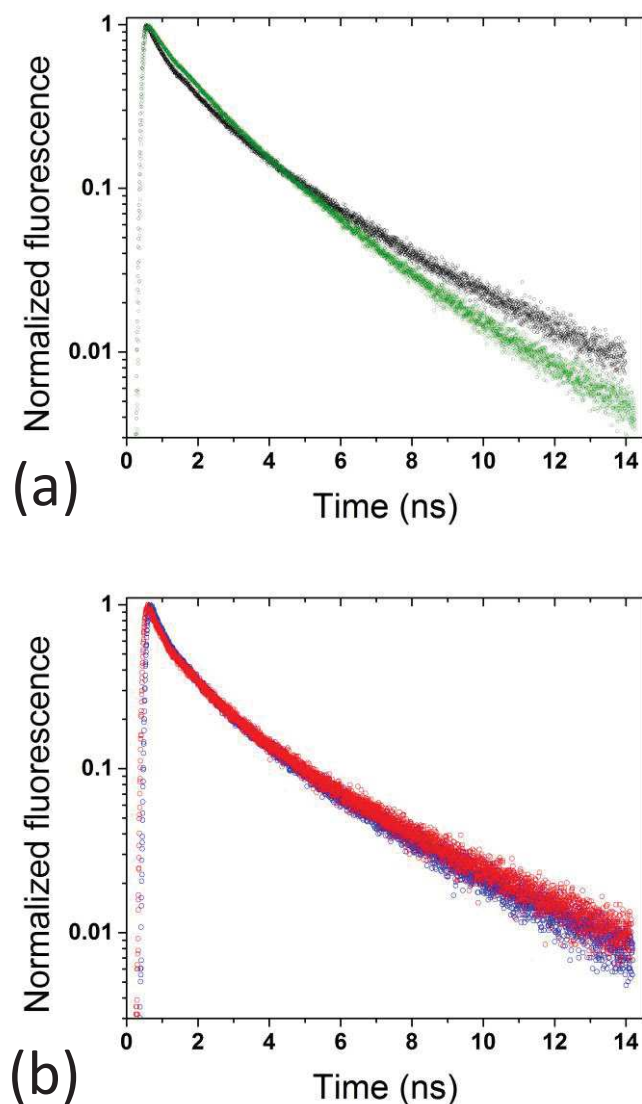


Figure 5.4: Fluorescence decay of (a) LYS (green, circle) and AMY (black circle) free in solution and (b) loaded in LHD-LYS (red, circle) and LDH-AMY (bleu, circle).

After loading onto LDH, the average lifetime of lysozyme increases to 2.65 ns. As for amyloid in solution, we observed a longer τ_1 than for native protein and an inversion of Y_1 and Y_2 . This modification of the photophysical properties can be due to an interaction between the LDH material and Trp and/or a weak modification of the protein structure due to the adsorption. Lysozyme is considered as a hard protein and, normally, no denaturation occurs when it is adsorbed. Interestingly, for amyloids we observed also a longer lifetime around 4 ns. At this stage, it is interesting to point out that the photophysical properties of native and

fibril lysozyme after loading onto the material are not very different from their natives and functional states. Since the major contribution of fluorescence emission comes from the Trp62 which is located in enzymatic site, we can expect that the lysozyme could keep its antibacterial activity.

	τ_1 (ns)	τ_2 (ns)	τ_3 (ns)	τ_4 (ns)	Y_1 (%)	Y_2 (%)	Y_3 (%)	Y_4 (%)	$\bar{\tau}$ (ns)	χ^2
LYS	3.25	1.54	0.45	0.02	33	55	8	2	1.98	0.93
LDH-LYS	4.01	1.33	0.32	0.01	53	35	9	1	2.65	0.90
AMY	3.79	1.31	0.31	0.01	54	37	6	1	2.59	0.92
LDH-AMY	4.06	1.5	0.4	0.03	48	36	11	3	2.56	0.92

	Φ_1 (ns)	Φ_2 (ns)	r_1	r_2	$r_{(0)}$	χ_v^2	χ_h^2
LYS	3.25	0.14	0.16	0.01	0.17	1.01	1.07
AMY	429.96	1.26	0.1	0.06	0.16	1.05	1.12

Table 5.2: Fluorescence lifetime (τ_i), results for lysozyme and amyloid in PBS buffer solution and loaded on layered LDH material, obtained for an excitation wavelength of 294 nm and recorded at 345 nm. Anisotropy correlation time (Φ_i) and depolarization component (r_j) results for lysozyme and amyloid in PBS buffer.

3.4. Antibacterial activity

The antibacterial activities of lysozyme (LYS), amyloid (AMY) and biohybrid materials (LDH-LYS and LDH-AMY) were assessed against the Gram positive *Staphylococcus*

epidermidis (Figure 5.5a). All experiments were performed with the same enzyme concentration, either free or adsorbed (*i.e.* 45.6 mg L⁻¹ of lysozyme equivalent).

