



HAL
open science

Elaboration et caractérisation de biomatériaux antimicrobiens à base d'alginate pour des applications dans les domaines médicaux et marins

Léa Abi Nassif

► **To cite this version:**

Léa Abi Nassif. Elaboration et caractérisation de biomatériaux antimicrobiens à base d'alginate pour des applications dans les domaines médicaux et marins. Science des matériaux [cond-mat.mtrl-sci]. Université de Bretagne occidentale - Brest; Université Saint-Joseph (Beyrouth), 2019. Français. NNT : 2019BRES0007 . tel-02281728

HAL Id: tel-02281728

<https://theses.hal.science/tel-02281728v1>

Submitted on 9 Sep 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.

THESE DE DOCTORAT EN CO-TUTELLE

DE L'UNIVERSITE DE BRETAGNE OCCIDENTALE
COMUE UNIVERSITE BRETAGNE LOIRE

ECOLE DOCTORALE N° 596
Matière, Molécules, Matériaux
Spécialité : *Physique*

AVEC L'UNIVERSITE SAINT-JOSEPH

Par

Léa ABI NASSIF

Elaboration et caractérisation de biomatériaux antimicrobiens à base d'alginate pour des applications dans les domaines médicaux et marins

Thèse présentée et soutenue à Beyrouth, Liban, le 25 janvier 2019
Unité de recherche : Lab-STICC

Rapporteurs avant soutenance :

Pr. Roland HABCHI Université Libanaise, Beyrouth – Liban
Dr. Sophie SABLE Université de la Rochelle, La Rochelle - France

Composition du Jury :

Dr. Sophie SABLE Université de la Rochelle, La Rochelle - France
Pr. Roland HABCHI Université Libanaise, Beyrouth – Liban
Pr. Maha DAOU Université Saint-Joseph, Beyrouth - Liban
Pr. Claire HELLIO Université de Bretagne Occidentale, Brest - France
Dr. Stéphane RIOUAL Université de Bretagne Occidentale, Brest - France

Président du Jury
Pr. Wehbeh FARAH Université Saint-Joseph, Beyrouth – Liban,

Directeurs de thèse
Dr. Benoît LESCOP Université de Bretagne Occidentale, Brest – France
Pr. Maher ABOUD Université Saint-Joseph, Beyrouth - Liban

Remerciements

Ce travail a été effectué en cotutelle entre le laboratoire LabSticc de l'Université de Bretagne Occidentale (UBO) en France et la Faculté de Sciences de l'Université Saint Joseph (USJ) au Liban.

Je tiens à remercier les organismes qui ont financé ce travail : L'Agence Universitaire de la Francophonie (AUF), l'Institut Français et le conseil de la recherche de l'USJ. Je remercie de même le Pr. Roland Habchi et le Dr. Sophie Sablé d'avoir accepté de rapporter mon travail de thèse. Je tiens à remercier également le Pr. Maha DAOU et le Pr. Claire HELLIO de m'avoir fait l'honneur d'examiner ce travail.

Je remercie mes directeurs de thèse Benoît LESCOP et Maher ABBOUD ainsi que mes co-directeurs Stéphane RIOUAL et Wehbeh FARAH pour leur aide précieuse et indispensable, leur soutien et les différentes discussions et conseils qui ont mené au bon déroulement du travail ces trois ans de thèse. Je vous remercie pour tout ce que vous m'avez donné.

Durant ces trois années, j'ai eu la chance de collaborer avec plusieurs équipes de recherche à l'USJ et à l'UBO ce qui a largement contribué à enrichir ce travail. Je tiens donc à remercier l'équipe de microbiologie de l'USJ ainsi que l'équipe de microscopie de l'UBO plus particulièrement un grand merci à Philippe Elias. Je remercie du fond du cœur l'équipe BIODIMAR de Brest, en particulier Rozenne Trépos, Marilyne Fauchon et Claire HELLIO pour m'avoir aidé à rentrer dans le bain de la microbiologie marine.

A mes amis à Brest je dis merci d'avoir été ma famille à l'étranger. Christophe, Manon, Gwendal., Rania et Christelle. J'aimerai remercier Christelle et Hadi pour tous les fous rires durant nos pauses café. A mes amis au Liban, Jean, Marie, Jad et Séréna merci d'avoir toujours gardé cette amitié tant précieuse malgré la distance qui nous séparait.

A ma très chère famille, vous êtes ce que j'ai de plus précieux, merci pour vos encouragements, votre patience, votre présence à mes côtés mais surtout votre amour.

Table des matières

Introduction générale.....	1
Chapitre I Etat de l'art	4
1. Définition des biofilms.....	5
1.1. Les bactéries	6
1.2. Les microalgues	8
1.3. Le biofouling	10
2. Effet du biofilm sur les aciers inoxydables en eau de mer	14
2.1. Corrosion influencée par microorganismes des aciers inoxydables	14
2.2. Suivi de la formation de biofilms par l'évolution du potentiel de corrosion ou potentiel d'abandon.....	15
3. Lutte contre les biofilms	16
3.1. Les traitements physiques.....	16
3.1.1. Les ultra-violets (UV)	16
3.1.2. Les ultrasons	17
3.1.3. Les traitements mécaniques	18
3.2. Les traitements chimiques	19
3.2.1. Les traitements par oxydation.....	19
3.2.2. Les biocides.....	20
3.2.2.1. Les désinfectants	20
3.2.2.2. Les produits de protection	21
3.2.2.3. Les produits de lutte contre les nuisibles	22
3.2.2.4. Autres produits biocides.....	22
3.2.3. Les biostatiques	23
3.2.4. Les produits anti-adhésifs.....	23
3.2.5. Les peintures antifouling	25
4. Agents antibactériens : Nanoparticules (NPs) et ions	26
4.1. Les nanoparticules (NPs)	26
4.2. Effet de la toxicité des nanoparticules sur les organismes marins non ciblés	30
4.3. Les ions	32
5. Biomatériaux	37

5.1.	La cellulose	37
5.2.	Le chitosan.....	38
5.3.	L'alginate	41
6.	Conclusion	43
Chapitre II Techniques de caractérisation et protocoles expérimentaux.....		44
1.	Techniques de caractérisation.....	44
1.1.	Microscopie électronique à balayage (MEB).....	44
1.2.	Analyse élémentaire par énergie dispersive à rayons X (EDX).....	46
1.3.	Microscope à force atomique (AFM).....	46
	Principe de fonctionnement de l'AFM	47
1.4.	Spectroscopie de photoélectrons X (XPS)	48
1.4.1.	Processus mis en jeu en XPS.....	49
1.4.2.	Dispositif expérimental.....	50
2.	Protocoles expérimentaux pour l'évaluation anti-microbienne	52
2.1.	Test antibactérien (bactéries pathogènes).....	52
2.2.	Test antimicroalgues marines.....	53
2.3.	Test antibactérien (bactéries marines).....	56
3.	Evolution du potentiel d'abandon (OCP : <i>Open Circuit Potential</i>)	58
Chapitre III Matériaux à base d'alginate testés sur des bactéries pathogènes.....		60
1.	Méthodes d'élaboration et caractérisations physico-chimiques	60
1.1.	Films d'hydrogels.....	61
1.1.1.	Méthode d'élaboration	61
1.1.2.	Microscope électronique à balayage (MEB) et analyse élémentaire par énergie dispersive aux rayons X (EDX).....	63
1.1.3.	Spectroscopie des photoélectrons X (XPS).....	65
1.2.	Films d'hydrogels poreux.....	70
1.2.1.	Méthode d'élaboration	70
1.2.2.	Microscope électronique à balayage (MEB) et analyse élémentaire par énergie dispersive aux rayons X (EDX).....	71
1.2.3.	Microscope à force atomique (AFM).....	72
1.3.	Films déposés sur aciers	74
1.3.1.	Méthode d'élaboration	74
1.3.2.	Principes chimiques du dépôt par électrophorèse de l'alginate	75

1.3.3.	Microscope électronique à balayage (MEB) et analyse élémentaire par énergie dispersive aux rayons X (EDX).....	77
1.3.4.	Spectroscopie des photoélectrons X (XPS).....	82
2.	Evaluations antibactériennes	87
2.1.	Films d'hydrogel	90
2.2.	Films d'hydrogel poreux.....	93
2.3.	Films déposés sur acier.....	98
3.	Conclusion	102
Chapitre IV Matériaux à base d'alginate antimicrobiens dans le milieu marin		103
1.	Méthode d'élaboration	103
2.	Caractérisations physico-chimiques.....	105
2.1.	Microscopie électronique à balayage et Spectroscopie à rayons X à dispersion d'énergie (MEB et EDX)	105
2.2.	Stabilité des matériaux.....	114
2.2.1.	Eau désionisée	115
2.2.2.	Eau salée (30 g/L)	120
2.2.3.	Effet de la température	125
3.	Tests antimicrobiens.....	127
3.1.	Hydrogels en volume.....	127
3.1.1.	Microalgues	127
3.1.2.	Bactéries marines	138
3.2.	Films déposés sur acier.....	143
3.2.1.	Microalgues	143
3.2.2.	Bactéries marines	146
4.	Application en système ouvert.....	148
4.1.	Etude du potentiel d'abandon.....	148
4.2.	Etude des matériaux récupérés par microscopie.....	151
5.	Conclusion	158
Conclusion générale et perspectives.....		159
Références		162

Liste des figures

<i>Figure I.1 Cycle de la formation d'un biofilm bactérien</i>	4
<i>Figure I.2 Suivi temporel du microfouling et du macrofouling dans le milieu marin [13]</i>	5
<i>Figure I.3 Schéma comparant une coupe transversale d'une bactérie de Gram+ (à gauche) à une bactérie de Gram- (à droite)</i>	6
<i>Figure I.4 Courbe présentant la croissance des bactéries</i>	8
<i>Figure I.5 Schéma de la composition d'une microalgue</i>	9
<i>Figure I.6 Clichés MEB de trois groupes majeurs de diatomées : (a), (b) Coscinodiscophyceae, (c),(d) Mediophyceae et (e), (f), (g) et (h) Bacillaryophyceae. Echelle : 30 µm (g), 10 µm (a), 5 µm (e, f, h), 3 µm (c, d), 1 µm (b) [35]</i>	10
<i>Figure I.7 Système d'UV Lenntech pour la purification d'eau utilisée dans les piscines [70]</i>	17
<i>Figure I.8 Effet de l'application d'ultrasons par l'appareil Gom'air sur le système de propulsion d'un bateau [71]</i>	18
<i>Figure I.9 Produits biostatiques commercialisés pour combattre les bactéries</i>	23
<i>Figure I.10 Effets anti-adhésif et anti-biofilm obtenus par les tests de Drago et al [74] (a) L'inhibition d'adhésion par rapport au contrôle pour les quatre souches de bactéries pathogènes en noir pour 50% de HA et en blanc pour 100% de HA, pourcentages de réduction de biofilm par rapport au contrôle ligne continue pour 100% HA et ligne pointillée pour 50% de HA pour les souches (b) S.aureus, (c) H.influenzae et (d) M.catarrhalis</i>	24
<i>Figure I.11 Application de peinture antifouling sur la coque d'un bateau</i>	25
<i>Figure I.12 Figures (E et F) présentent les zones d'inhibition contre E.coli et S.aureus pour (C) la solution d'extrait FB + DMSO, (E) la solution de DMSO en tant que contrôle négatif, NPs d'Ag et les films SHD à 24h d'incubation. Les photos (G et H) présentent les zones d'inhibition des NPs d'Ag relargués des SHD après 2, 6, 12 et 24h respectivement [5]</i>	27
<i>Figure I.13 Effet antibactérien des NPs d'Ag + cellulose pour différentes quantités de NPs au bout de 2h30 pour S.aureus [7]</i>	28
<i>Figure I.14 Zones d'inhibition créées pour S.aureus et E.coli incubés à 37°C pendant 24h pour (1) solution de chitosan contenant des NPs d'Ag, (2) solution de chitosan et (3) eau distillée [6]</i>	29

<i>Figure I.15 Résultats antibactériens de différents revêtements contre E.coli (a) Inox, (b) Revêtement de BioGlass/Alginate (1,5 g/L BG), (c) Revêtement de ZnO/Alginate et (d) Revêtement de 25-ZBA. Les zones I, II, III et IV indiquent le nombre d'heures pour lesquelles les tests ont été effectués (1, 2, 3 et 4h respectivement) [8].....</i>	<i>30</i>
<i>Figure I.16 Graphes montrant le pourcentage d'effet antibactérien en fonction du temps par trois méthodes d'analyse pour la souche de bactérie (a) E.coli et (b) S.aureus [75].....</i>	<i>33</i>
<i>Figure I.17 Effet antibactérien sur E.coli d'un hydrogel d'alginate de (a) calcium (b) zinc noté Alg6, (c) zinc noté Alg4 et (d) zinc noté Alg1 après 12h de contact [76].....</i>	<i>35</i>
<i>Figure I.18 Tests antibactériens obtenus par Malagurski et al. pour des billes d'alginate (a) minéralisées par C, (b) minéralisés par P et (c) non minéralisées [77].....</i>	<i>36</i>
<i>Figure I.19 Composition chimique d'une chaîne de cellulose</i>	<i>37</i>
<i>Figure I.20 Composition chimique du chitosan</i>	<i>39</i>
<i>Figure I.21 Taux d'inhibition bactérienne des différents matériaux contre les souches E.coli et S.aureus après incubation à 37C pendant 4h. [92].....</i>	<i>40</i>
<i>Figure I.22 Monomères de la chaîne d'alginate</i>	<i>41</i>
<i>Figure I.23 Matrice d'alginate liée aux ions divalents</i>	<i>42</i>
<i>Figure II.1 Clichés MEB obtenus d'une même zone d'un matériau d'alginate poreux pour différents grossissements obtenant des images à une échelle de (a) 200µm, (b) 50µm et (c) 10µm</i>	<i>45</i>
<i>Figure II.2 Microscope électronique à balayage présent à l'UBO</i>	<i>46</i>
<i>Figure II.3 Schéma de structure d'un microscope à force atomique</i>	<i>47</i>
<i>Figure II.4 Diagramme d'énergie en XPS, cas d'un échantillon métallique en équilibre thermodynamique avec le spectromètre</i>	<i>49</i>
<i>Figure II.5 Dispositif expérimental de spectroscopie de photoélectrons X au Lab-STICC</i>	<i>50</i>
<i>Figure II.6 Zone d'inhibition obtenue en présence d'un film d'alginate de zinc déposé sur acier pour la souche S.aureus</i>	<i>53</i>
<i>Figure II.7 Plaque de 24 puits en présence des films déposés sur acier pour une souche de microalgues après une semaine d'incubation</i>	<i>55</i>
<i>Figure II.8 Plaque de 24 puits en présence des matériaux à tester pour une souche de bactéries marines après 24h d'incubation</i>	<i>57</i>
<i>Figure II.9 Montage expérimental d'OCP monté par l'Institut de corrosion afin d'observer la montée du biofilm sur l'électrode d'Inox dans un système ouvert</i>	<i>58</i>

<i>Figure II.10 Montage expérimental montrant le contenu de chaque bac</i>	<i>59</i>
<i>Figure III.1 Schéma explicatif de la méthode d'élaboration des films d'hydrogels</i>	<i>62</i>
<i>Figure III.2 Films d'hydrogel alginate de calcium élaborés par la méthode de casting sous aspect (a) humide et (b) sec</i>	<i>63</i>
<i>Figure III.3 Clichés MEB des films d'hydrogel non poreux élaborés à base de (a) sodium, (b) calcium, (c) cuivre et (d) zinc pour une échelle de 5µm.....</i>	<i>64</i>
<i>Figure III.4 Spectres XPS de C(1s) pour les matériaux d'alginate de sodium (noir), de cuivre (bleu) et zinc (rouge).....</i>	<i>66</i>
<i>Figure III.5 Spectre XPS de O(1s) de l'alginate de sodium (noir), alginate de cuivre (bleu) et alginate de zinc (rouge).....</i>	<i>67</i>
<i>Figure III.6 Spectre XPS de Na(1s) de l'alginate de sodium (noir), alginate de cuivre (bleu) et alginate de zinc (rouge).....</i>	<i>68</i>
<i>Figure III.7 Spectre XPS de Cu(2p) de l'alginate de cuivre</i>	<i>69</i>
<i>Figure III.8 Spectres XPS de (a) Zn(2p) en fonction des énergies de liaison et (b) Auger Zn(LMM) en fonction des énergies cinétiques d'alginate de zinc</i>	<i>70</i>
<i>Figure III.9 Clichés MEB des films d'hydrogel poreux de (a) calcium, (b) cuivre et (d) zinc avec plastifiants</i>	<i>71</i>
<i>Figure III.10 Relief du film d'alginate de calcium avec plastifiants étudié à l'AFM</i>	<i>73</i>
<i>Figure III.11 Etude des pores présents dans le film d'hydrogel de calcium par AFM</i>	<i>73</i>
<i>Figure III.12 Schéma explicatif de l'élaboration des films minces déposés sur acier par électrophorèse</i>	<i>75</i>
<i>Figure III.13 Clichés MEB de la surface de l'inox non traitée (a) et traitée à l'acide phosphorique (1 mol/L) pendant 10 min après abrasion au papier abrasif</i>	<i>76</i>
<i>Figure III.14 Clichés MEB des dépôts d'acide alginique pour une différence de potentiel (a) non pulsée et (b) pulsée</i>	<i>77</i>
<i>Figure III.15 Clichés MEB de la surface de l'inox 316L</i>	<i>78</i>
<i>Figure III.16 Clichés en MEB du dépôt d'acide alginique sur inox.....</i>	<i>79</i>
<i>Figure III.17 Clichés en MEB du dépôt d'alginate de calcium sur inox.....</i>	<i>80</i>
<i>Figure III.18 Clichés MEB en vue transversale d'un revêtement décollé de l'inox</i>	<i>81</i>
<i>Figure III.19 Spectres XPS des différents matériaux étudiés.....</i>	<i>83</i>
<i>Figure III.20 Spectre XPS de Fe(2p) de l'acier 316L non revêtu</i>	<i>84</i>