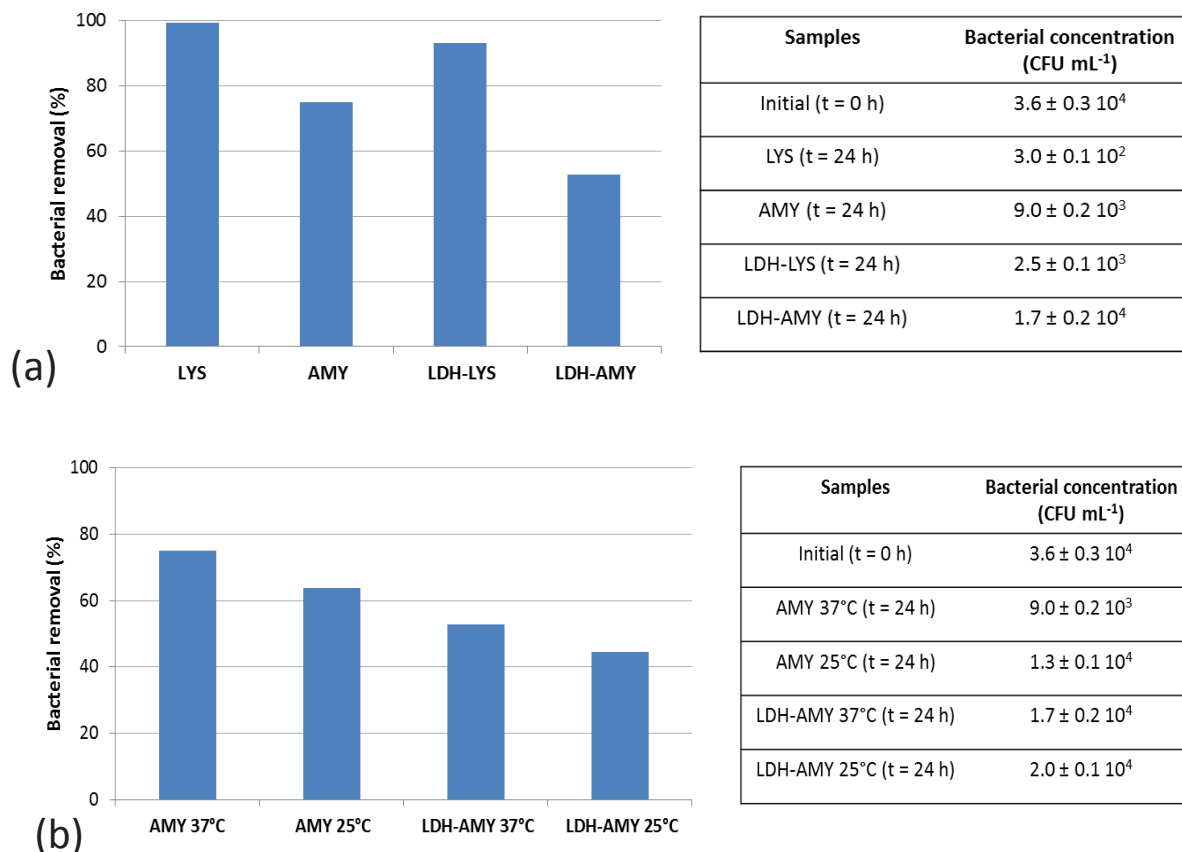


Figure 5.5: (a) Bacterial removals measured at 37°C over 24 h for Lysozyme (LYS), Amyloid (AMY), LDH-Lysozyme (LDH-LYS) and LDH-Amyloid (LDH-AMY). (b) Bacterial removals measured at 37°C and 25°C over 24 h for Amyloid (AMY) and LDH-Amyloid (LDH-AMY). The error bar is the SD for n=2.

Control experiments showed that the bacterial concentration remained constant over 24 h when no material was present inside the reactors; moreover, no bactericidal activity of unmodified LDH was evidenced (data not shown). Native lysozyme exhibits nearly 100 % of bacterial removal against 75 % for the amyloid form. This activity loss is in good agreement with the results reported in the literature.[41] As mentioned above, the enzymatic activity depends on the active site integrity and accessibility. Thus our results confirm that enzymatic site is not totally denatured in the case of amyloid. However, we have observed a modification

of the fluorescence lifetime of Trp in the case of amyloids likely due to a modification of Trp62 and Trp63 environment. These amino-acids are located in a loop between the β -sheet and α -helix area in enzymatic site but they do not participate to the substrate chelation. Thus, it is reasonable to think that the fibrillation process may result on a weak modification of the enzymatic site structure which could be at the origin of the lower biological activity. In addition, as previously mentioned we have worked at constant concentration of monomer protein. Thus for amyloid, the protein concentration is the same but the number of objects able to enter in contact with bacteria is lower.

After adsorption on LDH, the antibacterial activity of both lysozyme and amyloid decreases. In the case of amyloid, this decrease is more significant because it reaches 22 % vs only 6 % for the lysozyme. Since the enzymatic activity depends on the active site integrity and also on the substrate accessibility, we can claim that the loading onto the material does not totally denature the lysozyme and the active sites are not fully hidden. The decrease of activity can be supported by the modification of photophysical properties of both lysozyme and amyloid after adsorption which suggests a weak modification of the protein environment of Trp62, as previously reported in the case of clay or LDH exchanged with non-ionic surfactant.[4] Interestingly, the fluorescence lifetimes are similar for lysozyme and amyloid after their loading on LDH. In this case, it is acceptable to think that the difference comes from the fact that adsorption processes hinder some of the enzymatic sites of the amyloids.

The effect of the temperature on the antibacterial activity was also investigated for free and adsorbed amyloid (**Figure 5.5b**). Bacterial removals for both free and adsorbed amyloids are lower at 25°C than at 37°C. This result is consistent with the fact that 37°C is reported as an optimal temperature for lysozyme operating.[42] Moreover, the activity decrease observed between free and loaded forms is of the same order of magnitude (22% at 37°C vs 19% at 25°C). These results suggest that the observed difference is more probably related to an

increased diffusion of the substrate to the active site at higher temperature than to a structural change of the protein.

4. Conclusion

We have investigated how the immobilization of lysozyme in its native state and of the amyloid fibril onto LDH materials can affect the antibacterial activity. Amyloid from lysozyme was produced in early state to ensure its solubility in water at neutral pH.. The adsorption kinetics reveals a higher constant for amyloid than native lysozyme. The protein and the amyloid are located on the grain surface and not in the interlayer space. Interestingly, after loading and/or fibrillation of the lysozyme, its antibacterial properties were kept. This means that the active site is accessible and keeps its integrity. The decrease of activity was explained by (i) a weak modification of its structure especially in the loop between the β -sheets and α -helix where are located the Trp63 and Trp62 and (ii) a decrease of number of object which can interact with the bacteria.

More generally these results are interesting because they permit to confirm the possibility to design new hybrid biological/inorganic materials using lysozyme amyloids. With the multiple properties of the lysozyme like specific chelation with copper ions and antibacterial activity, such hybrid system could provide a basis to develop multifunctional materials.

III. Partie complémentaire: Evaluation de l'effet de la matrice HDL sur l'activité antibactérienne du matériau

1. Influence de la matrice sur la cinétique d'adsorption :

Les cinétiques d'adsorption du lysozyme dans les différentes matrices HDL : Zn_2Al-Cl , Mg_2Al-Cl , Mn_2Al-Cl et Ni_2Al-Cl ont été étudiée afin de déterminer le temps nécessaire pour atteindre l'équilibre. Cette étude a été effectuée dans les conditions suivantes : une solution de lysozyme 17 mg mL^{-1} a été mise en contact avec 10 mg d'une phase HDL à température

ambiante dans du tampon PBS (pH=7). La figure 5.6 présente les courbes de la cinétique d'adsorption, pour des temps de contacts compris entre 30 min à 1440 min.

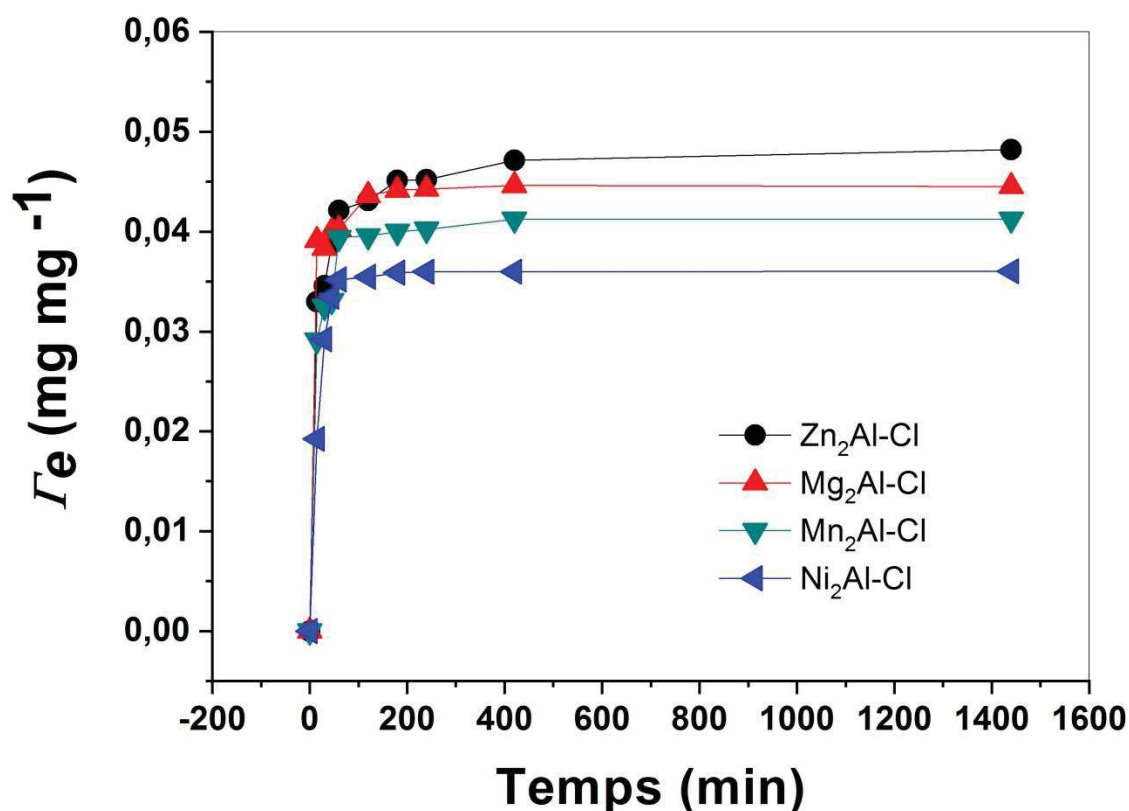


Figure 5.6: Cinétiques de l'adsorption de lysozyme dans les phases HDL. Zn₂Al-Cl (noir, cercle), Mg₂Al-Cl (rouge, triangle haut), Ni₂Al-Cl (bleu, triangle gauche) et Mn₂Al-Cl (vert, triangle bas).

Un comportement similaire est observé pour les différentes matrices HDL. La cinétique d'adsorption du lysozyme est rapide : l'état d'équilibre semble être atteint après 180 min. Toutefois la concentration interfaciale Γ_e de lysozyme à l'équilibre change selon la nature de la matrice HDL (Figure 5.6). Habituellement, l'adsorption des protéines sur les matériaux lamellaires suivent une cinétique de pseudo-premier ordre ou pseudo-second. Le tableau 5.3 donne les paramètres cinétiques obtenus par fittage avec les modèles de pseudo-premier ordre ou pseudo-second. Dans nos expériences, la cinétique du pseudo-deuxième ordre (Figure 5.7) est plus appropriée puisque le coefficient de corrélation R^2 de l'ordre de 0,999 (Tableau 5.3).

Ce résultat suggère que le processus d'adsorption n'est pas gouverné par l'échange d'ions à pH = 7 [43].

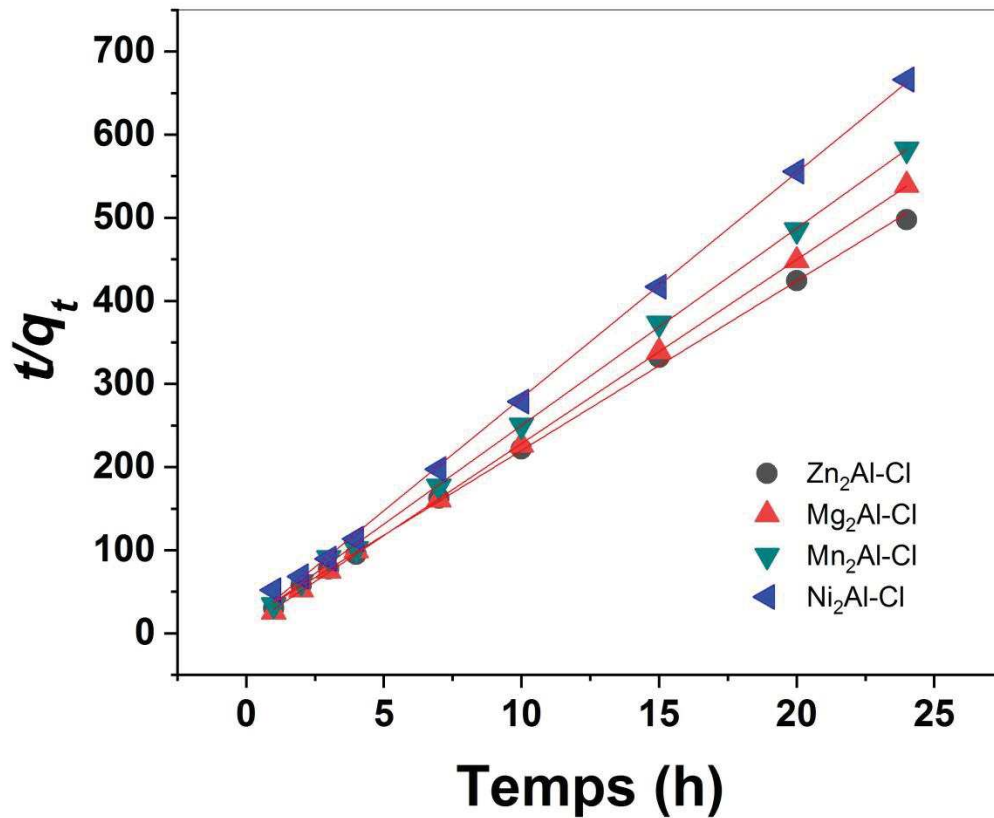


Figure 5.7: Pseudo- deuxième ordre pour l'adsorption du lysozyme dans les différentes phases HDL : Zn₂Al-(noir, carré), Mg₂Al (rouge, cercle), Mn₂Al (bleu, triangle haut) et Ni₂Al (vert, triangle bas).