<i>Figure III.21 Spectres XPS de (a) C(1s) et (b) O(1s) de l'acier 316L non revêtu (noir), le dépôt d'alginate de sodium (rouge), cuivre (vert) et zinc (bleu)</i>	85
<i>Figure III.22 Spectres XPS de (a) Na(1s), (b) Cu(2p), (c) Zn(2p) et (d) Auger Zn</i>	86
<i>Figure III.23 Quatre cas de zone d'inhibition que nous pouvons avoir lors de l'évaluation antibactérienne (a) zone d'inhibition dépassant le matériau, (b) zone d'inhibition ne dépassant pas le matériau, (c) accumulation des bactéries E.coli autour du matériau et (d) pas de zone d'inhibition</i>	89
<i>Figure III.24 Résultats des tests antibactériens effectués sur la souche E.coli en présence de films d'hydrogel d'alginate de calcium, calcium/cuivre et calcium/zinc</i>	91
<i>Figure III.25 Résultats des tests antibactériens effectués sur la souche S.aureus en présence de films d'hydrogel d'alginate de calcium, calcium/cuivre et calcium/zinc</i>	92
<i>Figure III.26 Résultats des tests antibactériens effectués sur la souche E.coli en présence de films poreux d'alginate de calcium, cuivre et zinc</i>	94
<i>Figure III.27 Résultats des tests antibactériens effectués sur la souche S.aureus en présence de films poreux d'alginate de calcium, cuivre et zinc</i>	96
<i>Figure III.28 Résultats des tests antibactériens effectués sur la souche E.coli en présence de films déposés sur acier d'alginate de calcium, cuivre et zinc</i>	99
<i>Figure III.29 Résultats des tests antibactériens effectués sur la souche S.aureus en présence d'acier non revêtu et de films déposés sur acier d'alginate de calcium, cuivre et zinc</i>	100
<i>Figure IV.1 Schéma montrant la méthode d'élaboration des hydrogels en volume par la méthode de casting</i>	104
<i>Figure IV.2 Hydrogels en volume : (a) alginate de calcium, (b) alginate de cuivre et (c) alginate de zinc</i>	104
<i>Figure IV.3 Clichés MEB des hydrogels à base d'alginate de calcium (a), de cuivre (b) et de zinc (c)</i>	106
<i>Figure IV.4 Schéma explicatif des tranches d'hydrogels coupés pour les différentes caractérisations en EDX (a) tranche de surface et (b) tranche de centre</i>	108
<i>Figure IV.5 Photo montrant le gradient de cuivre à l'œil nue dans une tranche centrale de l'hydrogel $Ca_{0,27}Cu_{0,05}$ avant séchage et les différentes positions où l'EDX a été effectué</i>	113
<i>Figure IV.6 Perte de masse des matériaux d'hydrogels $Ca_{0,36}$, $Cu_{0,1}$ et $Zn_{0,1}$ en fonction du temps pour une immersion dans l'eau désionisée</i>	115

<i>Figure IV.7 Résidus observés au fond du bécher pour l'alginate de cuivre (a) et l'alginate de zinc (b) à la fin de la période d'immersion</i>	117
<i>Figure IV.8 Clichés MEB de la surface de (a) $Ca_{0,36}$, (b) $Cu_{0,1}$ et (c) $Zn_{0,1}$ après 30 jours d'immersion dans de l'eau désionisée</i>	118
<i>Figure IV.9 Cliché MEB de la surface de $Ca_{0,36}$ à une échelle de 50 μm après 30 jours d'immersion dans l'eau désionisée</i>	119
<i>Figure IV.10 Perte de masse des matériaux d'hydrogels $Ca_{0,36}$, $Ca_{0,27}Cu_{0,05}$ et $Ca_{0,27}Zn_{0,05}$ en fonction du temps pour une immersion dans l'eau désionisée</i>	120
<i>Figure IV.11 Perte de masse des hydrogels $Ca_{0,36}$, $Cu_{0,1}$ et $Zn_{0,1}$ en fonction du temps pour une immersion dans une solution de NaCl pour une durée de 30 jours</i>	121
<i>Figure IV.12 Clichés MEB de la surface des matériaux de $Ca_{0,36}$, $Cu_{0,1}$ et $Zn_{0,1}$ après 30 jours d'immersion dans de l'eau salée</i>	123
<i>Figure IV.13 Schéma représentant le découpage des morceaux d'hydrogels utilisés pour cette expérience</i>	124
<i>Figure IV.14 Evolution de masse des hydrogels $Ca_{0,36}$, $Cu_{0,1}$ et $Zn_{0,1}$ en fonction du temps pour une durée de 5 jours à 37 °C</i>	126
<i>Figure IV.15 Plaque de 24 puits contenant 6 répliques de chaque matériau</i>	128
<i>Figure IV.16 Pourcentage d'inhibition de croissance et d'adhésion de la souche de microalgue <i>Halamphora coffeaeformis</i> pour les hydrogels $Ca_{0,36}$, $Cu_{0,1}$ et $Zn_{0,1}$</i>	129
<i>Figure IV.17 Densité optique de la souche de microalgues <i>Halamphora coffeaeformis</i> en présence de différents matériaux</i>	132
<i>Figure IV.18 Pourcentage d'inhibition de croissance et d'adhésion en présence des matériaux $Ca_{0,27}Cu_{0,05}$, $Ca_{0,32}Cu_{0,005}$, $Ca_{0,36}Cu_{0,0005}$, $Ca_{0,27}Zn_{0,05}$, $Ca_{0,32}Zn_{0,005}$ et $Ca_{0,36}Zn_{0,0005}$ pour la souche de microalgues <i>Halamphora coffeaeformis</i></i>	134
<i>Figure IV.19 Pourcentage d'inhibition de croissance et d'adhésion en présence des matériaux $Ca_{0,27}Cu_{0,05}$, $Ca_{0,32}Cu_{0,005}$, $Ca_{0,36}Cu_{0,0005}$, $Ca_{0,27}Zn_{0,05}$, $Ca_{0,32}Zn_{0,005}$ et $Ca_{0,36}Zn_{0,0005}$ pour la souche de microalgues <i>Cylindrotheca closterium</i></i>	136
<i>Figure IV.20 Pourcentages d'inhibition de croissance (bleu) et d'adhésion (rouge) contre les 4 souches de bactéries <i>Halomonas aquamarina</i> (HA), <i>Vibrio aesturianus</i> (VA), <i>Vibrio harveyi</i> (VH) et <i>Pseudoalteromonas elyakovii</i> (PE)</i>	139

<i>Figure IV.21 Pourcentages d'inhibition de croissance (bleu) et d'adhésion (rouge) pour les 4 souches de bactéries marines Halomonas aquamarina, Vibrio aesturianus, Vibrio haveyi et Pseudoalteromonas elyakovii en présence des matériaux à base de cuivre</i>	140
<i>Figure IV.22 Pourcentages d'inhibition de croissance (bleu) et d'adhésion (rouge) pour les 4 souches de bactéries marines Halomonas aquamarina, Vibrio aesturianus, Vibrio haveyi et Pseudoalteromonas elyakovii en présence de matériaux à base de zinc</i>	142
<i>Figure IV.23 Pourcentage d'inhibition de croissance et d'adhésion de la souche de microalgues Halamphora coffeaeformis pour les dépôts sur acier de $Ca_{0,36}$, $Ca_{0,27}Cu_{0,05}$ et $Ca_{0,27}Zn_{0,05}$</i>	144
<i>Figure IV.24 Pourcentage d'inhibition de croissance et d'adhésion de la souche de microalgues Cylindrotheca closterium pour les dépôts sur acier de $Ca_{0,36}$, $Ca_{0,27}Cu_{0,05}$ et $Ca_{0,27}Zn_{0,05}$.....</i>	145
<i>Figure IV.25 Evaluation de la croissance et e l'adhésion de 4 souches de bactéries marines Halomonas aquamarina, Vibrio aesturianus, Vibrio harveyi et Pseudoalteromonas elyakovii en présence des films déposés sur acier $Ca_{0,36}$, $Ca_{0,27}Cu_{0,05}$ et $Ca_{0,27}Zn_{0,05}$.....</i>	147
<i>Figure IV.26 Cubes d'hydrogel $Zn_{0,1}$ et $Cu_{0,1}$ utilisés lors de la première expérience.....</i>	149
<i>Figure IV.27 Différence de potentiel en fonction du temps pendant 30 jours comparant le bac de référence, le bac contenant le matériau $Zn_{0,1}$ et celui contenant le $Ca_{0,27}Zn_{0,05}$</i>	150
<i>Figure IV.28 Clichés MEB de l'électrode d'Inox 2205 présente dans le bac témoin en absence de matériaux.....</i>	152
<i>Figure IV.29 Clichés MEB de l'électrode d'Inox 2205 présente dans le bac contenant les hydrogels $Zn_{0,1}$</i>	153
<i>Figure IV.30 Clichés MEB de l'électrode d'Inox 2205 présente dans le bac contenant les 4 cubes d'hydrogel $Ca_{0,27}Zn_{0,05}$</i>	155
<i>Figure IV.31 Cubes d'hydrogels $Zn_{0,1}$ et $Ca_{0,27}Zn_{0,05}$ avant et après immersion de 30 jours dans l'eau de mer naturelle</i>	156

Liste des tableaux

<i>Tableau I.1 Domaines concernés par le biofouling et problèmes engendrés [40]</i>	11
<i>Tableau I.2 Facteurs influençant l'adhésion initiale d'un microorganisme sur une surface solide immergée [44]</i>	13
<i>Tableau I.3 Résultats des tests antibactériens des fibres d'alginate à base de cuivre ou à base de zinc dans des conditions optimales [3]</i>	34
<i>Tableau I.4 Résultats antibactériens des zones d'inhibition (mm) de croissance des matériaux élaborés par Capanema et al. [90]</i>	38
<i>Tableau II.1 Caractéristiques de la source X d'aluminium</i>	51
<i>Tableau II.2 Composition du milieu de culture préparé f/2 pour microalgues marines</i>	54
<i>Tableau III.1 Tableau de composition atomique des films d'hydrogel à base de sodium, calcium, cuivre et zinc</i>	65
<i>Tableau III.2 Composition chimique de l'inox 316L utilisé</i>	78
<i>Tableau III.3 Composition chimique des dépôts d'acide alginique, d'alginate de calcium, cuivre et zinc sur l'acier inoxydable 316L</i>	81
<i>Tableau III.4 Récapitulatif des résultats de l'évaluation antibactérienne sur les souches E.coli et S.aureus en présence des films d'hydrogel et des film d'hydrogel poreux (0 pas de zone d'inhibition et + accumulation des bactéries autour du matériau)</i>	97
<i>Tableau III.5 Récapitulatif des résultats de l'évaluation antibactérienne sur les souches E.coli et S.aureus en présence des films déposés sur acier (+ accumulation des bactéries autour du matériau)</i>	101
<i>Tableau IV.1 Composition atomique (%) des différentes hydrogels (a) $Ca_{0,36}$, (b) $Cu_{0,1}$ et (c) $Zn_{0,1}$</i>	107
<i>Tableau IV.2 Tableau de composition atomique des différentes tranches de l'hydrogel $Ca_{0,27}Cu_{0,05}$</i>	108
<i>Tableau IV.3 Tableau de composition atomique des différentes tranches de l'hydrogel $Ca_{0,27}Zn_{0,05}$</i>	109
<i>Tableau IV.4 Tableau de composition atomique des tranches de centre rincées des hydrogels $Cu_{0,05}$ et $Ca_{0,27}Cu_{0,05}$</i>	110

<i>Tableau IV.5 Tableau de composition atomique des tranches de centre rincées des hydrogels $Zn_{0,05}$ et $Ca_{0,27}Zn_{0,05}$.....</i>	111
<i>Tableau IV.6 Tableau de composition atomique des tranches de centre rincées et des tranches de surface rincées de l'hydrogel $Ca_{0,27}Cu_{0,05}$.....</i>	111
<i>Tableau IV.7 Pourcentages des différents éléments présents dans les différentes tranches d'hydrogels d'alginate calcium/zinc.....</i>	112
<i>Tableau IV.8 Tableau montrant le pourcentage de chaque élément pour différentes positions sur la même tranche d'hydrogel</i>	113
<i>Tableau IV.9 Pourcentages des différents éléments présents dans les hydrogels $Ca_{0,36}$, $Cu_{0,1}$ et $Zn_{0,1}$ après immersion dans l'eau salée pendant 30 jours</i>	123
<i>Tableau IV.10 Tableau présentant la masse de chaque morceau d'hydrogel (g) après un temps d'immersion $t(h)$</i>	124
<i>Tableau IV.11 Nomenclature des matériaux utilisés pour les tests antimicrobiens</i>	131
<i>Tableau IV.12 Comparaison de la masse des hydrogels $Zn_{0,1}$ et $Ca_{0,27}Zn_{0,05}$ à t_0 et au bout de 30 jours d'immersion dans l'eau de mer naturelle ainsi que le taux de masse restant de chacun....</i>	157

Liste des abréviations

MEB : Microscopie Electronique à Balayage

CIM : Corrosion Influencée par Microorganismes

OCP : Open Circuit Potential

SCE : Saturated Calomel Electrode

ROS: Reactive Oxygen Species

AOP: Advanced Oxidation Process

TBT: Tributyltin

NPs: Nanoparticules

PVA_l: PolyVinylAlcool

FB : Ficus Benghlensis

nZnO : nanoparticules d'oxyde de zinc

FC : Flow Cytometry

PBS : Phosphate Buffer Solution

CFU: Colony Forming Unit

EDX: Energy Dispersive X-ray spectroscopy

AFM: Atomic Force Microscopy

STM: Scanning Tunneling Microscope

XPS: X-ray Photoelectron Spectroscopy

CMA: Cylindric Mirror Analyser

TSA: Tryptic Soy Agar

DO : Densité Optique

SR : Surface rincée

SNR : Surface Non Rincée

CR : Centre Rincée

CNR : Centre Non Rincée

HA : *Halomonos aquamarina*

VA : *Vibrio aesturianus*

VH : *Vibrio harveyi*

PE : *Pseudoalteromonas elyakovii*

EPS : Extracellular Polymeric Substance

Introduction générale

Le biofilm est constitué d'une biomasse microbienne englobée dans une matrice extracellulaire riche en eau, en sucre et en protéines nommée EPS. Les EPS sont des polymères naturels de masse moléculaire importante secrétés par les microorganismes dans leur environnement. Le biofilm permet aux bactéries de se protéger des agressions chimiques ou mécaniques extérieures. Dans l'environnement aquatique, le substrat immergé est enclin à être colonisé initialement par des bactéries créant des points d'ancrage pour d'autres micro-organismes, puis les larves et ensuite les macroorganismes suivant le degré de maturation du biofilm.

Les biofilms peuvent être nuisibles à la santé de l'homme, la santé des animaux ainsi qu'au domaine industriel [1]. La formation de biofilms cause une bio-détérioration de la surface sur laquelle ils se forment. Ils impliquent souvent des bactéries pathogènes telles que *Staphylococcus epidermidis*, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli* ou *Listeria monocytogenes*. Dans le milieu marin, le processus de colonisation d'une surface est appelé le « biofouling » [2].

La majorité des études menées pour lutter contre la formation de biofilms s'intéressent principalement au domaine médical. Les plus récentes sont basées sur l'élaboration de matériaux dont la matrice est biosourcée (alginate, chitosan ou même cellulose) incluant des agents antibactériens tels que le cuivre [3] sous ses différentes formes ainsi que des nanoparticules (NPs) d'Ag ou de ZnO [4–8]. Les NPs d'Ag ou de ZnO sont les plus utilisées et font partie des NPs instables. Leur instabilité fait qu'elles sont considérées comme des réservoirs relargant en continu et sans contrôle des ions. Les NPs génèrent aussi des ROS (*Reactive oxygen species*) qui sont toxiques pour tous les organismes environnementaux qu'ils soient ciblés ou non. Leur instabilité ainsi que leur accumulation les rendent toxiques pour les organismes unicellulaires. Les effets toxiques des NPs sur les microorganismes a été étudié extensivement lors des quelques dernières années [9–12].

Par contre, dans le milieu marin, nous trouvons des solutions commercialisées utilisées dans le but de prévenir la formation du biofouling telles que des peintures antifouling incluant des biocides. Elles ont été utilisées extensivement dans le passé [13,14,16] mais sont actuellement

Introduction générale

interdites à cause de leur haute toxicité sur les organismes marins non ciblés [16]. Le cuivre, sous sa forme d'oxyde ou métallique, seul ou avec d'autres biocides a été intégré dans ces peintures menant à la pollution de l'eau de mer, particulièrement dans les marinas [14]. Daehne *et al.* en 2016 [14] ont montré que de grandes concentrations de cuivre ou de produits biocides, utilisés pour la lutte contre le biofouling, sont présentes dans l'eau des marinas sur plusieurs sites en Allemagne. En Suède, des restrictions et interdictions régionales sur l'utilisation de produits antifouling à base de cuivre sont importantes pour réduire l'application et l'émission de substances actives de biocides. Des lois concernant la diminution de la quantité de cuivre dans les produits antifouling ont été prévues, aux Etats Unis, la quantité de cuivre permise ne doit pas dépasser 0,5% [17]. En Europe, la valeur limite à ne pas dépasser pour le cuivre est de 50 à 140 mg/Kg et de 150 à 300 mg/Kg pour le zinc.

Lors de la formation du biofilm, l'étape d'adhésion des organismes semble être déterminante. Il est primordial d'empêcher l'adhésion des organismes, considérés pionniers dans la formation de biofilms, sur les surfaces afin de les protéger. Dans ce contexte, nous avons décidé d'élaborer des matériaux dont l'objectif est d'inhiber l'adhésion des organismes aux surfaces. Pour ce faire, nous avons choisi l'alginate de sodium en tant que matrice de base. L'alginate ou acide alginique est extrait des algues brunes ; il est biocompatible, biosourcé, peu coûteux et très abondant. Sous sa forme d'alginate de sodium, il est soluble dans l'eau. L'ajout d'ions divalents tels que le Ca^{2+} , Cu^{2+} , Mg^{2+} , Zn^{2+} ... le rend insoluble. Durant cette étude, la matrice d'alginate sera couplée avec des ions de cuivre ou de zinc connus pour leurs propriétés antimicrobiennes. L'effet antimicrobien des matériaux élaborés à base de zinc sera comparé à ceux à base de cuivre.

Ce manuscrit est composé de quatre chapitres. Le premier chapitre dresse un état de l'art des domaines affectés par la formation de biofilms ainsi que des solutions commercialisées de lutte contre les biofilms. Il détaillera les différents matériaux antibactériens élaborés pour des applications médicales ainsi que les agents antibactériens pouvant être insérés dans des matrices biosourcées tels que le chitosan, le cellulose et l'alginate.

Le second chapitre est dédié aux techniques expérimentales de caractérisation physico-chimiques utilisées lors de notre étude afin de déterminer les propriétés physiques et chimiques des différents matériaux élaborés à base d'alginate. Ceci est suivi par une description des protocoles

Introduction générale

expérimentaux utilisés pour évaluer la croissance et l'adhésion des bactéries et des microalgues en présence de nos matériaux.

Le troisième chapitre présente les films d'alginate utilisés pour des applications médicales. Des films d'alginate de taille centimétrique sont élaborés par la méthode de casting alors que des films minces d'ordre micrométriques recouvrant de l'acier inoxydable sont obtenus par la méthode de déposition par électrophorèse. La surface des films d'alginate est étudiée ainsi que leur composition chimique. Des tests antibactériens ont été effectués sur des souches de bactéries modèles : *E.coli* (Gram-) et *S.aureus* (Gram+) en présence de ces différents films. Pour le milieu marin, milieu relativement plus agressif, des matériaux plus volumineux sont élaborés et testés dans le but de supporter les contraintes environnementales de ce milieu.

Le quatrième chapitre est consacré à l'étude en milieu salin des hydrogels en volume de forme cubique. La surface de ces matériaux, leur composition chimique, l'homogénéité et leur dégradation sont étudiées. Ces matériaux sont ensuite testés sur des souches de microalgues et de bactéries marines dans le but d'étudier leur effet sur la croissance de ces microorganismes mais surtout sur leur adhésion sur une surface.