D'après le Tableau 5.3, les valeurs calculées de la concentration interfaciale à l'équilibre Γ_e sont très similaire à celle obtenue expérimentalement. Le coefficient k_2 il varie selon la matrice HDL.

Tableau 5.3: Paramètres cinétiques du lysozyme adsorbé dans les différentes phases HDL.

HDL	Γ_e (exp) (mg mg ⁻¹)	Pseudo-premier-ordre			Pseudo-deuxième- ordre		
		Γ_e (mg mg ⁻¹)	k_1 (min ⁻¹)	R ²	Γ_e (mg mg ⁻¹)	k_2 (min ⁻¹)	R ²
Zn ₂ Al-Cl-LYS	0.045	0.085	0.0021	0.96678	0.049	6.315	0.99893
Mg ₂ Al-Cl-LYS	0.049	0.055	0.01247	0.97865	0.045	1.42	0.99984
Mn ₂ Al-Cl-LYS	0.045	0.07	0.02124	0.98208	0.042	4.64	0.99958
Ni ₂ Al-Cl-LYS	0.045	0.057	0.02126.	0.90926	0.036	6.66	0.9992

2. Localisation du lysozyme dans les différentes phases HDL

Nous avons étudié la localisation du lysozyme dans les différentes matrices HDL. La Figure 5.8 présente les différents diffractogrammes des phases HDL-LYS et des HDL seules (enregistrés en 2 θ de 5° jusqu'à 70°). Les différentes phases HDL Zn₂Al-Cl, Mg₂Al-Cl, Mn₂Al-Cl et Ni₂Al-Cl synthétisés par la méthode de coprécipitation décrite précédemment présentent les pics caractéristiques (003, 006, 012, et 110) [44, 45]. Après adsorption du lysozyme les diffractogrammes ne présentent aucune différence particulière. Les distances interlécitères d_{00l} ont la même position en 2 θ (**Figure 5.8**). Ce résultat montre que l'adsorption du lysozyme se produit uniquement sur la surface externe des grains de HDL. Ce résultat n'est pas surprenant. En effet, l'adsorption du lysozyme a été réalisée à pH 7 en dessous de son point isoélectrique (IEP =10,7). Dans ces conditions, la protéine est globalement chargée positivement [46, 47]. Ainsi les interactions électrostatiques et de ce fait l'échange ne sera pas privilégié. Cela est en bon accord avec la cinétique de pseudo-second ordre.

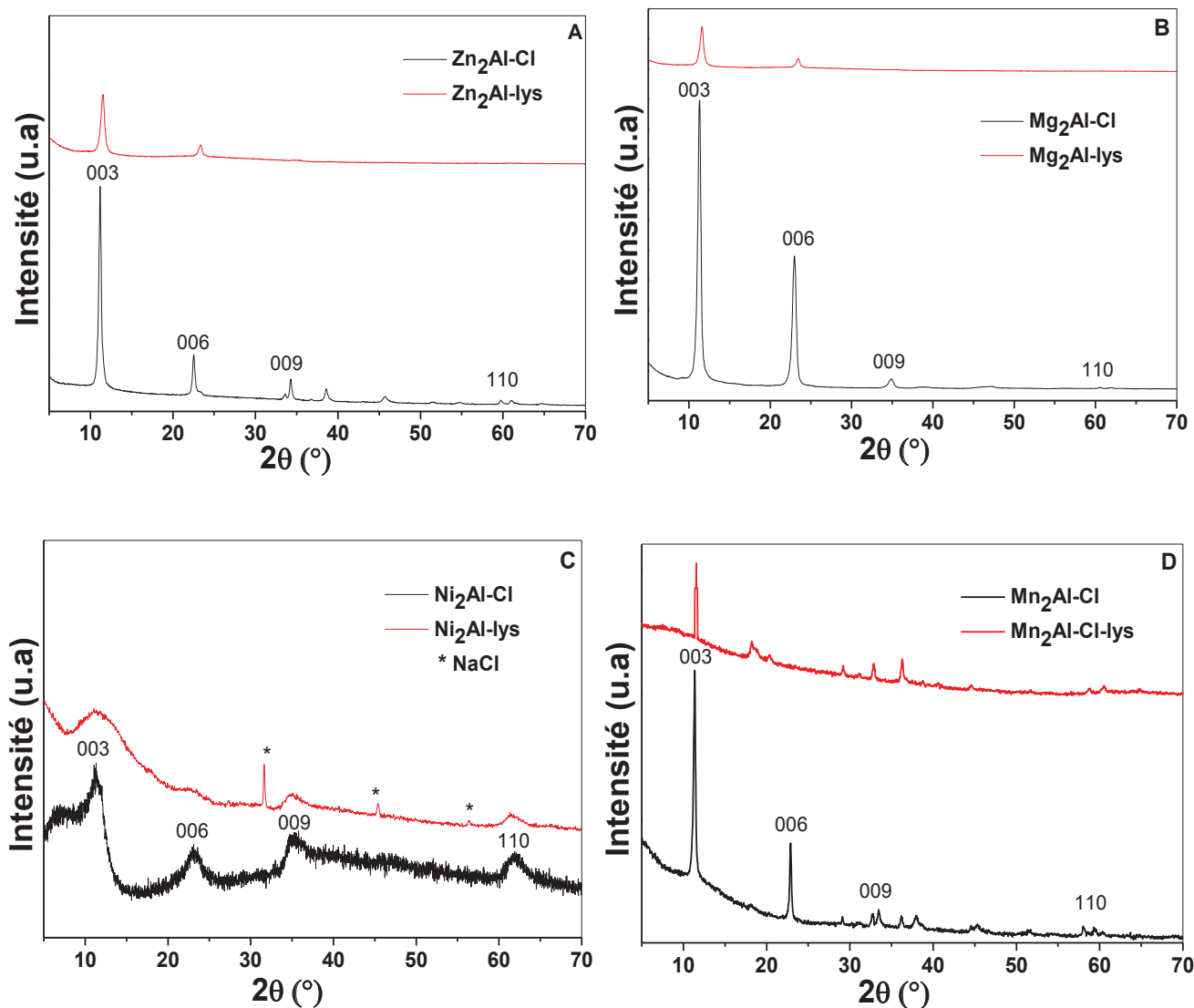


Figure 5.8: Diffractogrammes des rayons X sur poudre des différentes phases HDL-lysozyme : (A) Zn_2Al-Cl (noir) et $Zn_2Al-Cl-LYS$ (rouge), (B) Mg_2Al-Cl (noir) et $Mg_2Al-Cl-LYS$ (rouge), (C) Ni_2Al-Cl (noir) et $Ni_2Al-Cl-LYS$ (rouge) et (D) Mn_2Al-Cl (noir) et $Mn_2Al-Cl-LYS$ (rouge).