Dans une dernière partie, une étude en eau de mer naturelle filtrée est entreprise, simulant une situation réelle d'application, dans le but de déterminer la capacité des matériaux élaborés à lutter contre la formation de biofilms marins en présence d'une multitude de microorganismes et non seulement ceux testés en laboratoire. Cette étude permet de suivre en temps réel la différence de potentiel entre des électrodes plongées dans l'eau de mer naturelle. Cette différence de potentiel sera indicatrice de l'évolution de l'électrode induite par les microorganismes présents dans le milieu.

Chapitre I Etat de l'art

Le biofouling (ou encrassement biologique) est l'accumulation de microorganismes, bactéries, algues, animaux ou plantes sur des surfaces immergées ou en contact périodiquement avec l'eau. Les différents organismes responsables de l'encrassement, suivant leur dimension, peuvent être divisés en micro-organismes (dépôt gluant, micro-fouling) et macro-fouling [18]. Dans le domaine médical, l'état de la surface est altéré instantanément par l'adsorption de macromolécules. La formation du biofilm s'effectue par le transport de bactéries vers le substrat. Une fois sur le substrat, les bactéries adhèrent la surface par des récepteurs non spécifiques et/ou spécifique : mécanismes d'adhésion via les ligands [19]. Au bout de quelques minutes, elles secrètent des polymères extracellulaires. Les biofilms se développent alors en absorbant des nutriments solubles et en recrutant par des signaux moléculaires d'autres espèces bactériennes ou de cellules mammifères telles que les plaquettes [20]. La Figure I.1 présente le cycle de la formation d'un biofilm bactérien qui est répétitif et considéré comme cycle fermé puisque les bactéries dispersées dans le milieu migrent vers d'autres surfaces afin de les coloniser.

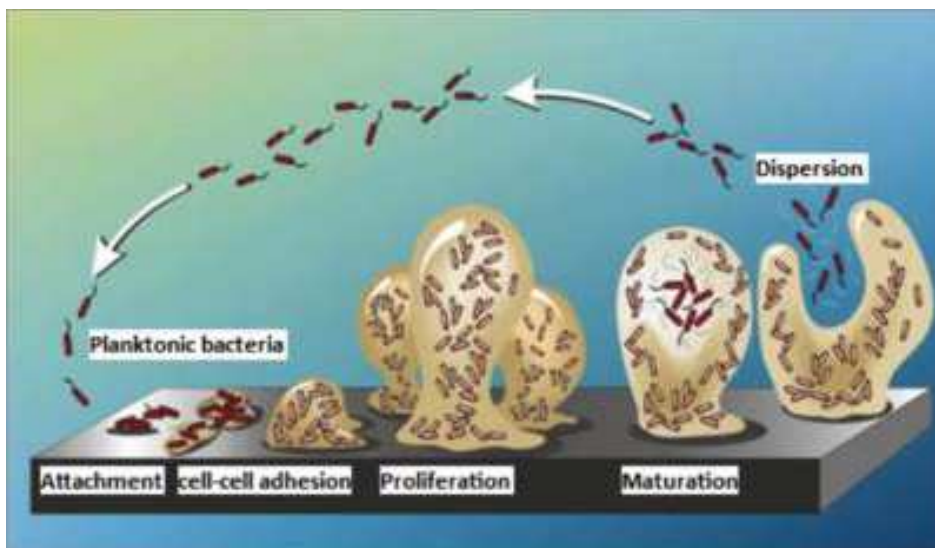


Figure I.1 Cycle de la formation d'un biofilm bactérien

Etat de l'art

Dans le milieu marin, la formation du biofilm débute par l'adhésion de particules organiques telles que les polysaccharides, les protéines, les lipides et les acides nucléides à la surface en contact avec le milieu, ce mécanisme nécessitant quelques minutes [21]. De 1h à une semaine, la colonisation de bactéries (*Pseudomonas putrefaciens*, *Vibrio alginolyticus*) et diatomées ou microalgues (*Achnantes brevipes*, *Amphiprora paludosa*, *Amphora coffeaeformis*, *Licmophora abbreviata*, *Nitzschia pusilla*) se produit simultanément ou successivement suivant les conditions environnementales. C'est à partir de ce moment que le microfouling peut débuter : il s'agit de la colonisation par des macroalgues (*Enteromorpha intestinalis*, *Ulothrix zonota*) et des protozoaires (*Vaginicola sp.*, *Vorticella sp.*, *Zoolhamnium sp.*), ce phénomène apparaît après une semaine d'immersion. A partir de 2-3 semaines, une colonisation tertiaire de larves des macrofoulers (*Balanus amphirite*, *Electra crustulenta*, *Laomedea flexuosa*, *Mytilus edulis*, *Spirorbis borealis*, *Styela coriacea*) est observée [13]. L'adhésion et la croissance de ces différents organismes sont suivies par la dispersion des bactéries dans le milieu environnant. La Figure I.2 présente un suivi temporel de la formation de biofilm.

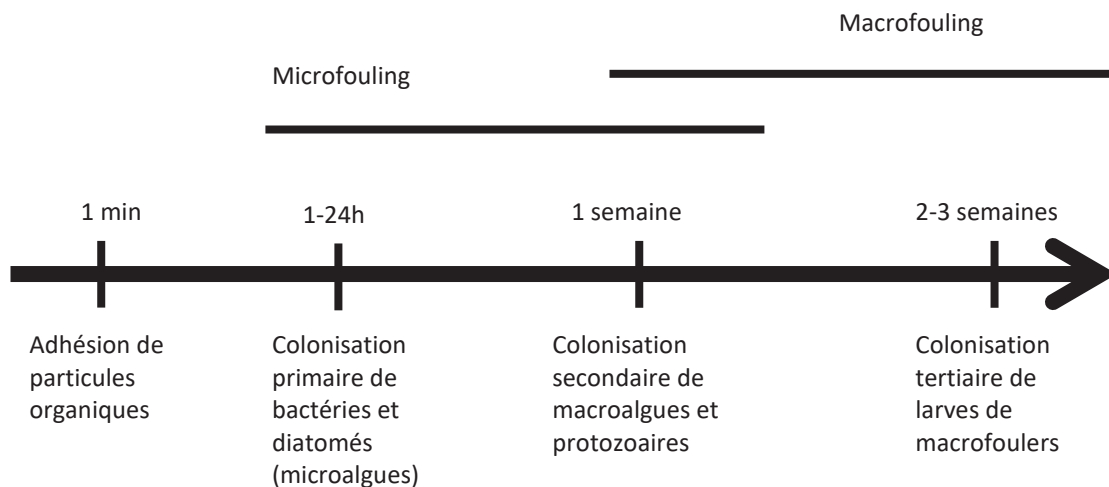


Figure I.2 Suivi temporel du microfouling et du macrofouling dans le milieu marin [13]

1. Définition des biofilms

Comme nous l'avons présenté, le phénomène de formation des biofilms dépend de l'adhésion et la croissance de bactéries et des microalgues. Ces organismes vont être détaillés dans les paragraphes qui suivent.

1.1. Les bactéries

Les bactéries sont des organismes vivants microscopiques présents dans tous les milieux : alimentaire, médical, industriel, domestique, marin... Deux catégories de bactéries peuvent être distinguées : les Gram- et les Gram+. La différence entre les Gram- et Gram+ se situe au niveau de la paroi. Les bactéries de Gram+ possèdent une couche dite peptidoglycane qui est beaucoup plus épaisse (20 à 80 nm) que celle des Gram- (7 à 8 nm). Les bactéries de Gram- possèdent quant à elles une membrane extérieure enveloppant un espace périplasmique incluant la couche peptidoglycane. La Figure I.3 compare une coupe transversale d'une bactérie de Gram+ à gauche et une bactérie de Gram- à droite.

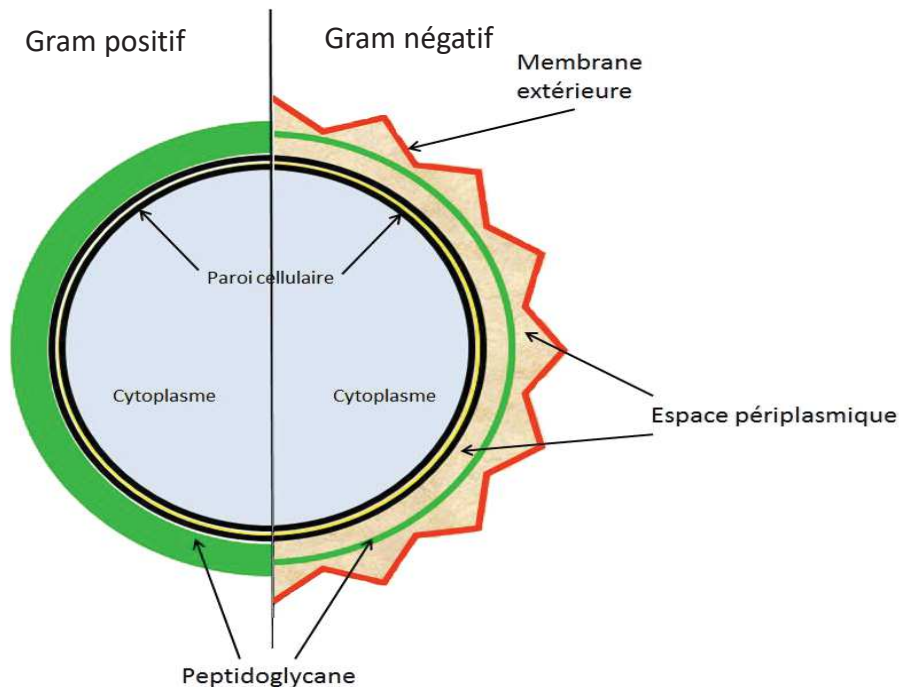


Figure I.3 Schéma comparant une coupe transversale d'une bactérie de Gram+ (à gauche) à une bactérie de Gram- (à droite)

Dans le milieu médical, les bactéries sont adaptées à une température de 37°C (température du corps humain). Les bactéries modèles de Gram- et Gram+ sont :

Etat de l'art

E.coli est l'organisme infectant prédominant de la famille des bactéries pathogènes de Gram négatif. Cette bactérie est présente dans l'environnement, la nourriture et les intestins d'humains et d'animaux. Quelques souches d'*E.coli* peuvent causer des diarrhées mais aussi des infections urinaires, des maladies respiratoires, pneumonie et d'autres maladies...[24,25].

S.aureus est une bactérie de Gram positif ayant une forme sphérique. Elle est le plus fréquemment présente dans le nez, les voies respiratoires et sur la peau. Elle peut croître sans oxygène et peut causer des infections de la peau y compris les abcès, des infections respiratoires telles que la sinusite et des intoxications alimentaires [26,27].

Alors que dans le milieu marin, les bactéries présentent un taux de croissance optimal pour des températures entre -2°C à 25°C [26]. Les bactéries marines sont majoritairement de Gram-. Quelques bactéries marines néfastes et causant la formation de biofilms sont présentées ci-dessous :

Halomonas aquamarina est une bactérie marine. Elle croît dans des eaux salées de concentration de NaCl allant de 5 à 25%. Elle a la capacité de croître à différents températures et pH [27].

La *Vibrio aesturianus* est une bactérie causant des maladies dans les huîtres adultes en France depuis 2001. Depuis 2011, l'augmentation récente de la mortalité des huîtres âgées est probablement liée à cette souche de bactéries et cause une préoccupation majeure dans l'aquaculture. Elle a été par conséquent isolée en France, Irlande et en Ecosse [29–31].

Vibrio harveyi est une bactérie marine bioluminescente affectant l'élevage commercial des crevettes. Elle ne croît pour des températures inférieures à 4°C. Cette souche est trouvée dans les eaux tropicales [31].

Finalement, la *Pseudoalteromonas elyakovii* a été isolée des moules *Crenomytilus grayanus* dans la baie de Troitsa en 1985 [32].

La courbe de croissance typique des bactéries est présentée à la Figure I.4. La durée de chaque phase représentée varie suivant le type de bactérie. La première phase est lente, elle est appelée phase de latence. Elle est suivie par une phase de croissance où les bactéries croissent le plus rapidement. Ensuite, se produit une phase stationnaire (phase où les bactéries atteignent un nombre

de cellules maximum). La dernière phase est la phase de décroissance pour lesquelles les bactéries commencent à mourir à cause d'un manque de nourriture dans un milieu fermé.

Cette dernière phase se produit après 48h pour la plupart des bactéries. Il est alors important, lors de tests antibactériens, de mesurer la concentration bactérienne durant la phase maximale stationnaire où le nombre de bactéries est stable.

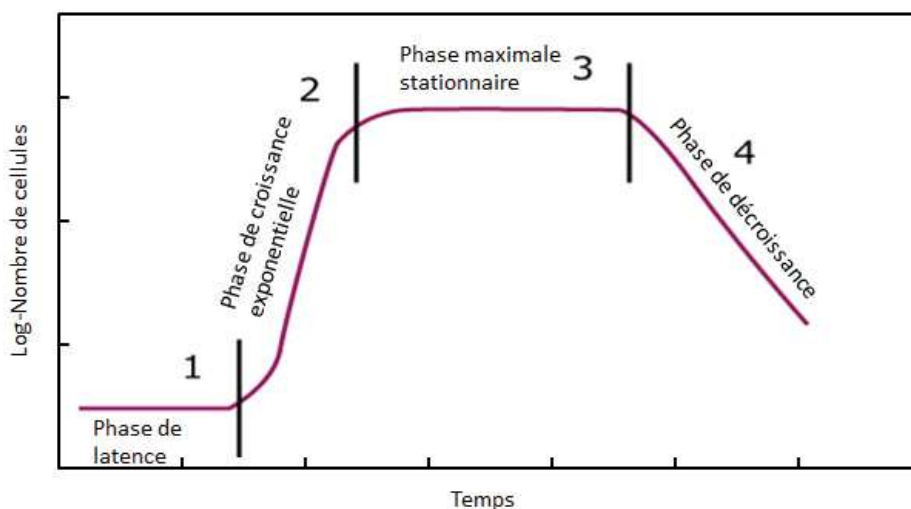


Figure 1.4 Courbe présentant la croissance des bactéries

1.2. Les microalgues

Dans le domaine marin, l'adhésion et la croissance des bactéries est suivie par l'adhésion et la croissance des microalgues. Les bactéries et les microalgues interagissent entre elles afin de former un biofilm résistant.

Etat de l'art

Ces algues microscopiques, de dimension allant de 2 à 50 μm , sont présentes dans l'environnement. Il existe plus de 100 000 espèces de microalgues. Ces dernières sont eucaryotes puisque leur cellule contient un noyau renfermant son matériel génétique. Les microalgues sont des organismes photosynthétiques, elles utilisent le CO_2 du milieu pour leur métabolisme [33]. Elles consomment des nutriments comme les nitrates, le phosphate, ... Les microalgues sont composées de lipides sous forme de triglycérides [34]. Une microalgue est délimitée par une membrane plasmique et contient au sein de son cytoplasme les chloroplastes, les amyloplastes, les oléoplastes, les mitochondries et son noyau entouré de son enveloppe comme le montre la Figure I.5.

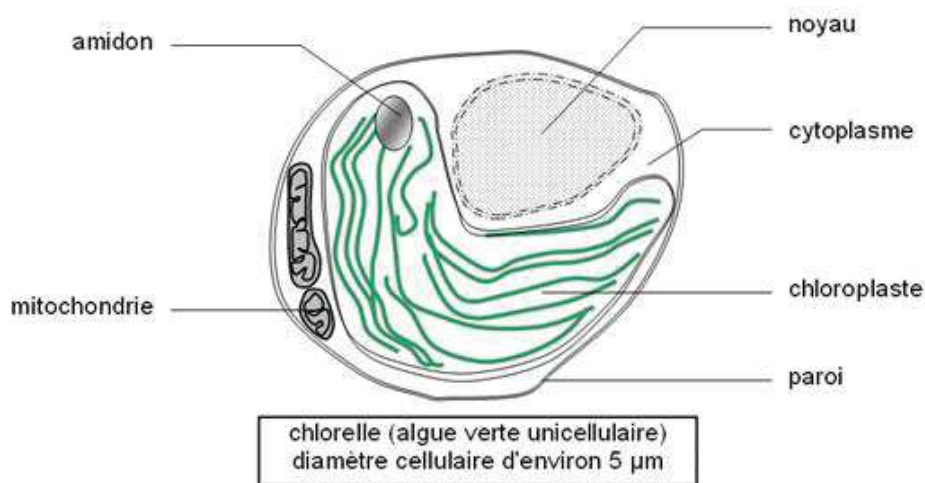


Figure I.5 Schéma de la composition d'une microalgue

Les microalgues sont caractérisées par leur croissance rapide par division cellulaire (mitose) si les conditions physico-chimiques et nutritives sont favorables. La Figure I.6 présentent une vue microscopique de quelques groupes de diatomées.

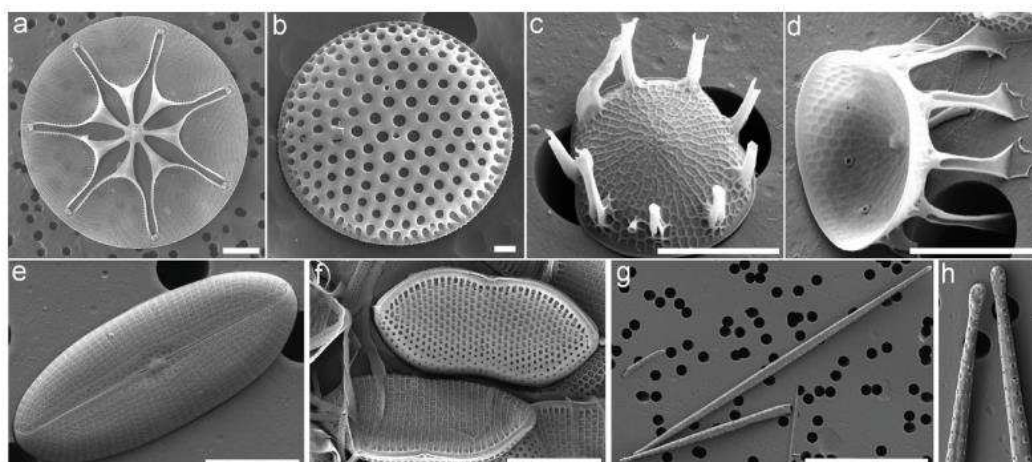


Figure 1.6 Clichés MEB de trois groupes majeurs de diatomées : (a), (b) *Coscinodiscophyceae*, (c),(d) *Mediophyceae* et (e), (f), (g) et (h) *Bacillariophyceae*. Echelle : 30 μm (g), 10 μm (a), 5 μm (e, f, h), 3 μm (c, d), 1 μm (b) [35]

Les microalgues sont utilisées dans divers pays industrialisés en tant que compléments alimentaires pour lutter contre les carences alimentaires des poissons dans l'aquaculture. Les microalgues sont considérées comme la base de la chaîne alimentaire de l'homme. Les microalgues peuvent aussi être utilisées dans le domaine de l'énergie renouvelable (production d'hydrogène) [36], en tant que biocarburants [37], dans le traitement des eaux usées [38] (conversion de la biomasse en biogaz), dans le domaine pharmaceutique, nutraceutique (tout produit fabriqué à partir de substance alimentaire rendu disponible sous forme de comprimé, poudre, potions ou d'autres formes médicinales), cosmétique et de la santé animale (pour la production de protéines recombinantes) [39].