3. Influence de la phase HDL sur l'activité antibactérienne du lysozyme

Dans un premier temps, nous nous sommes assurés que les phases HDL ne présentent aucune activité bactéricide. D'après la Figure 5.9, on note que le lysozyme libre présente un taux d'abattement en bactéries plus important que le lysozyme adsorbé dans les phases HDL. La faible baisse d'activité pour HDL-LYS peut être due une mauvaise orientation du site enzymatique, ainsi que nous l'avons montré précédemment [2].

En comparant l'activité des différents matériaux Zn_2Al -LYS, Mg_2Al -LYS, Ni_2Al -LYS et Mn_2Al -LYS, on constate que la nature de la matrice n'as pas un effet significatif sur l'activité du lysozyme.

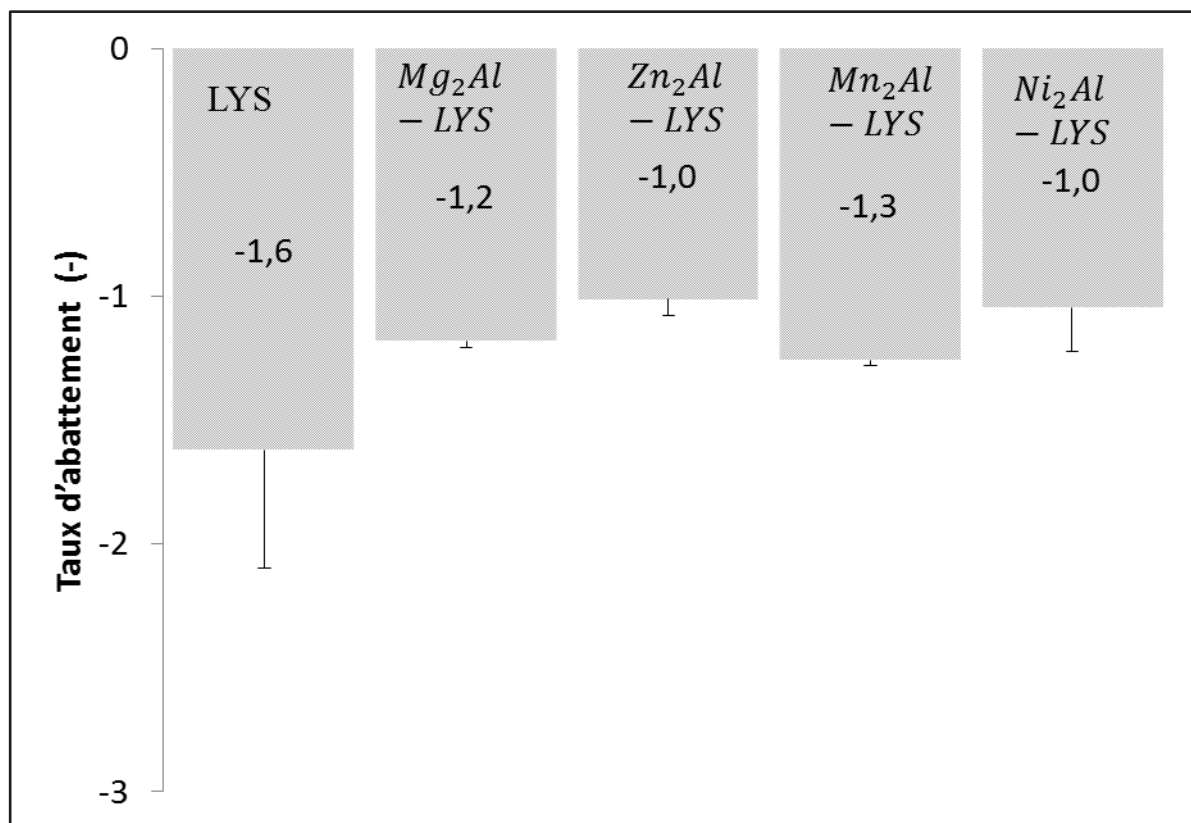


Figure 5.9: Abattements bactériens mesurés à 37°C pendant 24 h pour le lysozyme (LYS), Mg_2Al -LYS, Zn_2Al -LYS, Mn_2Al -LYS et Ni_2Al -LYS (n=3pour chaque teste) ; et p=0.10.

IV. Conclusion

L'adsorption du lysozyme a été étudiée sur quatre phases HDL : Zn_2Al -Cl, Mg_2Al -Cl, Ni_2Al -Cl et Mn_2Al -Cl. La cinétique d'adsorption a été étudiée et suit un modèle de second ordre, la concentration interfaciale de lysozyme à l'équilibre étant comprise entre 0,047 mg mg^{-1} et 0,035 mg mg^{-1} selon la nature de la matrice. L'adsorption du lysozyme n'induit pas de modification structurale de la matrice HDL. Cela prouve que la protéine est localisée à la surface des grains HDL.