1.3. Le biofouling

Bixler *et al.* en 2012 [40] ont répertorié les domaines touchés par le biofouling ainsi que les problèmes qu'il engendre (Tableau I.1).

Etat de l'art

Tableau I.1 Domaines concernés par le biofouling et problèmes engendrés [40]

	Type	Problèmes
Médical	Implants orthopédiques	Retrait dû aux infections
	Respirateur	Pneumonie associée au ventilateur
	Lentilles de contact	Infection oculaire
	Cathéter	Infections urinaires
	Hémodialyse	Eclosion infectieuses
	Dents / implants dentaires	Maladies périodonties, gingivite
	Biocapteurs	Défaillances provenant de l'encapsulation fibreuse
Marin	Coque de bateaux	Augmentation de la consommation de carburant
	Moteur de bateau	Augmentation d'effort dû à la traînée supplémentaire
	Plateforme marine	Augmentation de la structure marine Charge/ effort / fatigue
	Métal	Biocorrosion et biodétérioration
Industriel	Membrane	Diminution du flux
	Echangeur de chaleur	Diminution de l'efficacité de convection
	Ecoulement des fluides	Perte frictionnelle dans les tuyaux
	Eau potable	Pathogènes dans l'eau potable
	Carburant	Contamination carburant/diesel
	Nourriture, papiers et peintures	Détérioration de nourriture et risques pour la santé des travailleurs
	Fluides pour coupure de métaux	Blocage de filtres et risques pour la santé des travailleurs

Etat de l'art

Dans le milieu médical, 45% des infections contractées dans les hôpitaux sont imputables à des outils médicaux infectés par des biofilms. Des statistiques montrent que 10% des patients des hôpitaux vont contracter une infection provenant des implants cliniques, tels que les cathéters urétraux, tubes trachéales ou cathéters vasculaires, avec plus de 5000 décès annuels dus aux infections aux Etats Unis [41]. Des recherches ont montré que 9% des patients utilisant un respirateur en 1998 ont contracté une pneumonie associée au biofilm développé sur le respirateur. Cette dernière augmente le coût du séjour hospitalier de 40 000 \$, ce qui fait qu'elle est considérée comme l'infection nosocomiale la plus coûteuse dans les hôpitaux aux Etats Unis [42]. De plus, environ 8% des implants orthopédiques conduisent à des complications dues aux biofilms [43].

Le développement du biofilm sur la surface dépend de l'adhésion des microorganismes à la surface des métaux qui est influencé par différents facteurs Tableau I.2.

Etat de l'art

Tableau I.2 Facteurs influençant l'adhésion initiale d'un microorganisme sur une surface solide immergée [44]

Facteurs	Propriété/caractéristique	Influence sur l'adhésion
Facteurs liés au microorganisme	Hydrophobicité	Augmentation sur supports hydrophobes
	Concentration	Augmentation avec la concentration
	Espèce	Dépend de l'espèce
	Phase de croissance	Généralement plus marquée en phase stationnaire
Facteurs liés au support	Rugosité	Variable
	Hydrophobicité	Augmente quand la bactérie est hydrophobe
	Nature et charge du support	Microorganisme dépendante
Facteurs environnementaux	Temps de contact	Augmente
	Température du fluide	Dépend de l'espèce
	Force ionique du fluide	Espèce dépendante (une force ionique élevée diminue les répulsions électrostatiques)
	pH du fluide	Espèce dépendante
	Contamination par l'atmosphère	Variable (présence de carbone à la surface du support)
	Présence de macromolécules dans le fluide	Variable (adsorption des macromolécules sur le support et changement de ses propriétés de surface)

2. Effet du biofilm sur les aciers inoxydables en eau de mer

Les aciers inoxydables sont des alliages composés de plus de 10,5% de chrome. Cependant, malgré leur caractère d'inoxidabilité, les aciers inox ne sont pas totalement immunisés contre la corrosion [45]. A l'interface acier/biofilm, le développement bactérien induit une modification électrochimique de l'acier qui indique une évolution des propriétés de surface [46].

2.1. Corrosion influencée par microorganismes des aciers inoxydables

La présence importante de chrome dans les aciers inoxydables permet la formation d'une couche d'oxyde de chrome protectrice appelée couche passive (ou film passif) d'une épaisseur généralement comprise entre 1 et 10 nm. Lors de la rupture du film passif protecteur, les aciers inoxydables exposés à l'eau de mer sont sujets à de la corrosion. Ce processus est influencé par la présence de microorganismes sur la surface [45].

La CIM (Corrosion Influencée par les Microorganismes) est provoquée par les bactéries anaérobies qui sont des bactéries n'ayant pas besoin d'oxygène pour vivre. Le Bozec *et al.* en 2000 [45] proposent différents mécanismes pouvant expliquer les processus intervenant dans la CIM :

- Modification au niveau de la concentration de l'oxygène dissous, des cations métalliques et du pH
- Production de métabolites agressifs par les micro-organismes : acides organiques ou inorganiques

Par contre, ces mécanismes ne sont pas entièrement connus. Liao *et al.* en 2010 [47] confirment que le métabolisme des microorganismes, enfermés dans le biofilm, induit des changements locaux physico-chimiques à l'interface entre les métaux et le biofilm qui par conséquent, a une grande influence sur le processus de corrosion des métaux.

En 2013, Ntienoue *et al.* [44] ont étudié que les procaryotes associés aux processus de CIM des aciers sont impliqués dans les cycles du soufre et du fer. La réduction du sulfate et des formes oxydés intermédiaires du soufre conduit à deux résultats : la génération d'ions sulfure nécessaires

à l'anabolisme et la production d'énergie. Alors que le fer est l'un des éléments essentiels à la plupart des organismes : il joue un rôle vital dans de nombreux processus biologiques tels que la photosynthèse, la fixation de l'azote, le transport de l'oxygène ou même la synthèse d'ADN [44].

2.2. Suivi de la formation de biofilms par l'évolution du potentiel de corrosion ou potentiel d'abandon

Le potentiel d'abandon ou potentiel de corrosion (*Open Circuit Potential, OCP*) caractérise un métal en équilibre avec un milieu donné : il s'agit de la différence de potentiel entre la surface choisie (acier inoxydable par exemple) et une électrode de référence (SCE) dans un milieu électrolyte. Cette grandeur peut être utilisée dans le suivi de l'évolution et de l'évaluation des risques de corrosion des matériaux métalliques tels que les aciers inoxydables [44]. Les études relatives à l'évolution du potentiel d'abandon des aciers inoxydables en eau de mer naturelle sont très nombreuses [45–55]. La valeur initiale de l'OCP de l'acier inoxydable par rapport à une électrode de référence Ag|AgCl est d'environ -200 mV. Une augmentation du potentiel a été mesurée. Cette dernière est supérieure à celle observée lors de la formation de la couche de passivation. Il est admis que cette augmentation se produit lorsque les aciers inoxydables sont immergés dans de l'eau de mer naturelle circulante [45]. Afin d'établir un lien entre cette augmentation et la formation de biofilm, des expériences ont été effectuées en eau de mer artificielle, en eau de mer naturelle filtrée, en eau douce ainsi qu'en eau saumâtre. Des hypothèses sur l'augmentation du potentiel d'abandon des aciers ont été proposées. Elle pourrait résulter d'une augmentation de la vitesse de la réaction cathodique ou de la formation de nouveaux oxydants produits par les biofilms [47]. Dans l'eau de mer naturelle, le peroxyde d'hydrogène est souvent trouvé dans les biofilms. Et ce nouvel oxydant favorise l'anoblissement [46,47].

Les valeurs d'OCP en début d'immersion par rapport à l'électrode de référence sont négatives et une augmentation claire est observée pour plusieurs types d'acier inoxydables [54]. Huttunen-Saarivirta *et al* en 2018 [54] ont comparé l'OCP pour six aciers inoxydables : 304L, 316L, 444, 316 Plus, LDX2101 et 254 SMO dans des eaux saumâtres. Des valeurs d'OCP allant de 0,2 à 0,45 V/ECS sont généralement mesurées en milieu naturel au bout de 60 jours d'immersion. La différence des valeurs d'OCP observées peut être due à la profondeur d'immersion, au cycle

jour/nuit, à la présence de différents ions présents dans le milieu (nitrate, nitrite, ammonium et chlore), à la température et la salinité du milieu...[47]. L'anoblissement correspond à une modification de la branche anodique correspondant à l'oxydation du métal ou à une évolution des processus cathodiques de réduction de l'oxygène [45]. Des caractérisations supplémentaires sont nécessaires pour confirmer ces hypothèses.

3. Lutte contre les biofilms

Nous présentons, dans cette partie, différentes solutions pour lutter contre la formation de biofilms. Ces solutions peuvent affecter la croissance de microorganismes, tels que les biocides (tuent les bactéries) ou les biostatiques (inhibent la croissance des bactéries sans les tuer), ou même empêcher leur adhésion aux surfaces à protéger tels que les produits antiadhésifs. Ces différents produits de lutte contre la formation de biofilms peuvent être classés en différentes catégories selon la nature de l'agent antimicrobien : physique ou chimique.

3.1. Les traitements physiques

3.1.1. Les ultra-violets (UV)

L'utilisation de traitements physiques telle que l'application d'ultrasons ou de rayons ultra-violets, peut affecter la croissance des bactéries.

La désinfection aux Ultra-violets a été développée principalement dans le milieu médical. Cette méthode de désinfection utilise les rayons UV de courte longueur d'onde 260-270 nm pour tuer ou désactiver des bactéries en détruisant les acides nucléiques et interrompre la chaîne d'ADN les laissant incapables d'exécuter les fonctions cellulaires vitales [55]. Les outils chirurgicaux ainsi que le matériel utilisé dans les laboratoires de microbiologie sont soumis à des rayons UV afin de les stériliser. C'est une méthode de stérilisation efficace dans des systèmes fermés.

A titre d'exemple, la société Lenntech fournit des systèmes complets de désinfection UV pour diverses industries : haute technologie, pharmaceutiques, semi-conducteurs, boissons sans alcool, organismes publiques de traitement des eaux, eau potable et plateformes offshore. Un des systèmes

créés par cette entreprise est un système de désinfection par UV de l'eau des piscines (Figure I.7). Ce système de désinfection [56] consiste à filtrer le sable présent initialement dans l'eau, ensuite l'eau filtrée passe par un système de désinfection à base de rayons UV et sera chauffée avant d'être reversée dans la piscine.

Les avantages de ce système UV sont la réduction du taux général de bactéries ainsi que de spores telles que *Guardia* et *Cryptosporidium* qui ne sont pas affectées par le chlore ou l'hypochlorite, la réduction du taux de *Legionella* et l'oxydation d'organique dans l'eau.

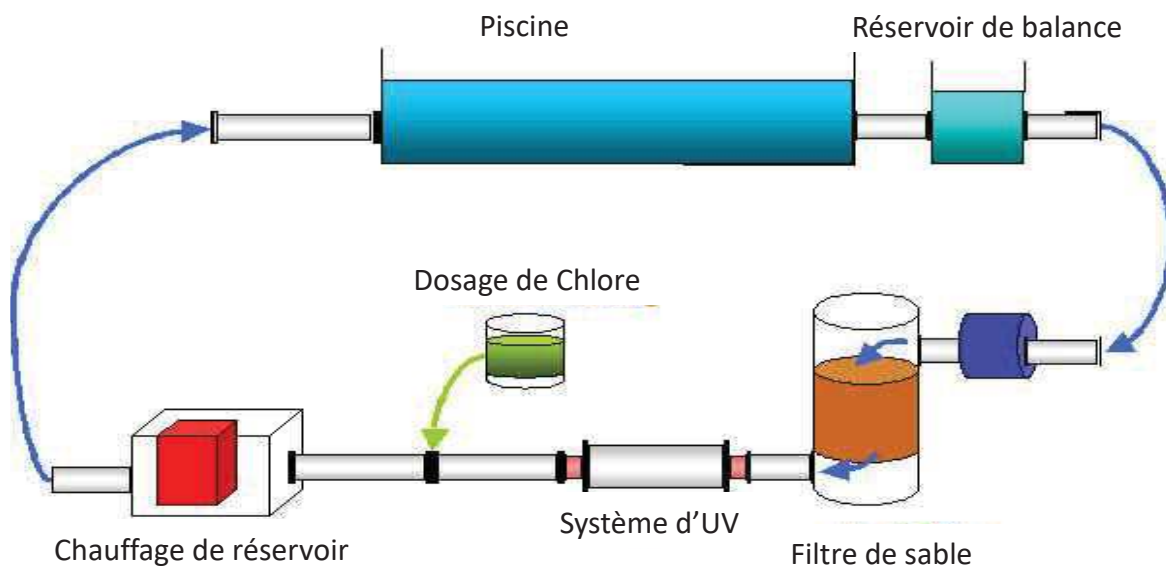


Figure I.7 Système d'UV Lemtech pour la purification d'eau utilisée dans les piscines [70]

3.1.2. Les ultrasons

Le biofouling atteignant toute surface dans le milieu marin, des industriels ont recours aux traitements physiques pour lutter contre ce phénomène. Gom'air par Harsonic® est un appareil à ultrasons destiné à la marine professionnelle, à la navigation de plaisance, aux applications industrielles, agricoles et domestiques. Il est utilisé pour nettoyer les coques de bateaux (Figure I.8), hélices, réservoirs, pipelines et matériels d'irrigation. Le nettoyage se fait en se basant sur le principe d'anti-adhésion curatif : s'applique après la formation du biofilm afin de l'éliminer et prévenir sa formation dans la suite. Cet appareil utilise le phénomène physique de cavitation. Le

Etat de l'art

générateur d'ultrasons émet des signaux électriques convertis en ondes sonores transmis par un transducteur. La pression acoustique est marquée par des phases de dépressions qui alternent avec des phases de surpression. C'est lors des phases de dépression que des bulles de cavitation se forment. Les microbulles implosent alors sous la forme d'une multitude de micro-jets qui décollent les salissures et les contaminations diverses des surfaces traitées [57].



Figure 1.8 Effet de l'application d'ultrasons par l'appareil Gom'air sur le système de propulsion d'un bateau [71]

3.1.3. Les traitements mécaniques

Le brossage des dents est un traitement mécanique utilisé pour lutter contre le biofilm dans le cas de plaque dentaire. Le dentifrice est formé d'agents polissant (abrasifs composés de silice, bicarbonates de sodium ou phosphates de calcium) influençant sa valeur ARD (*Abrasion Relative de la Dentine*), d'agents épaississants, de conservateurs, colorants, édulcorants, arômes et de principes actifs : anti-caries (à base de fluor), agents antibactériens (triclosan ou chlorhexidine), agents de blanchiment et anti-tartre. Le triclosan en grandes concentrations est un biocide (en

faibles concentrations considéré comme bactériostatique) attaquant le cytoplasme et la membrane des organismes cibles et le chlorhexidine est un antiseptique luttant contre les bactéries de Gram+ [58].

3.2. Les traitements chimiques

3.2.1. Les traitements par oxydation

En tant qu'halogène, le chlore est un désinfectant très efficace. Il est ajouté aux systèmes de distribution d'eau dans le but de tuer des pathogènes tels que les bactéries, les virus et les protozoaires qui croissent sur les parois des canalisations et les réservoirs de stockage d'eau [59]. Le chlore est un fort agent d'oxydation : il tue par oxydation des molécules organiques. Lors de sa dissolution dans l'eau, nous pouvons le trouver sous une forme d'acide hypochloreux HClO. Vu que ce dernier n'est pas chargé, il est capable de pénétrer la paroi chargée négativement des pathogènes, de désintégrer ensuite les lipides qui composent la membrane cellulaire et enfin de réagir avec les enzymes intramoléculaires et les protéines les rendant non fonctionnelles. Les microorganismes meurent alors ou sont incapables de se reproduire [60].

La désinfection par chloration peut être problématique dans quelques circonstances. Le chlore peut réagir avec des composés organiques naturels présents dans les systèmes de distribution d'eau conduisant à la formation des composés tels que les trihalogénométhanés (THM) et l'acide haloacétique (AHA). L'effet de ces composés dépend du temps d'exposition et de la quantité ingérée par le corps humain. Pour des doses élevées, nous observons un ralentissement de l'activité cérébrale régulière manifesté par des symptômes comme l'envie de dormir ou la sédation. Une exposition chronique à ses composés peut causer un cancer du foie ou des reins ainsi que des maladies cardiaques. A cause de ces effets, les régulations d'eau potable dans les pays développés exigent une surveillance régulière des concentrations de ces composés dans les systèmes de distribution d'eau [61]. L'effet antifouling du chlore nécessite de grandes concentrations dépassant les normes acceptables environnementales [62,63].

La méthode de photocatalyse est utilisée pour combattre les biofilms contenant des bactéries pathogènes dans le domaine d'industrie alimentaire [64]. L'action antibactérienne d'un matériau

photocatalytique, par exemple le TiO₂, provient d'une génération de ROS (*Reactive Oxygen Species*) par photocatalyse sous une illumination d'UV à une longueur d'onde inférieure à 385 nm. Ces ROS générés sont de très forts oxydants qui endommagent la membrane cellulaire des bactéries, leur ADN, inhibent leur croissance ce qui aboutit au décès des bactéries et la déstabilisation des biofilms [65].

Les Procédés d'Oxydation Avancée (AOP) sont utilisés dans le but d'éliminer les polluants organiques et/ou les agents pathogènes. Cette technologie peut être utilisée pour la dépollution de l'eau, de l'air ou la mise au point de surfaces auto-nettoyantes. Cette méthode est efficace à des températures et pressions proches des conditions ambiantes. Les techniques d'oxydation avancée sont utilisées pour l'élimination de composés issus des effluents industriels (papeteries, imprimeries, textiles, savonneries). Les AOP se caractérisent par l'utilisation de radicaux OH [66].

3.2.2. Les biocides

Toute substance affectant la croissance d'organismes microscopiques nuisibles est appelée biocide. Les biocides ont pour but d'arrêter la croissance des microorganismes en les détruisant par une action chimique ou biologique. Nous distinguons les substances actives biocides des produits biocides. Les substances actives biocides sont des substances chimiques ou produites par des microorganismes exerçant une action sur ou contre les organismes nuisibles [67]. Par contre, les produits biocides sont des préparations contenant plusieurs substances actives à usages domestiques ou industriels destinées à détruire repousser ou rendre inoffensifs les organismes nuisibles par une action chimique ou biologique. Les produits biocides sont classés en quatre catégories : les désinfectants, les produits de protection, les produits de lutte contre les nuisibles (espèces animales endommageant l'agriculture) et les autres produits biocides...

3.2.2.1. Les désinfectants

Les désinfectants sont des agents antimicrobiens appliqués à la surface d'objets ou sur les surfaces externes du corps dans le but de détruire les microorganismes présents. La désinfection ne tue pas nécessairement tous les microorganismes surtout les spores bactériennes résistantes. Les

désinfectants agissent en détruisant la membrane cellulaire des microbes ou en interférant avec leur métabolisme. Nous citons les solutions hydro-alcooliques (SHA ou SHAL) qui sont utilisées afin d'assurer l'hygiène des mains, surtout lors des soins médicaux. Ces solutions sont composées du propan-2-ol (alcool isopropylique) et d'un agent antibactérien. Ce produit possède des propriétés bactéricides, virucides et fongicides ; il fonctionne grâce au principe de la friction hydro-alcoolique (contact direct et mécanique en friction sans usage d'eau). C'est alors un biocide qui agit par traitement mécanique.

Le Surfanios[®] est un détergent-désinfectant pour sols et surfaces à base de trois principes actifs antibactériens : un chlorohydrate d'acides aminés, un chlorure de didécyltriméthylammonium et des chélateurs des ions calcium et potassium. Deux types de bionettoyage peuvent être distingués : en un temps et en trois temps. Le bionettoyage en un temps est utilisée en une seule application, alors que le bionettoyage en trois temps impose une étape de nettoyage utilisant un détergeant, une étape de rinçage à l'eau suivie de l'application du désinfectant. Le Surfanios[®] est utilisé dans les hôpitaux pour le bionettoyage en un temps selon une dilution de 0,25% recommandée par le fabricant [68]. D'autres dilutions sont possibles selon le domaine d'application.

3.2.2.2. Les produits de protection

Ils sont généralement utilisés pour la protection du bois et pour la protection de matériaux de construction contre les insectes, les champignons et d'autres organismes nuisibles. Le bois est traité sous pression par l'arsenic et le chrome (arséniate de cuivre chromé) [69]. Le chrome agit en tant qu'agent chimique de fixation, il permet aux autres produits chimiques de se fixer au bois. Le cuivre protège le bois contre la détérioration, les champignons et les bactéries alors que l'arsenic est pesticide à utilisation limitée qui protège le bois contre les termites et les foreurs marins. Palanti *et al.* en 2013 [70] ont élaboré un produit de protection du bois à base de cuivre et d'autres produits comme les azoles, les composés organiques et l'acide borique.

3.2.2.3. Les produits de lutte contre les nuisibles

Les nuisibles sont des espèces animales dont la présence est principalement préjudiciable à l'agriculture en propageant des maladies, en attaquant les réserves alimentaires (en les dévorant ou les souillant) [71]. La lutte contre les nuisibles est une partie essentielle dans le domaine agroalimentaire d'un point de vue hygiénique, économique ou légal (action en justice des ouvriers agricoles). Les nuisibles sont considérés comme moyen de transport pour de nombreux organismes dont certains sont responsables de la production de biofilms. Ces produits de lutte sont utilisés pour combattre les rongeurs, les insectes, les invertébrés... Ils présentent une toxicité primaire pour les rats et une toxicité secondaire pour les mammifères et l'environnement. Ces produits peuvent être des anticoagulants bloquant le cycle de vitamines K, ce qui conduit à l'incapacité de produire des facteurs essentiels de coagulation sanguine II (le prothrombine) et VII (proconvertin).

3.2.2.4. Autres produits biocides

Ils comprennent les fluides utilisés pour l'embaumement (techniques visant à conserver les cadavres humains ou animaux) et les produits antisalissures. Les produits antisalissures contiennent des pesticides (biocides). Le traitement antisalissure rend la surface anti-adhérente, en donnant au revêtement des propriétés oléophobe et hydrophobe réduisant ainsi l'adhérence des corps gras et de l'eau les permettant de glisser sans laisser de traces. Ce traitement est utilisé pour la protection des verres optiques antireflets. Ce revêtement à base de composés chimiques contenant des chaînes fluorées ou hydrocarbonées peut être déposé de deux façons différentes : par un procédé de trempage ou par évaporation sous vide. Le revêtement ainsi constitué agit de deux façons complémentaires. En premier, le colmatage des porosités de la surface empêche la graisse de s'infiltrer. Ensuite, la composition du revêtement modifie la surface d'une goutte d'eau ou de graisse en réduisant la surface de contact d'un facteur de 2 ou 5 ce qui facilite l'essuyage de la surface [72]. Le traitement antisalissure est utilisé pour empêcher l'adhésion de toute salissure (eau, corps gras, microorganismes...) aux surfaces à protéger.

3.2.3. Les biostatiques

Les produits biostatiques inhibent la croissance des microorganismes sans les détruire. Les antibiotiques sont des produits biostatiques visant les bactéries [73]. Les antibiotiques peuvent être biocides ou bactéricides. Le mode d'action des antibiotiques consiste à interférer avec les activités biologiques des bactéries : la production de protéines et la réplication d'ADN. Un exemple de produit biostatique commercialisé visant les bactéries est l'eau bactériostatique pour injection (Figure I.9). Ce produit contient du méthylparaben (0,12%) et du propylparaben (0,012%).



Figure I.9 Produits biostatiques commercialisés pour combattre les bactéries

Un produit biocide en faible quantité est considéré comme biostatique et inversement, un produit biostatique en grande quantité peut être considéré comme biocide.

3.2.4. Les produits anti-adhésifs

Les produits anti-adhésifs sont des produits empêchant l'adhésion des organismes sur les surfaces à protéger. Drago *et al.* en 2014 [74] ont étudié l'effet anti-adhésif (après 24h d'incubation) et antibiofilm (après 48h d'incubation supplémentaires) de l'acide hyaluronique sur plusieurs bactéries pathogènes responsables des infections des voies respiratoires telles que *Streptococcus pneumoniae*, *Haemophilus influenzae*, *Moraxella catarrhalis* et *Staphylococcus aureus*. La croissance bactérienne n'étant pas affectée par la présence de cet acide, l'adhésion de ces souches

bactériennes ainsi que le taux de réduction de la formation du biofilm ont été mesurés pour deux concentrations de l'acide à 100% et 50% obtenant un effet plus important sur l'adhésion et la formation de biofilm à 100% de l'acide. Les résultats présentés sur la Figure I.10(a) montrent que l'acide hyaluronique (HA) est caractérisé par des propriétés anti-adhésives importantes pour toutes les bactéries, alors qu'il présente une activité modérée contre le biofilm bactérien (Figure I.10(c) et (d)) sauf dans le cas de la souche *S.aureus* (Figure I.10(b)). Dans le cas de cette souche bactérienne, les 10% de bactéries qui ont pu adhérer la surface (en présence de 100% de HA), ont pu coloniser cette surface après 48h d'incubation supplémentaires permettant une formation de biofilm réduite de 50%. Puisque l'adhésion est l'étape initiale de la colonisation, ces résultats supportent le rôle de l'acide hyaluronique dans la prévention des infections des voies respiratoires.

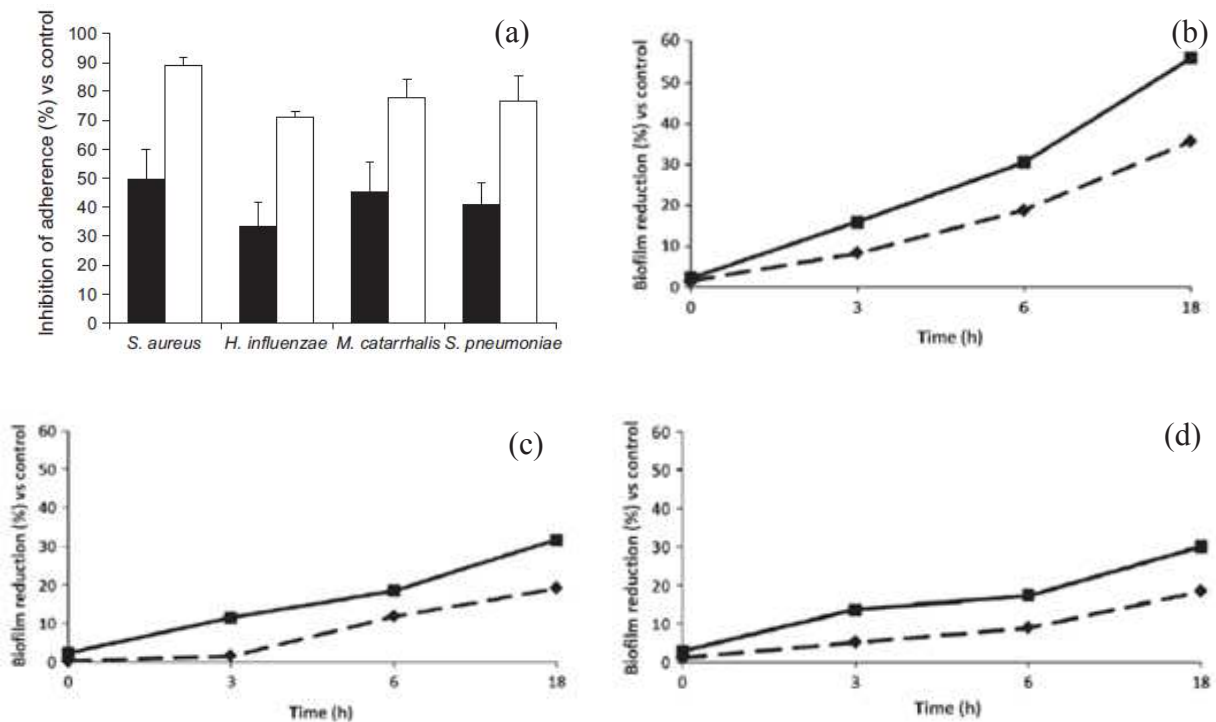


Figure I.10 Effets anti-adhésif et anti-biofilm obtenus par les tests de Drago et al [74] (a) L'inhibition d'adhésion par rapport au contrôle pour les quatre souches de bactéries pathogènes en noir pour 50% de HA et en blanc pour 100% de HA, pourcentages de réduction de biofilm par rapport au contrôle ligne continue pour 100% HA et ligne pointillée pour 50% de HA pour les souches (b) *S.aureus*, (c) *H.influenzae* et (d) *M.catarrhalis*

3.2.5. Les peintures antifouling

Le recouvrement par peintures antifouling est la solution la plus utilisée pour lutter contre la formation de biofilms sur les coques de bateaux (Figure I.12). L'effet de ces peintures est optimal lorsque les bateaux sont en mouvement. Les peintures antifouling sont des produits anti-adhésifs contenant des biocides. Elles peuvent alors être classées sous les traitements chimiques et sous les produits anti-adhésifs. Ces peintures peuvent être à base de CuO, arsenic, oxyde de mercure ou TBT (Tributyltin) [17,22].

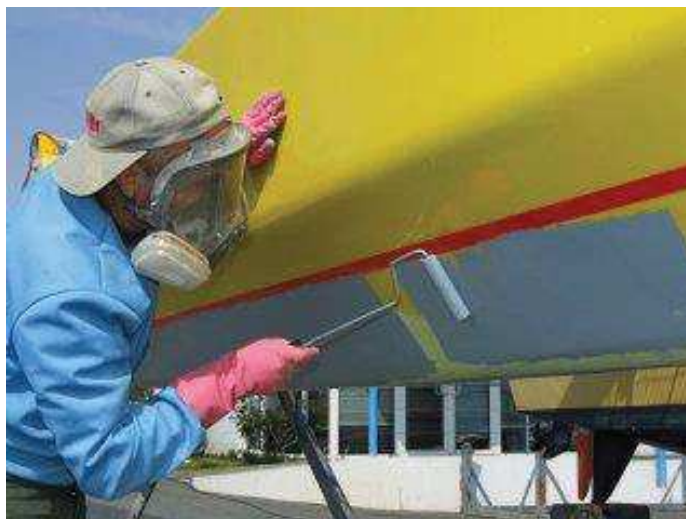


Figure I.11 Application de peinture antifouling sur la coque d'un bateau

Les biocides intégrés dans les peintures antifouling étant toxiques pour les organismes environnementaux, les chercheurs se penchent, durant ces dernières années, à étudier des produits antifouling respectant les restrictions régionales établies [17]. De ce fait, le besoin d'élaboration de revêtements sans danger pour l'environnement marin a augmenté durant ces dernières années. Il y a alors un besoin urgent de développer de nouveaux matériaux « eco-friendly » ayant des propriétés « antifouling ». Les travaux de recherche ont été orientés pour remplacer ces matériaux antifouling à base de biocides par des produits à base d'agents antibactériens tels que les nanoparticules ou même les ions.

4. Agents antibactériens : Nanoparticules (NPs) et ions

Dans la littérature, de nombreuses équipes de recherche ont intégré soit des NPs dans des matrices biocompatibles pour des applications médicales [5–8], soit des ions [3,78–80].

4.1. Les nanoparticules (NPs)

Les NPs ont été fortement utilisées et étudiées lors de la dernière décennie [78]. Les NPs d'Ag ou d'Au sont résistants à la corrosion et à l'oxydation [7,82]. L'effet antibactérien des NPs dépend principalement de 3 paramètres : leur forme, leur taille et la structure morphologique de la matrice dans laquelle elles sont insérées. L'utilisation des NPs est justifiée par le rapport surface/volume élevé, ce qui permet une meilleure interaction avec les bactéries. Les nanoparticules les plus utilisées dans le domaine microbien sont les NPs d'argent. Raza *et al.* en 2016 [4] ont conclu que les NPs d'argent de forme sphérique et de faible taille (15 à 50 nm) présentent la propriété antibactérienne la plus importante. Le faible coût de fabrication ainsi que la propriété antibactérienne permettent à ces NPs d'être utilisées dans différents biens de consommation tels que le plastique, les savons, les pâtes, les métaux et textiles pour leurs propriétés antimicrobiennes.

Dans ce paragraphe, nous donnerons des exemples de matrices contenant des NPs d'Ag testés sur des bactéries de Gram- et Gram+ pathogènes pour des applications dans le domaine médical. Les NPs peuvent être intégrées dans différentes matrices biocompatibles telles que la cellulose, l'alginate ou même le chitosan. Elles ont été testées sur des souches pathogènes (*E.coli* et *S.aureus*) en mesurant le diamètre de la zone d'inhibition [5–7].

Kumar *et al.* [5] ont élaboré des nanocomposites d'hydrogel à base d'alginate de sodium et de polyalcool vinylique PVA₁ incluant des NPs d'argent réduites par une solution d'extrait de *Ficus benghalensis* (FB) et de diméthylsulfoxyde (DMSO). Ces nanocomposites d'hydrogels élaborés, notés Film, ont été fabriqués en pulvérisant la solution polymérique et le CaCl₂ simultanément sur une plaque de verre dans le but d'avoir des revêtements pour couvrir des plaies. Ces matériaux ont été testés sur les souches pathogènes *E.coli* (ATCCC-723) et *S.aureus* (MTCC-3160). Les résultats antibactériens obtenus sont présentés dans la Figure I.13. A 24h d'incubation, la zone d'inhibition

des films est bien visible (Figure I.13(E) et (F)). Le relargage des NPs d'Ag produit une zone d'inhibition qui augmente en fonction des temps d'incubation 2, 6 et 12h (Figure I.13(G) et (H)). Ils en concluent que les NPs d'argent sont plus efficaces sur *S.aureus* que sur *E.coli*. L'activité antibactérienne observée a été attribuée au fait que les NPs d'Ag peuvent interagir avec des protéines contenant du soufre situées dans la membrane cellulaire ou à l'intérieur de la cellule. Les NPs pourront ensuite attaquer d'avantage la chaîne respiratoire entraînant la mort cellulaire lors de la division cellulaire. Il faut tenir compte que l'activité antibactérienne des NPs d'Ag est dépendante de leur concentration dans la matrice.

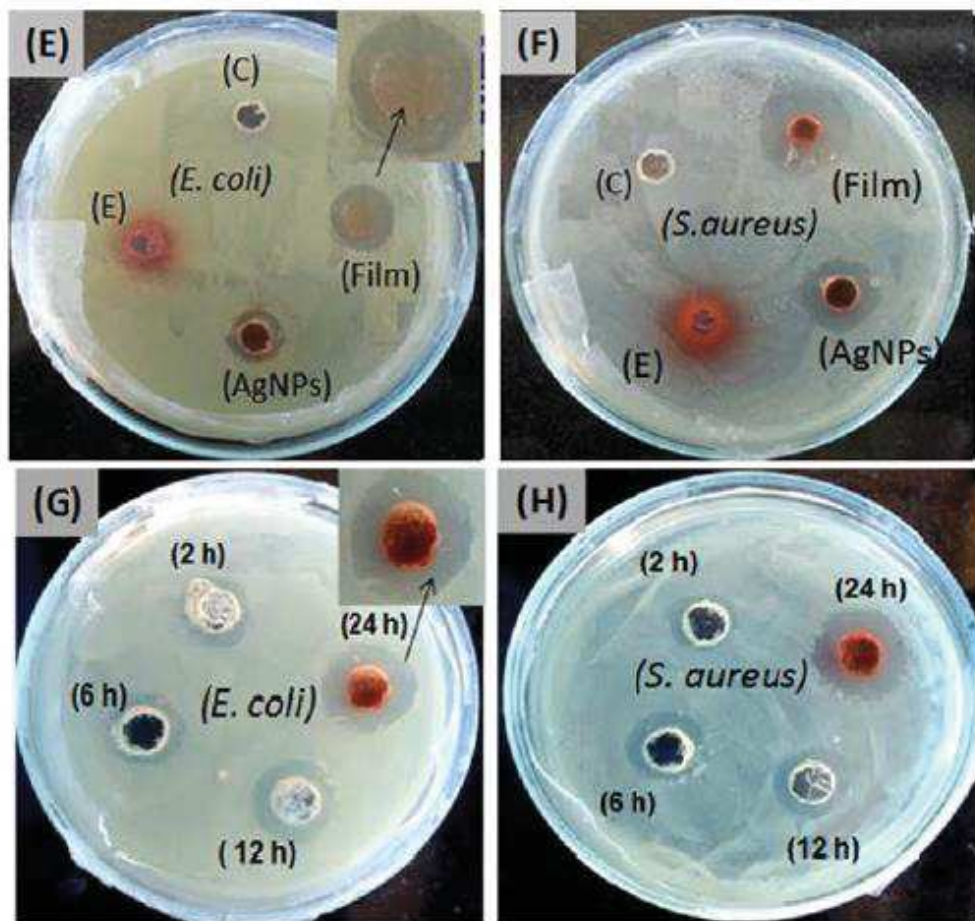


Figure I.12 Figures (E et F) présentent les zones d'inhibition contre *E.coli* et *S.aureus* pour (C) la solution d'extrait FB + DMSO, (E) la solution de DMSO en tant que contrôle négatif, NPs d'Ag et les films SHD à 24h d'incubation. Les photos (G et H) présentent les zones d'inhibition des NPs d'Ag relargués des SHD après 2, 6, 12 et 24h respectivement [5]

Ali *et al.* en 2017 [7] ont élaboré des matériaux antibactériens à base de NPs d'Ag insérées dans une matrice de cellulose. Ces matériaux ont été testés sur les souches de bactéries *S.aureus* et *E.coli* par deux méthodes : la première consistant à mesurer la zone d'inhibition et la seconde en comptant le nombre de colonies par mL en fonction du temps (méthode quantitative effectuée sur *S.aureus* seulement). Les résultats obtenus, présentés sur la Figure I.14, ont montré que pour des quantités de NPs d'Ag aussi élevées que 5 et 10 mg, la concentration bactérienne obtenue au bout de 150 min est devenue nulle avec un effet antibactérien plus rapide pour ceux contenant 10 mg. Donc, l'effet antibactérien de ces matériaux est directement lié à la concentration des NPs d'Ag. De même, les auteurs de cette étude montrent que la sensibilité est différente pour les souches de Gram- et des souches de Gram+ [7].