V. Références

1. Weiss, M.S., G.J. Palm, and R. Hilgenfeld, *Crystallization, structure solution and refinement of hen egg-white lysozyme at pH 8.0 in the presence of MPD*. Acta Crystallographica Section D, 2000. **56**(8): p. 952-958.
2. Bouaziz, Z., et al., *Structure and antibacterial activity relationships of native and amyloid fibril lysozyme loaded on layered double hydroxide*. Colloids and Surfaces B: Biointerfaces, 2017. **157**: p. 10-17.
3. Weiss, M.S., G.J. Palm, and R. Hilgenfeld, *Crystallization, structure solution and refinement of hen egg-white lysozyme at pH 8.0 in the presence of MPD*. Acta Crystallographica Section D-Biological Crystallography, 2000. **56**: p. 952-958.
4. Balme, S., et al., *Structure, orientation and stability of lysozyme confined in layered materials*. Soft Matter, 2013. **9**(11): p. 3188-3196.
5. Lepoitevin, M., et al., *BSA and lysozyme adsorption on homoionic montmorillonite: Influence of the interlayer cation*. Applied Clay Science, 2014. **95**: p. 396-402.
6. Bhattacharyya, M.S., et al., *Lysozyme Adsorption and Release from Ordered Mesoporous Materials*. Journal of Physical Chemistry C, 2010. **114**(47): p. 19928-19934.
7. Kiersnowski, A., et al., *Delamination of montmorillonite in serum-A new approach to obtaining clay-based biofunctional hybrid materials*. Applied Clay Science, 2009. **44**(3-4): p. 225-229.
8. Luckarift, H.R., et al., *Rapid, room-temperature synthesis of antibacterial bionanocomposites of lysozyme with amorphous silica or titania*. Small, 2006. **2**(5): p. 640-643.
9. Cheng, Y.H., et al., *Effects of metal oxide nanoparticles on the structure and activity of lysozyme*. Colloids and Surfaces B-Biointerfaces, 2017. **151**: p. 344-353.
10. Jahn, T.R. and S.E. Radford, *The Yin and Yang of protein folding*. Febs Journal, 2005. **272**(23): p. 5962-5970.
11. Hartl, F.U. and M. Hayer-Hartl, *Converging concepts of protein folding in vitro and in vivo*. Nature Structural & Molecular Biology, 2009. **16**(6): p. 574-581.
12. Goda, S., et al., *Amyloid protofilament formation of hen egg lysozyme in highly concentrated ethanol solution*. Protein Science, 2000. **9**(2): p. 369-375.
13. Swaminathan, R., et al., *Lysozyme: A Model Protein for Amyloid Research*. Advances in Protein Chemistry and Structural Biology, Vol 84, 2011. **84**: p. 63-111.
14. Booth, D.R., et al., *Instability, unfolding and aggregation of human lysozyme variants underlying amyloid fibrillogenesis*. Nature, 1997. **385**(6619): p. 787-793.
15. Li, C.X., S. Bolisetty, and R. Mezzenga, *Hybrid Nanocomposites of Gold Single-Crystal Platelets and Amyloid Fibrils with Tunable Fluorescence, Conductivity, and Sensing Properties*. Advanced Materials, 2013. **25**(27): p. 3694-3700.
16. Li, C.X. and R. Mezzenga, *The interplay between carbon nanomaterials and amyloid fibrils in bio-nanotechnology*. Nanoscale, 2013. **5**(14): p. 6207-6218.
17. Li, C.X., J. Adamcik, and R. Mezzenga, *Biodegradable nanocomposites of amyloid fibrils and graphene with shape-memory and enzyme-sensing properties*. Nature Nanotechnology, 2012. **7**(7): p. 421-427.
18. Bolisetty, S. and R. Mezzenga, *Amyloid-carbon hybrid membranes for universal water purification*. Nature Nanotechnology, 2016. **11**(4): p. 365-+.
19. Knowles, T.P.J., et al., *Nanostructured films from hierarchical self-assembly of amyloidogenic proteins*. Nature Nanotechnology, 2010. **5**(3): p. 204-207.

20. Adamcik, J., A. Berquand, and R. Mezzenga, *Single-step direct measurement of amyloid fibrils stiffness by peak force quantitative nanomechanical atomic force microscopy*. Applied Physics Letters, 2011. **98**(19).
21. Li, C.X., et al., *Amyloid-Hydroxyapatite Bone Biomimetic Composites*. Advanced Materials, 2014. **26**(20): p. 3207-+.
22. Wang, Q. and D. O'Hare, *Recent Advances in the Synthesis and Application of Layered Double Hydroxide (LDH) Nanosheets*. Chemical Reviews, 2012. **112**(7): p. 4124-4155.
23. Kong, X.G., et al., *Layer-by-layer assembly of bi-protein/layered double hydroxide ultrathin film and its electrocatalytic behavior for catechol*. Biosensors & Bioelectronics, 2010. **26**(2): p. 549-554.
24. Rao, C.N.R., *Novel materials, materials design and synthetic strategies: recent advances and new directions*. Journal of Materials Chemistry, 1999. **9**(1): p. 1-14.
25. Bouaziz, Z., et al., *Adsorption of nisin into layered double hydroxide nanohybrids and in-vitro controlled release*. Materials Science and Engineering: C, 2017.
26. Yang, Q.Z., et al., *Synthesis and characterization of polyoxyethylene sulfate intercalated Mg-Al-nitrate layered double hydroxide*. Langmuir, 2003. **19**(14): p. 5570-5574.
27. Kwak, S.Y., et al., *Inorganic delivery vector for intravenous injection*. Biomaterials, 2004. **25**(28): p. 5995-6001.
28. Hill, S.E., et al., *Amyloid Protofibrils of Lysozyme Nucleate and Grow Via Oligomer Fusion*. Biophysical Journal, 2009. **96**(9): p. 3781-3790.
29. Krieger, J. and J. Langowski, *QuickFit 3.0: A data evaluation application for biophysics*, <http://www.dkfz.de/Macromol/quickfit/index.html>, 2005.
30. Balme, S., et al., *Highly efficient fluorescent label unquenched by protein interaction to probe the avidin rotational motion*. Journal of Photochemistry and Photobiology a-Chemistry, 2006. **184**(1-2): p. 204-211.
31. Tangaraj, V., et al., *Fluorescent Quenching of Sulforhodamine dye over Graphene Oxide and Graphene-like Boron Nitride*. European journal of inorganic chemistry, 2016. **2016**(13-14): p. 2125–2130
32. Arnaudov, L.N. and R. de Vries, *Thermally induced fibrillar aggregation of hen egg white lysozyme*. Biophysical Journal, 2005. **88**(1): p. 515-526.
33. Antonio, P., K. Iha, and M.E.V. Suarez-Iha, *Kinetic modeling of adsorption of di-2-pyridylketone salicyloylhydrazone on silica gel*. Journal of Colloid and Interface Science, 2007. **307**(1): p. 24-28.
34. Cowgill, R.W., *Fluorescence and Protein Structure .11. Fluorescence Quenching by Disulfide and Sulfhydryl Groups*. Biochimica Et Biophysica Acta, 1967. **140**(1): p. 37-&.
35. Nishimoto, E., et al., *Internal motion of lysozyme studied by time-resolved fluorescence depolarization of tryptophan residues*. Biochemistry, 1998. **37**(16): p. 5599-5607.
36. Nishimoto, E., et al., *Resolution and characterization of tryptophyl fluorescence of hen egg-white lysozyme by quenching- and time-resolved spectroscopy*. Bioscience Biotechnology and Biochemistry, 1999. **63**(2): p. 329-336.
37. Narayanan, J. and X.Y. Liu, *Protein interactions in undersaturated and supersaturated solutions: A study using light and x-ray scattering*. Biophysical Journal, 2003. **84**(1): p. 523-532.
38. Pastor, I., et al., *Structure and dynamics of lysozyme encapsulated in a silica sol-gel matrix*. Journal of Physical Chemistry B, 2007. **111**(39): p. 11603-11610.
39. Chaari, A., et al., *Insights into Kinetics of Agitation-Induced Aggregation of Hen Lysozyme under Heat and Acidic Conditions from Various Spectroscopic Methods*. Plos One, 2015. **10**(11).

40. Frare, E., et al., *Identification of the core structure of lysozyme amyloid fibrils by proteolysis*. Journal of Molecular Biology, 2006. **361**(3): p. 551-561.
41. Yang, Q.Z., Y.Y. Chang, and H.Z. Zhao, *Preparation and antibacterial activity of lysozyme and layered double hydroxide nanocomposites*. Water Research, 2013. **47**(17): p. 6712-6718.
42. Hawiger, J., *Purification and Properties of Lysozyme Produced by Staphylococcus Aureus*. Journal of Bacteriology, 1968. **95**(2): p. 376-&.
43. Antonio, P., K. Iha, and M.E.V. Suárez-Iha, *Kinetic modeling of adsorption of di-2-pyridylketone salicyloylhydrazone on silica gel*. Journal of Colloid and Interface Science, 2007. **307**(1): p. 24-28.
44. Majoni, S. and J.M. Hossenlopp, *Controlled Release Kinetics in Hydroxy Double Salts: Effect of Host Anion Structure*. Advances in Physical Chemistry, 2014. **2014**: p. 12.
45. Roussel, H., et al., *Cationic Order and Structure of [Zn-Cr-Cl] and [Cu-Cr-Cl] Layered Double Hydroxides: A XRD and EXAFS Study*. The Journal of Physical Chemistry B, 2000. **104**(25): p. 5915-5923.
46. Jachimska, B., A. Kozłowska, and A. Pajor-Świerzy, *Protonation of Lysozymes and Its Consequences for the Adsorption onto a Mica Surface*. Langmuir, 2012. **28**(31): p. 11502-11510.
47. Ethève, J. and P. Déjardin, *Adsorption Kinetics of Lysozyme on Silica at pH 7.4: Correlation between Streaming Potential and Adsorbed Amount*. Langmuir, 2002. **18**(5): p. 1777-1785.

Conclusion générale

Dans ce travail, nous avons élaboré de nouveaux matériaux à bases d'hydroxydes doubles lamellaires (HDL) et d'antibiotiques de différents types (cyclines, polypeptide et enzyme) afin de contrôler et de protéger l'activité des antibiotiques par le confinement. Notre travail avait deux objectifs principaux : (i) établir une corrélation entre la localisation des antibiotiques dans les matrices HDL et leurs activités antibactériennes, et (ii) définir la matrice adéquate qui protégerait les antibiotiques de la dégradation. Pour atteindre nos objectifs, nous avons répondu à deux questions.

La première question était : quelle est l'influence de la localisation des antibiotiques dans la matrice HDL sur leur activité antibactérienne ?

Pour le lysozyme, les hypothèses du travail étaient que son adsorption sur des surfaces solides est considéré comme irréversible, et que son activité antibactérienne dépend de l'intégrité et de l'accessibilité du site enzymatique. La localisation du lysozyme dans le matériau influe sur l'accessibilité du site enzymatique. Son activité antibactérienne dépendra de l'orientation de la protéine. Si le site est accessible le lysozyme conservera une bonne activité antibactérienne. En ce qui concerne l'antibiotique enzymatique (le lysozyme), nous avons mis en évidence que son immobilisation dans différentes matrices HDL (Zn_2Al-Cl , Mg_2Al-Cl , Ni_2Al-Cl et Mn_2Al-Cl) est irréversible et que le lysozyme est localisé à la surface des grains des différentes phases HDL, quelle que soit leur nature. La modification de la fluorescence du Trp62 caractéristique du site actif de l'enzyme suggère une petite modification de l'intégrité du site. L'activité du lysozyme adsorbé sur les HDL diminue de 35% par comparaison au lysozyme libre. Cette diminution peut être due à une dénaturation modérée du site enzymatique mais surtout à une accessibilité réduite pour le substrat bactérien. Pour les antibiotiques cyclines et nisine, nous avons vérifié que l'adsorption sur les phases HDL est réversible. Quelle que soit la nature de l'HDL, la nisine garde son activité antimicrobienne à 4°C car elle présente le même abattement bactérien par rapport à la nisine libre. L'immobilisation de la nisine au sein

de la phase HDL Zn_2Al-Cl a néanmoins permis une capacité de relargage de la nisine prolongée jusqu'à trois fois plus longtemps que la nisine libre. Comme la phase Zn_2Al-Cl , la nisine est également confinée à l'intérieur de l'espace interfeuillelet pour les phases HDL Mg_2Al-Cl et Ni_2Al-Cl alors qu'elle est localisée sur la surface des grains pour la phase HDL Mn_2Al-Cl .

Pour les matériaux HDL-TCH et HDL-OXY, nous avons utilisé deux méthodes de synthèse : la coprécipitation et l'échange anionique. Quelle que soit la méthode de synthèse mise en œuvre, notre étude a montré que les deux antibiotiques sont localisés uniquement à la surface des grains des matériaux. Les matériaux préparés par coprécipitation ont révélé une charge en antibiotique adsorbé plus forte et par conséquent, un taux de relargage plus important (environ 35% de plus) par rapport aux matériaux préparés par échange. Les matériaux coprécipités ont aussi présenté une meilleure activité antibactérienne à 4°C.

La deuxième question était : la matrice HDL pourrait-elle protéger les cyclines et la nisine d'une dégradation thermique ou par exposition à des UV ?