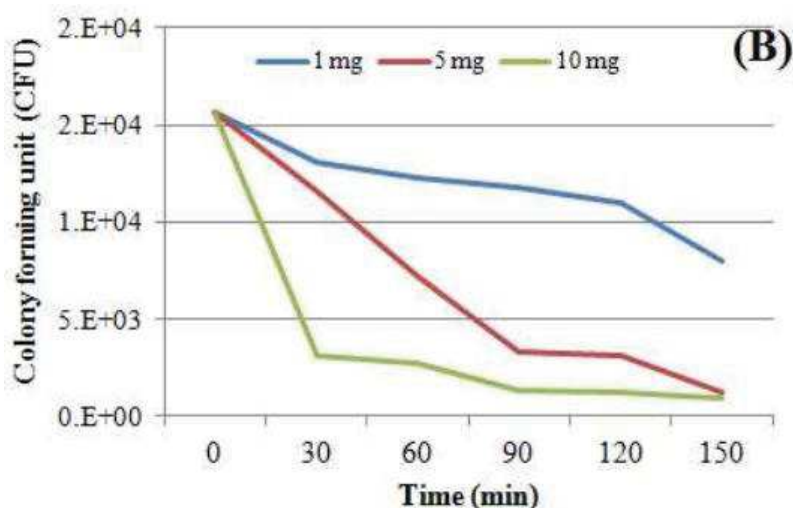


Figure I.13 Effet antibactérien des NPs d'Ag + cellulose pour différentes quantités de NPs au bout de 2h30 pour *S.aureus* [7]

Torabfam *et al.* en 2016 [6] ont intégré les NPs d'Ag dans une solution de chitosan. Le chitosan est souvent utilisé pour ses propriétés antimicrobiennes à cause des groupes hydrophobiques présents dans sa chaîne moléculaire [80]. Ils ont pu démontrer l'activité antibactérienne de ses matériaux sur *E.coli* (Figure I.14(a)) et *S.aureus* (Figure I.14(b)) par la méthode de zone d'inhibition. De plus, ces matériaux ont été testés sur *A.flavus* (souche de champignon). Ses matériaux ont présenté une activité antifongique importante due au chitosan et une activité antibactérienne due aux NPs d'Ag.

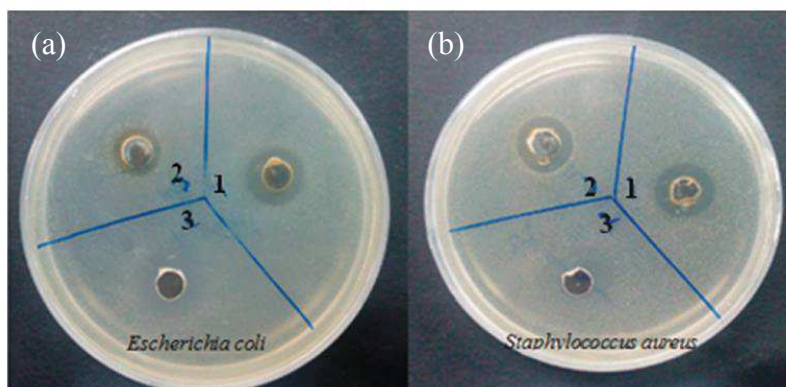


Figure I.14 Zones d'inhibition créées pour *S.aureus* et *E.coli* incubés à 37°C pendant 24h pour (1) solution de chitosan contenant des NPs d'Ag, (2) solution de chitosan et (3) eau distillée [6]

Les NPs d'Ag ne sont pas les seules NPs à avoir été testées. Récemment, des nanoparticules d'oxyde de zinc ont été étudiées par Cordéro *et al.* [8]. Ces derniers, notés n- ZnO par ces auteurs, ont été intégrées dans une matrice formée d'alginate et de *bioactive glass* (en tant que composé inorganique) par dépôt sur acier par la méthode d'électrophorèse [8]. Le recouvrement est obtenu par l'application d'une différence de potentiel entre deux électrodes plongées dans une solution polymérique. Les matériaux élaborés ont été testés sur *E.coli* en mesurant la zone d'inhibition [8]. Les résultats obtenus sont présentés sur la Figure I.15. Nous observons sur la Figure I.15(a) et (b) que nous n'avons pas de réduction évidente des colonies bactériennes en présence de l'inox ou même de l'alginate avec le BioGlass même après 4h. Par contre, sur la Figure I.15(c), les colonies bactériennes ont clairement disparu au bout d'1h ce qui indique l'effet antibactérien des particules n-ZnO. Finalement sur la Figure I.15(d), les colonies bactériennes ne disparaissent pas complètement mais sont significativement réduites après 3h et encore plus après 4h. Les auteurs expliquent que l'effet antibactérien des n-ZnO n'est pas entièrement compris mais ils proposent deux phénomènes distincts pouvant l'expliquer : la génération de peroxyde d'hydrogène par des espèces actives d'oxygène (AOS) [81] et la liaison des nanoparticules à la cellule par des forces électrostatiques qui détériorent la membrane cellulaire entraînant la mort cellulaire [82].

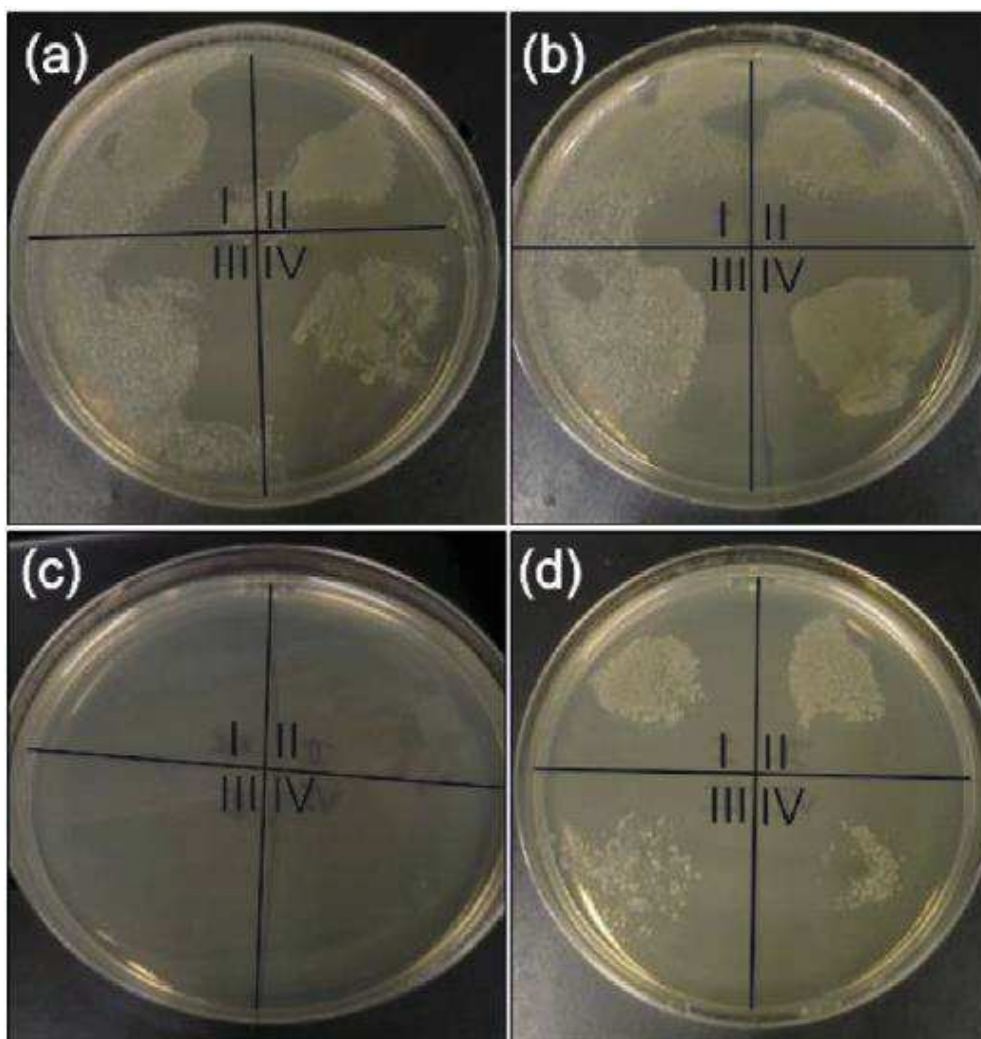


Figure 1.15 Résultats antibactériens de différents revêtements contre *E.coli* (a) Inox, (b) Revêtement de BioGlass/Alginate (1,5 g/L BG), (c) Revêtement de ZnO/Alginate et (d) Revêtement de 25-ZBA. Les zones I, II, III et IV indiquent le nombre d'heures pour lesquelles les tests ont été effectués (1, 2, 3 et 4h respectivement) [8]

4.2. Effet de la toxicité des nanoparticules sur les organismes marins non ciblés

Le mode d'action des nanomatériaux n'est pas encore complètement compris mais peut potentiellement s'expliquer par au moins trois mécanismes distincts [10,11] :

- Les particules formeraient un réservoir qui relarguerait en continu des ions dans le milieu auquel elles sont exposées, par exemple des ions Ag^+ des NPs d'Ag.

Etat de l'art

- La surface d'interaction entre les nanoparticules et le milieu d'exposition pourrait produire des substances toxiques, par exemple des radicaux chimiques ou ROS.
- Les nanoparticules ou leur surface pourraient interagir directement avec les cibles biologiques et les perturber [10]. Nous pouvons citer l'interaction toxique avec les membranes ainsi que l'intercalation avec l'ADN.

Toutefois, leur usage génère potentiellement des risques sur la santé humaine et pour l'environnement. On distingue deux genres de nanoparticules : des NPs stables et des NPs instables. La stabilité des nanoparticules est définie selon leur capacité à rester sous la même composition chimique, la même taille et la même forme. Les NPs stables comprennent par exemple les NPs d'Au. Les NPs instables comptent les NPs d'Ag, les nZnO et les NPs de Cu. Le processus de relargage de NPs et d'ions en parallèle dans le milieu est étudié afin de comprendre leur action antibactérienne réciproque et les interactions possibles entre le produit relargué et le milieu.

Auffan *et al.* en 2016 [9] ont montré la présence d'une interaction importante entre les cellules algales et la surface des NPs. Les NPs affectent la croissance cellulaire des algues, la photosynthèse et la production de chlorophylle.

Pandiarajan *et al.* en 2017 [12] ont étudié l'effet des NPs sur les algues. Ils ont examiné l'accumulation des NPs dans les organismes marins. Cette accumulation est considérée toxique même pour de très faibles concentrations puisque ces effets néfastes semblent être explicites par la suite.

Les substances toxiques dues aux NPs, telles que les ROS par exemple, sont bioaccumulées dans les microalgues. Comme les algues forment la base de la chaîne alimentaire, ces substances toxiques seront accumulées dans les poissons herbivores par l'ingestion d'algues, suivie par une accumulation dans les poissons carnivores pour arriver à l'humain. Il pourrait être plus intéressant d'utiliser des ions insérés dans une matrice biocompatible pour éviter la bioaccumulation des substances toxiques en évitant le premier mécanisme cité par Ma *et al.* [10]. Ceci pourrait permettre d'étudier seulement le relargage des ions au lieu de la dissolution des nanoparticules et le relargage des ions dans le milieu d'exposition.

4.3. Les ions

Dans ce paragraphe, nous nous intéressons aux matériaux contenant des ions et non plus des nanoparticules. Plusieurs types d'ions ont été insérés dans des matrices : Ag^+ , le Cu^{2+} et le Zn^{2+} [3], [78–80].

Jung *et al.* en 2008 [75] ont étudié l'effet de solutions d'ions d'argent de différentes concentrations sur deux bactéries pathogènes *E.coli* et *S.aureus* par trois méthodes distinctes, le comptage de CFU/mL en fonction du temps conventionnel, par analyse de cytométrie en flux (FC) couplée avec *Baclight* (kit de viabilité bactérienne) et par analyse FC couplée avec une coloration au diacétate carboxyfluorescéine (CFDA).

Une concentration d'ions d'argent de 0,2 ppm a été comparée au contrôle PBS (*Phosphate Buffer Solution*) pour 30 min, 1h, 1,5h, 2h et 3h de traitement. Les résultats obtenus, présentés sur la Figure I.17, montrent une efficacité similaire pour les tests effectués par les méthodes d'analyse FC. Alors que les résultats obtenus par la méthode de comptage conventionnelle sont plutôt supérieurs aux deux autres. Les ions d'argent ont montré une efficacité antibactérienne plus importante contre *E.coli* (Figure I.17(a)) que sur *S.aureus* (Figure I.17(b)). Ils supposent que ceci est dû à l'épaisseur de la couche de peptidoglycane qui peut empêcher l'action des ions d'argent à travers la membrane cellulaire. Ce résultat est en accord avec les résultats d'autres études [86,87].

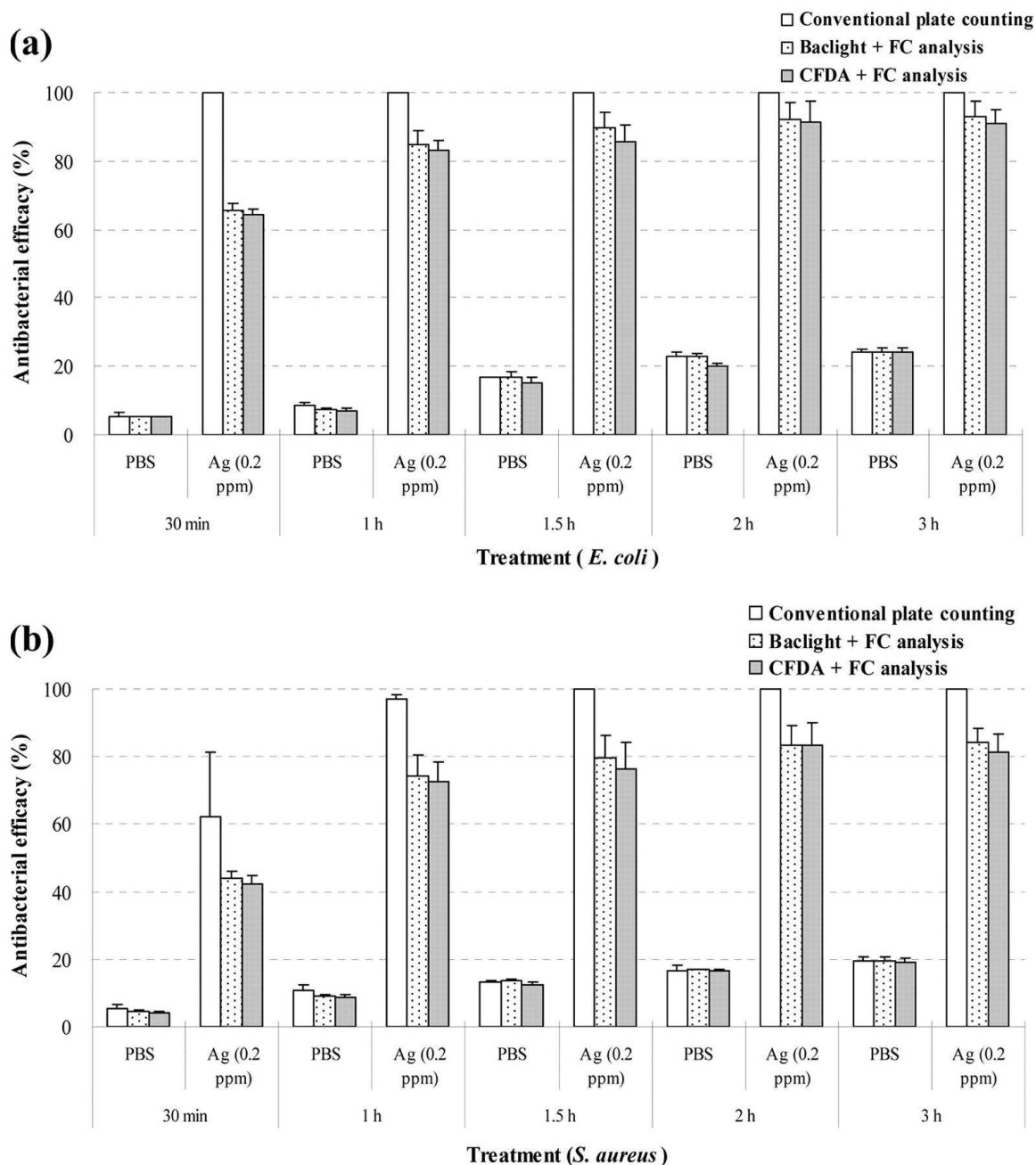


Figure I.16 Graphes montrant le pourcentage d'effet antibactérien en fonction du temps par trois méthodes d'analyse pour la souche de bactérie (a) *E.coli* et (b) *S.aureus* [75]

Utilisant la même méthode, Mikolajczyk *et al.* [3] ont comparé des fibres d'alginate à base de cuivre avec des fibres d'alginate à base de zinc par la méthode de comptage du nombre de CFU/mL après 24h d'incubation. L'effet antibactérien de ces deux fibres est présenté dans le Tableau I.3.

Etat de l'art

Tableau I.3 Résultats des tests antibactériens des fibres d'alginate à base de cuivre ou à base de zinc dans des conditions optimales [3]

Echantillon	Temps h	Quantité de bactéries cfu/mL	Intervalle de confiance cfu/mL	Activité bacteriostatique log(cfu/mL)	Activité bactérienne log (cfu/mL)	Valeur de croissance log (cfu/mL)
Contrôle	0	$9,1 \times 10^4$	$6,7 \times 10^4 - 1,2 \times 10^5$	-	-	-
Contrôle	24	$6,5 \times 10^7$	$5,2 \times 10^7 - 8,8 \times 10^7$	-	-	2,8
Alginate de zinc	24	47	$< 1,2 \times 10 - 2,0 \times 10^2$	6,1	3,3	-
Alginate de cuivre	24	< 20	-	6,5	3,7	-

Nous remarquons d'après les résultats présentés dans le Tableau I.3, que les fibres d'alginate de cuivre et de zinc ont un effet antibactérien important et à peu près similaire.

Straccia *et al.* en 2015 [76] ont élaboré des hydrogels d'alginate intégrant du carbonate de zinc de diverses concentrations afin d'obtenir des hydrogels de zinc. Ces hydrogels sont notés Alg1, Alg4 et Alg6 (le matériau contenant le plus d'ions Zn^{2+} étant le Alg6). Les ions Zn^{2+} sont considérés comme catalyseurs connus pour la cicatrisation de plaies et pour leur propriété anti-infectieuse [76]. Les hydrogels élaborés ont été mis en contact avec un tapis bactérien d'*E.coli* préparé dans des boîtes de pétri pour 720 min de contact puis retirés avant d'être incubés à 37°C pendant 24h (Figure I.18). L'effet antibactérien de ces hydrogels augmente avec la concentration de zinc [76].

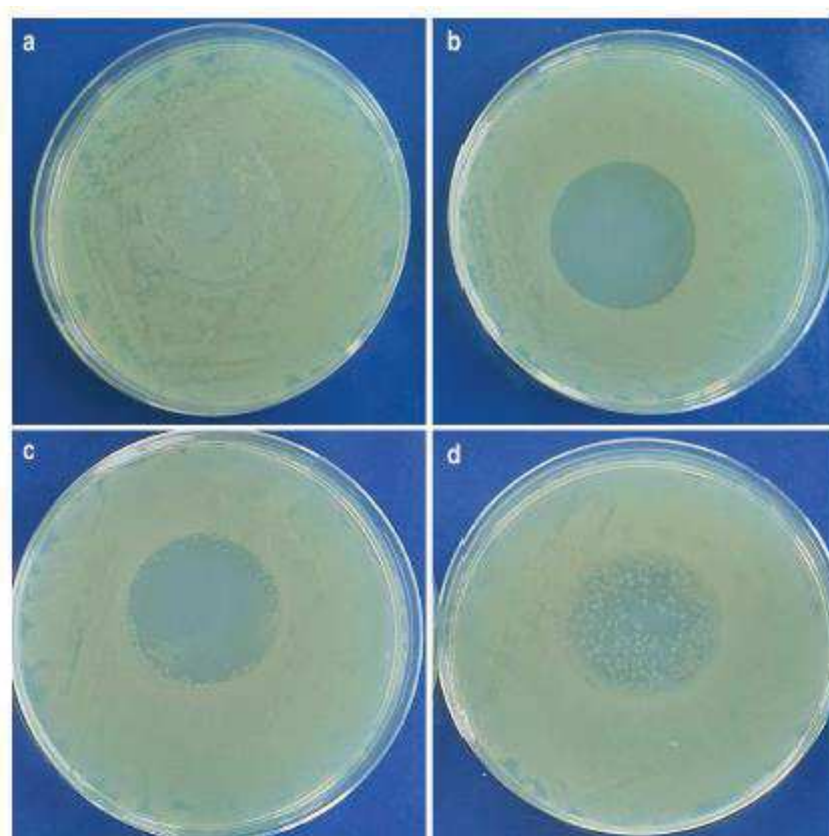


Figure I.17 Effet antibactérien sur *E.coli* d'un hydrogel d'alginate de (a) calcium (b) zinc noté Alg6, (c) zinc noté Alg4 et (d) zinc noté Alg1 après 12h de contact [76]

Récemment, Malagurski *et al.* en 2018 [77] ont intégré des ions de Cu^{2+} et Zn^{2+} dans des nanocomposites d'alginate. Des billes d'alginate minéralisées par du carbone ou par du phosphate ont été élaborés et comparés à des billes non minéralisées. Ces matériaux ont été testés sur des souches de bactéries pathogènes : *E.coli*, *S.aureus* et une souche de levure *C.albicans* en comptant le nombre de colonies/mL en fonction du temps. Les résultats obtenus en présence des matériaux minéralisés par du carbone sont présentés sur la Figure I.19(a), ceux minéralisés par du phosphate sur la Figure I.19(b) et ceux non minéralisés sur la Figure I.19(c). L'ajout d'ions Cu^{2+} et Zn^{2+} diminue le nombre de colonies. Nous remarquons que la souche d'*E.coli* est la plus sensible aux matériaux élaborés, suivie par la souche de *S.aureus* et la souche *C.albicans*. Ceci est dû au fait que les micro-organismes ont une sensibilité différente pour différents métaux.

Etat de l'art

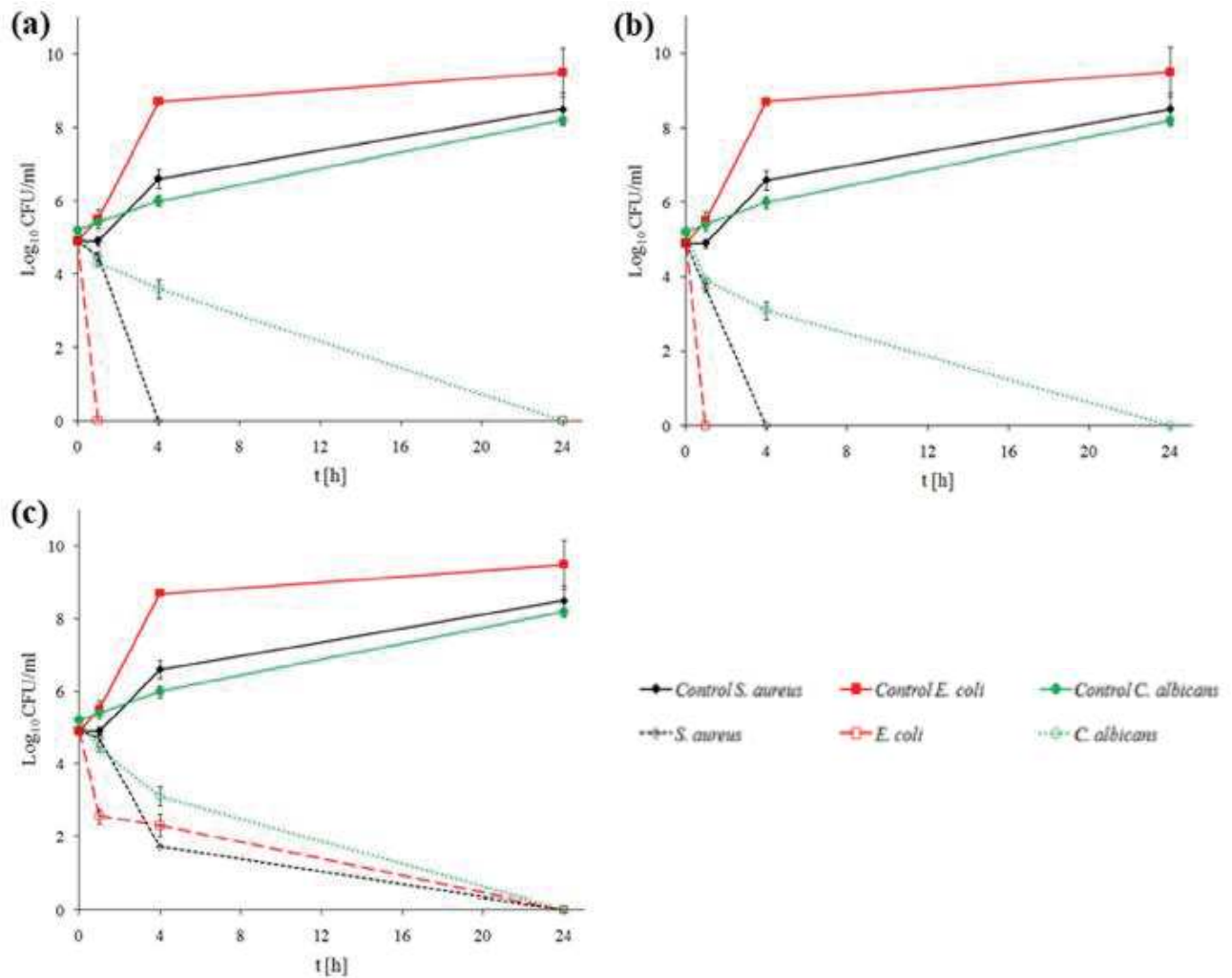


Figure 1.18 Tests antibactériens obtenus par Malagurski et al. pour des billes d'alginate (a) minéralisées par C, (b) minéralisés par P et (c) non minéralisées [77]

Les ions d'argent Ag^+ , de cuivre Cu^{2+} et de zinc Zn^{2+} possèdent des propriétés antibactériennes affectant les bactéries pathogènes de Gram- et Gram+. Ils peuvent remplacer les nanoparticules pour des applications antibactériennes. Il faut tenir compte que pour de grandes concentrations d'ions, les matériaux sont considérés comme biocides. Il est donc important d'élaborer des matériaux ayant une faible concentration ionique de façon à respecter les réglementations des produits biocides (BPR, Regulation (EU) 528/2012) présentant toujours des propriétés antimicrobiennes dont le pourcentage d'inhibition de croissance ne dépasse pas les 50%.

Ces différents agents antimicrobiens doivent être insérés dans une matrice biocompatible afin d'obtenir un matériau dont l'ensemble n'est pas toxique pour l'environnement. Cette matrice peut être un biopolymère tel que la cellulose, le chitosan ou l'alginate.

5. Biomatériaux

5.1. La cellulose

La cellulose est un composé organique de formule $(C_6H_{10}O_5)_n$ (Figure I.20). Il s'agit d'un polysaccharide constitué de chaînes linéaires allant de plusieurs centaines à plusieurs milliers de molécules de D-glucose.

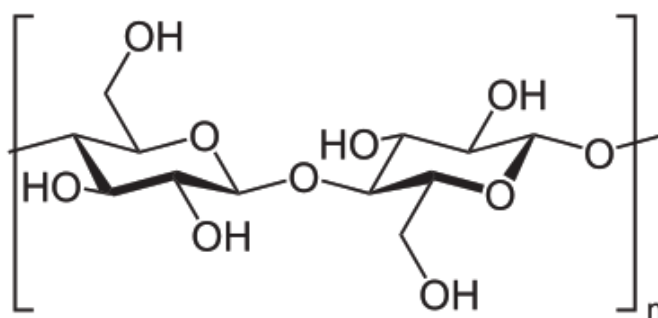


Figure I.19 Composition chimique d'une chaîne de cellulose

Ce biopolymère est le constituant principal de la paroi des cellules végétales, plusieurs formes d'algues et oomycètes (organismes eucaryotes filamenteux). De ce fait, il est le polymère le plus abondant sur terre. La cellulose est utilisée dans différents domaines d'application : fabrication de produits de papier, fibres, consommables (excipients inactifs dans les tablettes de médicaments), cultures énergétiques, biocarburant et fabrication de matériaux. Ce biopolymère biodégradable est insoluble dans l'eau et la plupart des solvants organiques.

La cellulose est inodore, sans goût, hydrophile avec un angle de contact de 20-30°. Ces propriétés dépendent de la longueur des chaînes et du degré de polymérisation [85]. La cellulose provenant de la pulpe de bois a des chaînes de longueur entre 300 et 1700 molécules. Celle qui provient du coton et d'autres fibres végétales a des chaînes de longueur allant de 800 à 10000 molécules.

Etat de l'art

Les liaisons hydroxyles de la cellulose avec l'eau produisent un matériau pulvérisable, modulable en tant qu'alternatif au plastique et à la résine. Ce matériau recyclable peut être produit sous forme de matériau résistant à l'eau et au feu de haute résistance et rigidité [86]. La cellulose et ses dérivatifs sont utilisés dans le domaine pharmaceutique, couverture de plaies, cosmétiques, revêtements, filtration d'eau et différents hybrides [90–92].

Ali *et al.* en 2016 [7] ont utilisé la cellulose en tant que matrice contenant des NPs d'Ag. Capanema *et al.* en 2017 [90] ont élaboré des biocomposites hybrides à base de carboxyméthylcellulose incluant des nanoparticules d'Ag pour la couverture de plaies et la réparation épidermique. Ces matériaux notés CMC, de deux degrés de substitution (DS) 0,77 et 1,22, ont été testés sur les souches pathogènes *E.coli* (G⁻), *P.aeruginosa* (G⁻) et *S.aureus* (G⁺). Les propriétés du polymère dépendent du degré de substitution. Ce dernier est le nombre moyen de groupes substituants attachés par chaînes. Les résultats antibactériens obtenus dans ces travaux sont présentés dans le Tableau I.4 sous forme de zones d'inhibition en mm. Nous remarquons que les zones d'inhibition sont plus importantes en augmentant la concentration des NPs et le degré de substitution.

Tableau I.4 Résultats antibactériens des zones d'inhibition (mm) de croissance des matériaux élaborés par Capanema *et al.* [90]

Bacteria strain	CMC DS = 0.77		CMC DS = 1.22	
	[AgNP] = 0.6%	[AgNP] = 1.2%	[AgNP] = 0.6%	[AgNP] = 1.2%
<i>E. coli</i> (G ⁻)	10.0 ± 0.7	12.0 ± 3.5	11.0 ± 4.2	11.5 ± 0.7
<i>P. aeruginosa</i> (G ⁻)	11.0 ± 1.4	13.0 ± 1.4	14.5 ± 3.5	14.0 ± 1.4
<i>S. aureus</i> (G ⁺)	13.5 ± 2.1	18.5 ± 3.5	18.5 ± 0.7	16.5 ± 0.7

5.2. Le chitosan

Le chitosan est un polysaccharide linéaire composé de molécules D-glucosamine liée en β -(1-4) et N-acétyl-D-glucosamine distribuées aléatoirement. Sa composition chimique est présentée sur la Figure I.21.

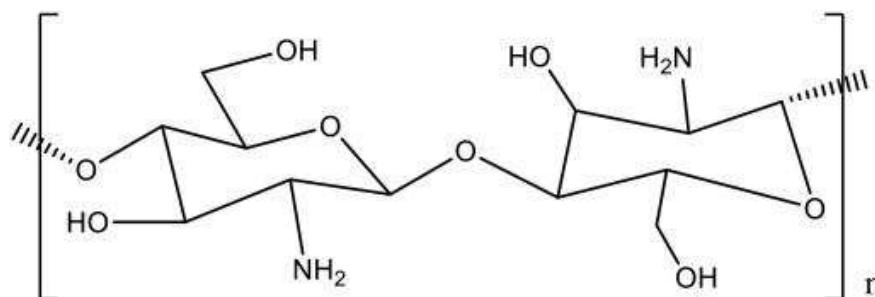


Figure I.20 Composition chimique du chitosan

Il est produit par le traitement de la chitine provenant des crevettes et autres crustacées possédant une substance alcaline comme l'hydroxyde de sodium. Due à sa biocompatibilité, biodégradabilité, non toxicité, mucoadhésion, activité antimicrobienne, son origine naturelle et son faible coût, ce biopolymère a été étudié extensivement afin d'être utilisé dans les domaines biomédical et pharmaceutique [91]. La présence des groupes fonctionnels tels que le NH₂ et OH dans sa structure fournit la base de l'interaction avec d'autres polymères et les molécules biologiques. L'introduction des groupes hydrophobiques dans la chaîne moléculaire du chitosan peut aussi fournir de meilleures propriétés antimicrobiennes pour les composés modifiés. Sa propriété antibactérienne et sa biotoxicité dépendent de plusieurs facteurs incluant sa masse moléculaire et son degré de déacétylation [92]. Li *et al.* en 2018 [92] ont préparé des couches de microgel à base de chitosan sur des membranes de PCU (Polycarbonate uréthane) pour des applications d'implants biomédicaux. Ces matériaux ont été testés sur des souches de bactéries pathogènes d'*E.coli* et de *S.aureus* en comptant le nombre de CFU/mL pour une incubation à 37°C pendant 4h (Figure I.22). De plus, l'adhésion de ces souches bactériennes a été étudiée en présence de ces matériaux.

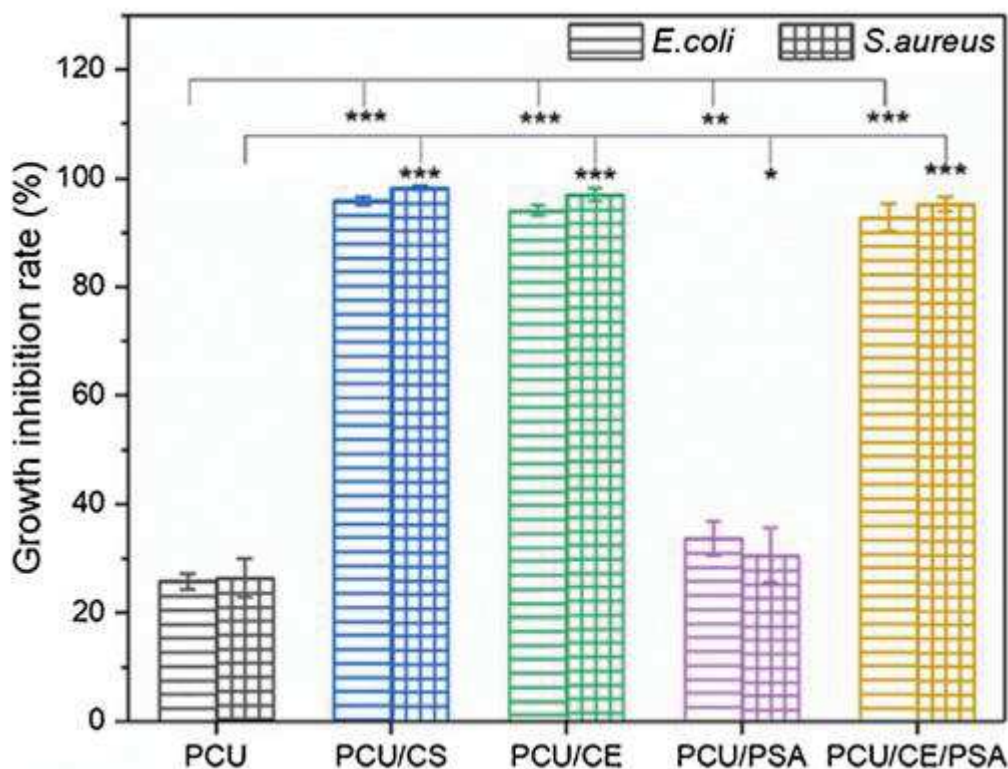


Figure I.21 Taux d'inhibition bactérienne des différents matériaux contre les souches *E.coli* et *S.aureus* après incubation à 37C pendant 4h. [92]

Les résultats de Li *et al.* [92], présentés sur la Figure I.22, comparent le taux d'inhibition de croissance pour le PCU, le PCU avec le chitosan naturel (CS), le PCU avec le chitosan-g-eugenol (CE), le PCU avec le copolymère poly(sulfobetaine méthacrylate-co-2-aminoéthyl méthacrylate) (PSA) et finalement le mélange de couches contenant le PCU, CE et PSA. Les membranes PCU/CS, PCU/CE et PCU/CE/PSA manifestent une activité antibactérienne plus importante qu'en présence de la membrane de PCU, PCU/CS ou PCU/PSA avec un taux d'inhibition supérieur à 90% pour les 2 souches de bactéries testées. Ces résultats montrent que l'activité antibactérienne provient du chitosan sous sa forme naturelle CS ou même sous sa forme modifiée CE. Le mode d'action antimicrobien du chitosan n'est pas un mécanisme simple mais un processus complexe. Ce processus résulte d'une séquence d'événements moléculaires non ciblés qui prennent place simultanément et successivement. La propriété antimicrobienne que présente le chitosan peut être due à l'interaction électrostatique entre la structure polycationique (chitosan) et les composés anioniques de la surface des microorganismes. De même, la propriété antimicrobienne du chitosan

peut dépendre de sa masse moléculaire ainsi que de sa possibilité à varier entre ses caractéristiques hydrophiles et hydrophobes [95–97].