D'après la littérature les hypothèses de travail étaient : les antibiotiques cyclines et la nisine sont très sensibles à la lumière et/ou température. Leur intercalation nous permettrait de limiter leur dégradation. La protection de l'antibiotique dépend de sa localisation, si il est confiné à l'intérieur de l'espace interfeuillelet de matériau, il devrait être plus protégé que si il est localisé à la surface des grains. Nos résultats ont montré que la localisation de la nisine dans les phases HDL joue un rôle très important sur la stabilité des matériaux stockés à différentes températures. Dans le cas où la nisine est confinée à l'intérieur de l'espace interfeuillelet (matrices HDL de type Zn_2Al-Cl , Mg_2Al-Cl et Ni_2Al-Cl), elle est alors protégée et conserve son activité antibactérienne nominale, alors que si elle est située uniquement à la surface des grains (matrice HDL Mn_2Al-Cl), son activité est diminuée. De la même manière, les antibiotiques cyclines (TCH et OXY) perdent de leur activité lorsqu'ils sont adsorbés sur

les HDL. Les résultats obtenus sont en parfait accord avec l'hypothèse formulée au départ, c'est-à-dire que la protection de l'antibiotique dépend de sa localisation. Pour les HDL-TCH et HDL-OXY, après l'exposition aux rayonnements UV et pour un stockage à haute température (30, 60 et 120 °C), les résultats ont montré une baisse significative de l'activité antibactérienne par comparaison aux antibiotiques libres dans les mêmes conditions. Cette diminution d'activité est accrue par comparaison aux conditions standards de stockage (4°C et à l'abri de la lumière), ce qui signifie que l'adsorption des antibiotiques sur les matrices HDL, soit par coprécipitation ou/et par échange ionique, pourrait catalyser la dégradation des antibiotiques. Dans ce cas, la matrice HDL joue probablement le rôle de photocatalyseur.

Pour les systèmes HDL-TCH et HDL-OXY, une perspective à mes travaux de thèse pourrait être l'identification et la toxicité des produits de dégradation des antibiotiques TCH et OXY catalysés par les HDL. Pour le système HDL-LYS, nous n'avons pas eu le temps d'étudier l'effet de la température et de la lumière UV sur la stabilité du lysozyme et cette étude pourrait s'inscrire dans la continuité de mes travaux.

Le confinement des antibiotiques dans des matrices inorganiques, constituent une classe de matériaux particulièrement bien adaptée, pour la conservation de leurs activités. Cette thèse a pour objectifs: (1) d'établir une corrélation entre la localisation des antibiotiques dans les matrices HDL et leur activité antibactérienne, (2) de définir la matrice la plus adéquate pour protéger les antibiotiques de la dégradation thermique et/ou photonique. Nous nous sommes intéressés à étudier l'influence de la localisation de l'antibiotique dans le matériau sur son activité antibactérienne, et de vérifier si la phase HDL peuvent protéger les antibiotiques de la dégradation thermique et/ou photonique.

Dans ces travaux, nous avons utilisé des hydroxydes doubles lamellaires (HDL) de type Zn_2Al , Mg_2Al , Ni_2Al et Mn_2Al comme des supports pour différents types d'antibiotiques (cycline, polypeptide et enzymatique). Nous avons étudié l'immobilisation de deux antibiotiques de types cyclines tetracycline (TCH) et oxytetracycline (OXY), par deux méthodes (la coprécipitation et l'échange anionique). Nous avons étudié l'impact de l'irradiation du UV ou/et stockage à différentes températures (30, 60 et 120°C) pour évaluer leurs activités antibactériennes. Les résultats ont montré que les antibiotiques sont localisés à la surface des grains de la phase HDL. Les matériaux préparés par coprécipitation présentent un taux de relargage et une activité antibactérienne plus importante que celles préparé par échange anionique. Une baisse significative de l'activité antibactérienne après un stockage à haute température et l'exposition à la lumière UV est observée. Cela permet de conclure que la phase HDL accélère la dégradation des antibiotiques sous l'effet du température et la lumière UV. Nous avons étudié l'immobilisation de la nisine dans des différentes phases HDL, en tenant compte de l'effet du rapport molaire, l'effet de matrice, l'effet de l'anion et l'effet de morphologie. Les résultats ont montré que l'immobilisation de la nisine dans les différentes phases HDL n'affecte pas son activité antibactérienne à 4°C. En revanche, on remarque que l'activité de la nisine est moins sensible à la température quand elle est confinée. La localisation de la nisine joue donc un rôle très important dans la meilleure protection de l'activité antibactérienne. Enfin nous avons effectué l'immobilisation du lysozyme dans les différentes phases HDL. Nos résultats ont montré que, le lysozyme est localisé à la surface des grains du matériau, on note un abattement plus important pour le LYS libre que LYS adsorbé. Cela peut être du à une dénaturation du site enzymatique.

Abstract

The confinement of antibiotics in inorganic matrices results in a class of materials particularly suitable for the conservation of their activities. This thesis aims to: (1) establish a correlation between the localization of antibiotics in HDL matrices and their antibacterial activity, (2) define the most appropriate matrix to prevent the antibiotics thermal and / or photon degradation. We were interested in studying the influence of the antibiotic localization in the material and the effect on the material antibacterial activity and whether the HDL phase can protect the antibiotics from thermal and / or photon degradation.

In this work, we used double lamellar hydroxide (HDL) type Zn_2Al , Mg_2Al , Ni_2Al and Mn_2Al as supports for different types of antibiotics (cyclin, polypeptide and enzymatic). We investigated the immobilization of two cyclin types tetracycline (TCH) and oxytetracycline (OXY), by two methods (coprecipitation and anion exchange). We investigated the impact of UV irradiation and / or storage at different temperatures (30, 60 and 120°C) to evaluate their antibacterial activities. The results showed that the antibiotics are localized on the grain surface of the HDL phase. The materials prepared by coprecipitation have a higher release rate and antibacterial activity than those prepared by anion exchange. A significant decrease in the antibacterial activity after storage at high temperature and exposure to UV light was observed. This leads to the conclusion that the HDL phase accelerates the degradation of antibiotics under the effect of temperature and UV light. We investigated the immobilization of nisin in different HDL phases, taking into account the effect of the molar ratio, of the matrix, of the anion and the morphology. The results showed that the immobilization of nisin in the different HDL phases does not affect its antibacterial activity at 4°C. On the other hand, we noticed that the activity of nisin is almost temperature sensitive under confinement. The localization of nisin plays therefore a very important role for the best protection of the antibacterial activity. Finally, we immobilized lysozyme in the various HDL phases. Our results showed that lysozyme is localized on the surface of the material grains, one notes a more important abattement for free LYS than adsorbed LYS. This can be due to denaturation of the enzyme site.