5.3. L'alginate

L'alginate est un polymère naturel, biosourcé et biocompatible. Il possède une matrice chargée négativement Alg^- facilitant des liaisons avec les ions positifs. L'alginate ou acide alginique est un polysaccharide linéaire extrait d'algues brunes. Comme les autres phycocolloïdes (colloïde issu des algues, un colloïde étant une substance composée de micro particules dispersées dans un liquide), il s'agit d'un polymère : ceci signifie que sa molécule est constituée d'éléments tous semblables (les monomères) reliés entre eux. Les monomères dans ce cas possèdent des structures chimiques de l'acide guluronique et de l'acide mannuronique.

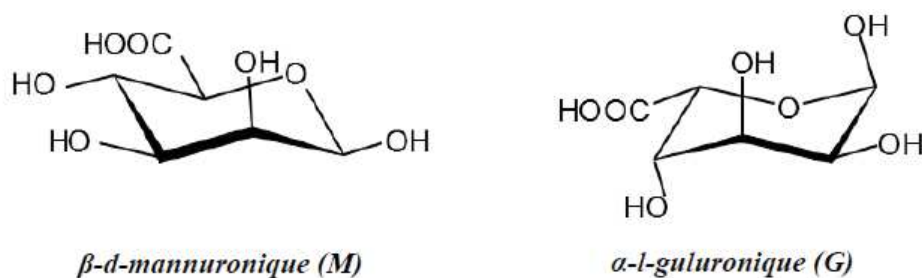


Figure I.22 Monomères de la chaîne d'alginate

Les alginates sont des copolymères à blocs composés de régions homopolymères de M (blocs MM) et G (blocs GG) séparées par des zones aux structures alternées (blocs MG) [96] comme le montre la Figure I.23. Le paramètre M/G détermine la qualité et la structure de l'alginate [97]. Celui-ci varie en fonction de deux facteurs importants : la saison et le type d'algues brunes.

Les algues brunes récoltées pour la fabrication d'alginate sont rincées, macérées et subissent une extraction en utilisant du carbonate de sodium [98]. Après filtration de l'extrait, du chlorure de sodium ou de calcium est ajouté au filtrat afin de former un précipité d'alginate de sodium ou d'alginate de calcium respectivement. A l'aide d'un traitement à l'acide chlorhydrique dilué, ce sel d'alginate peut être transformé en acide alginique.

Ce processus d'extraction permet d'obtenir de l'alginate de sodium en poudre. L'extraction donnant le meilleur rendement possible est celle effectuée en utilisant le carbonate de sodium [99].

L'alginate de sodium est soluble dans l'eau pure pour des valeurs de forces ioniques faibles. Lorsque la salinité du milieu augmente, la solubilisation est plus lente. Le pH de la solution joue aussi un rôle dans la solubilisation de l'alginate. Si le pH de l'alginate est inférieur au pK_a de l'acide mannuronique ($pK_a = 3,38$) et de l'acide guluronique ($pK_a = 3,65$), alors la formation d'hydrogel est possible. Chaque type d'alginate a une valeur de pK_a différente et dépendante de la répartition des blocs G et M sur la chaîne, la concentration en alginate et de la force ionique de la solution aqueuse. Il est préférable de diluer l'alginate dans un premier temps dans l'eau pure sous agitation [100]. La propriété la plus intéressante que possède l'alginate est sa capacité à se lier à différents cations divalents afin de former une matrice insoluble dans l'eau. L'alginate présente une affinité sélective envers ces cations en fonction de leur nature. Cette affinité dépend des forces électrostatiques, de l'encombrement stérique et de la composition de l'alginate [101]. L'ajout d'ions divalents tels que le Ca^{2+} , Cu^{2+} ou Zn^{2+} à la matrice d'alginate de sodium est généralement représenté par le modèle « egg-box » (Figure I.24).

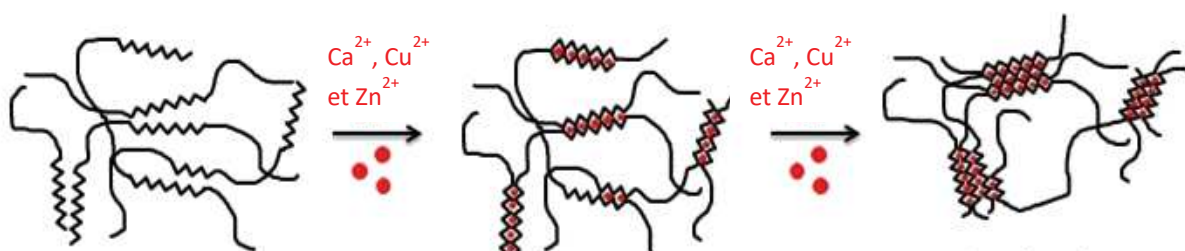


Figure I.23 Matrice d'alginate liée aux ions divalents

Lee *et al.* en 2012 [102] ont étudié les différentes propriétés des alginates telles que sa structure, sa masse moléculaire, sa solubilité, sa biocompatibilité, ses dérivées et sa gélification. Ces auteurs ont énuméré les différentes applications biomédicales telles que les applications pharmaceutiques, la couverture de plaies, culture cellulaire, régénération de tissus par des protéines et la livraison cellulaire.

Due à la diversité d'applications, son faible coût et sa biocompatibilité, l'alginate a été utilisé ces dernières années en tant que matrice contenant des agents antibactériens comme les nanoparticules et les ions [3,79,103–107]. Même si l'alginate ne possède pas de propriétés antimicrobiennes, contrairement au chitosan, sa matrice chargée négativement Alg^- favorise les liaisons ioniques avec des ions divalents.

6. Conclusion

Le but de ce travail est d'élaborer différents matériaux antibactériens biocompatibles, peu coûteux et non toxiques pour l'environnement. Nous choisissons alors une matrice à base d'alginate pour sa biocompatibilité, son faible coût et sa capacité à se lier à des ions divalents tels que le Cu^{2+} et le Zn^{2+} , présentant des propriétés antibactériennes. Ces ions sont choisis afin d'éviter la toxicité que peut produire les NPs. Nous obtiendrons ainsi des matériaux d'alginate de zinc qui vont être comparés aux matériaux d'alginate de cuivre, l'effet du cuivre étant déjà prouvé.

Ces matériaux élaborés vont être caractérisés physico chimiquement et vont être testés sur des souches de bactéries marines (Gram-) et des souches de microalgues pour des applications dans le domaine marin et sur des souches de bactéries pathogènes (Gram- et Gram+) pour des applications dans le domaine médical.

Chapitre II Techniques de caractérisation et protocoles expérimentaux

Différentes techniques expérimentales ont été utilisées durant cette thèse afin de caractériser les matériaux élaborés. Les caractérisations physico-chimiques, les protocoles expérimentaux utilisés pour les tests antimicrobiens sont décrits dans ce chapitre.

1. Techniques de caractérisation

1.1. Microscopie électronique à balayage (MEB)

La microscopie électronique à balayage (MEB) est une méthode physico-chimique utilisée pour étudier la morphologie des matériaux élaborés. Cette technique est basée sur le principe des interactions électrons-matière. Elle consiste à utiliser un faisceau d'électrons pour balayer la surface d'un échantillon, où se produisent des interactions élastiques et inélastiques entre le faisceau incident et l'échantillon, qui réémet différents types de particules : des électrons rétrodiffusés, des électrons secondaires et un rayonnement X.

Les électrons rétrodiffusés : électrons primaires renvoyés vers la source après avoir subis des interactions élastiques avec les noyaux atomiques et inélastiques avec les électrons orbitaux du solide. Leur énergie est proche de celle du faisceau incident. L'émission rétrodiffusée provient d'une zone de quelques centaines de nanomètres de profondeur.

Les électrons secondaires : électrons résultant principalement de l'ionisation des atomes du solide étudié. Ces électrons de faible énergie (≤ 50 eV) proviennent des couches situées à proximité de la surface (épaisseur d'échappement entre 1 et 10 nm)

Le rayonnement X : provient de la désexcitation des atomes.

Les électrons rétrodiffusés sont détectés par un capteur qui contrôle la brillance d'un oscilloscope cathodique dont le balayage est synchronisé avec celui du faisceau. Ainsi, l'intensité du rayonnement émis en chaque point de l'échantillon est détectée. L'interaction entre l'électron

Techniques de caractérisation et protocoles expérimentaux

et la surface de l'échantillon produit des électrons secondaires de plus faible énergie, ce signal sera amplifié avant d'être détecté et converti en un signal électrique. L'ensemble des signaux reçus par le détecteur permettent de construire une image en relief de l'échantillon.

L'analyseur est constitué d'une électrode réceptrice et d'un scintillateur, porté à un potentiel de 300kV, couplé optiquement à un multiplicateur au moyen d'un guide de lumière. Par contre, afin d'écouler les charges superficielles perturbant l'émission et déformant l'image, les échantillons doivent être conducteurs. Pour ce fait, les matériaux ont été métallisés par évaporation sous vide d'alliage Or-Palladium pendant 30s d'épaisseur nanométrique. Le principal avantage de ce dispositif est son pouvoir de résolution. En effet, la résolution est directement liée à la longueur d'onde des particules incidentes allant de 1 à 10nm. Le MEB permet d'avoir des images à différentes échelles selon le grossissement appliqué (Figure II.1).

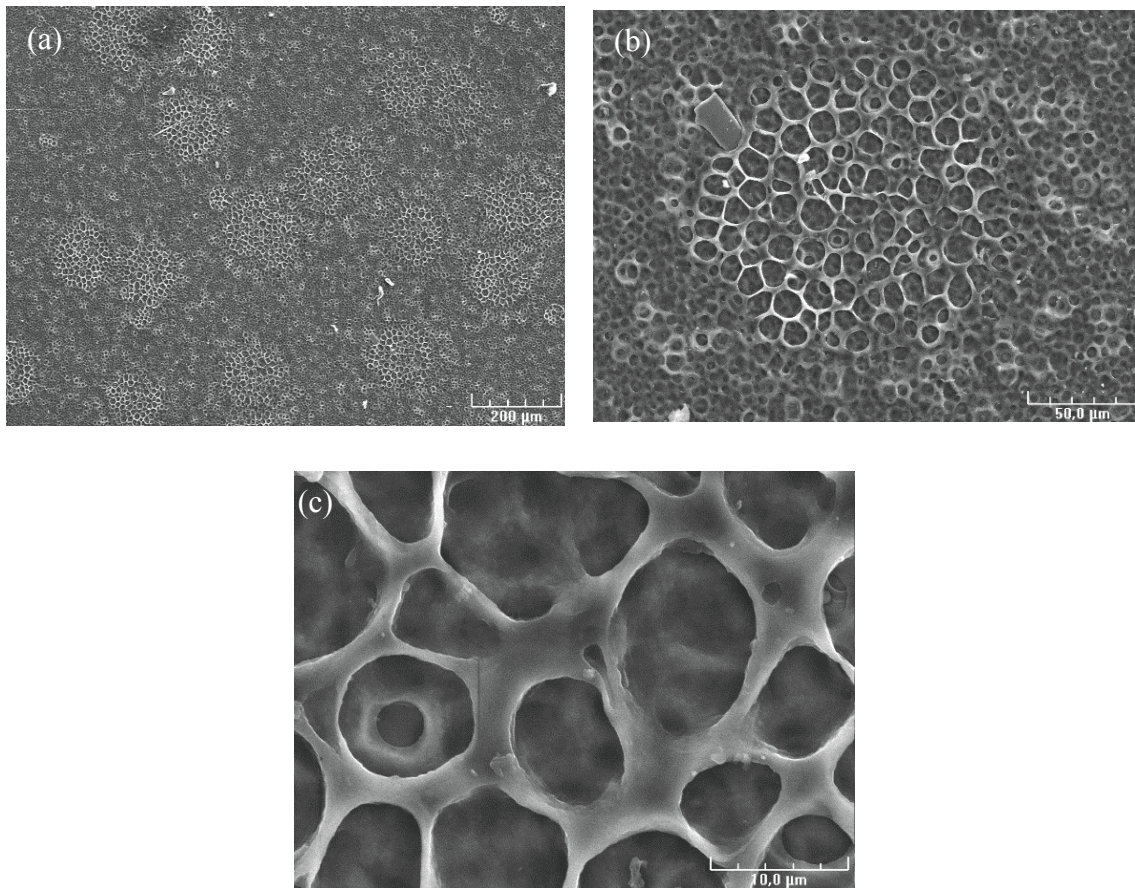


Figure II.1 Clichés MEB obtenus d'une même zone d'un matériau d'alginate poreux pour différents grossissements obtenant des images à une échelle de (a) 200 μ m, (b) 50 μ m et (c) 10 μ m

Les clichés MEB ont été effectués à l'UBO dans la Plateforme d'Imagerie, de Mesures en Microscopie (PIMM) sur un appareil de type *Hitachi S800* (Figure II.2).



Figure II.2 Microscope électronique à balayage présent à l'UBO

1.2. Analyse élémentaire par énergie dispersive à rayons X (EDX)

L'appareil *Hitachi S800* permet aussi d'effectuer des microanalyses élémentaires. L'interaction entre le faisceau d'électrons incident et les atomes présents à la surface de l'échantillon génère des photons X qui peuvent être détectés.

Chaque élément émet des photons X d'énergie bien définie correspondant à une transition électronique entre les niveaux de cœur de l'atome. Le traitement des signaux détectés permet d'obtenir une analyse semi-quantitative des éléments présents en fonction de l'énergie et de l'intensité des raies X détectées. Il est donc possible d'effectuer une analyse chimique quantitative localisée de la surface de l'objet sur une profondeur de l'ordre du micromètre [108].

1.3. Microscope à force atomique (AFM)

La microscopie à force atomique (AFM : *Atomic Force Microscopy*) permet d'obtenir des images en trois dimensions obtenus par balayage d'une surface à l'aide d'une sonde. Le premier

microscope à champ proche a vu le jour en 1982 développé par Binnig et Rohrer [109], c'est le microscope à effet tunnel (STM). Dans ce cas, la sonde est une pointe conductrice placée à quelques angströms de la surface. L'inconvénient majeur de ce microscope est qu'il n'est pas adapté à l'étude de matériaux non conducteurs tels que les polymères. En 1986, Binnig, Quate et Berger ont inventé le microscope à force atomique en mode contact afin de remédier à cet inconvénient. L'échantillon peut ainsi être isolant et l'image est obtenue par détection des forces d'interactions inter-atomiques entre la pointe et la surface [110].

Principe de fonctionnement de l'AFM

Le principe de l'AFM est de balayer la surface de l'échantillon à l'aide d'un levier muni d'une pointe afin d'avoir une image 3D (x, y et z) avec une résolution spatiale allant de quelques dizaines de microns au dixième de nanomètre (Figure II.3)

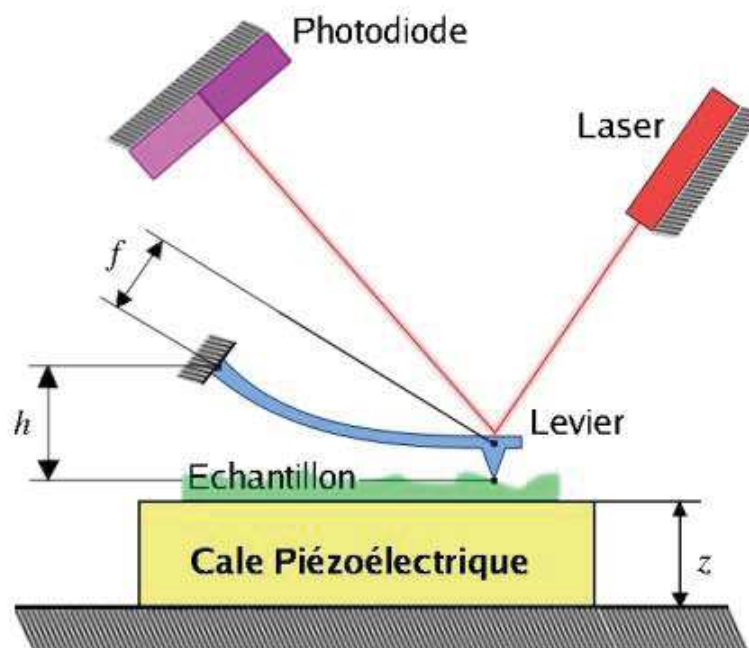


Figure II.3 Schéma de structure d'un microscope à force atomique

La troisième dimension correspond au déplacement vertical (z) de la cale piézoélectrique, si la hauteur (h) entre le support fixe du levier et le point de contact M est constant. Or, h dépend de la déflexion (f) mesurée par le système photodiode-laser. L'ensemble de tous ces éléments permet de balayer la surface à h constant en asservissant z .

Le microscope utilisé lors de cette étude est un microscope à force atomique AFM Bruker multimode 8 équipé d'un module PeakForce. Il permet d'obtenir une topographie de la surface en mode contact (invasif) avec lequel nous pouvons obtenir une cartographie de la conductance, l'adhésion, la déformation, la dissipation et la rugosité ; en mode tapping (contact intermittent) avec la possibilité d'avoir une cartographie magnétique ou électrique ; et également en mode peak force qui permet d'avoir une cartographie des propriétés mécaniques. Il est possible de même de travailler suivant les modes dans des conditions particulières : mesure en mode torsion, mesure en mode force, mesure en atmosphère contrôlée, mesure en cellule liquide, mesure en goutte d'eau, mesure en chauffant l'échantillon jusqu'à 200°C et mesure en refroidissant l'échantillon jusqu'à -30°C. Lors de cette thèse, nous avons utilisé le microscope à force atomique pour étudier la rugosité et éventuelle porosité de nos échantillons.

1.4.Spectroscopie de photoélectrons X (XPS)

La spectroscopie de photoélectrons induits par rayons X (XPS) est une méthode physique d'analyse physico-chimique. Elle repose sur l'effet photoélectrique découvert par Hertz en 1887 et expliqué par Einstein en 1905. L'échantillon est irradié par des rayons X monochromatiques, ce qui provoque l'ionisation des atomes par effet photoélectrique. L'énergie cinétique des électrons émis (ou photoélectrons) est mesurée, on obtient alors le spectre électronique en fonction de l'énergie. En considérant la conservation de l'énergie, il est possible de déterminer l'énergie de liaison des électrons émis [108]. Cette méthode de caractérisation est non destructive et elle permet de sonder les premières couches atomiques du matériau étudié. La valeur des énergies de liaisons dépend de l'environnement chimique des éléments photoionisés ainsi que de leur degré d'ionisation.

1.4.1. Processus mis en jeu en XPS

En considérant l'énergie du photon incident $h\nu$, E_l l'énergie de liaison, l'énergie cinétique du photoélectron E_0 et Φ_e la fonction de travail de l'échantillon, le bilan énergétique du processus de photoémission s'écrit alors :

$$h\nu = E_l + \Phi_e + E_0 \quad (2.1)$$

Dans les conditions expérimentales, l'énergie cinétique du photoélectron E_c est définie en fonction du niveau de vide du spectromètre (Figure II.4). Cependant, ce dernier étant en contact électrique avec l'échantillon, leurs niveaux de Fermi s'égalisent et le bilan énergétique s'écrit finalement :

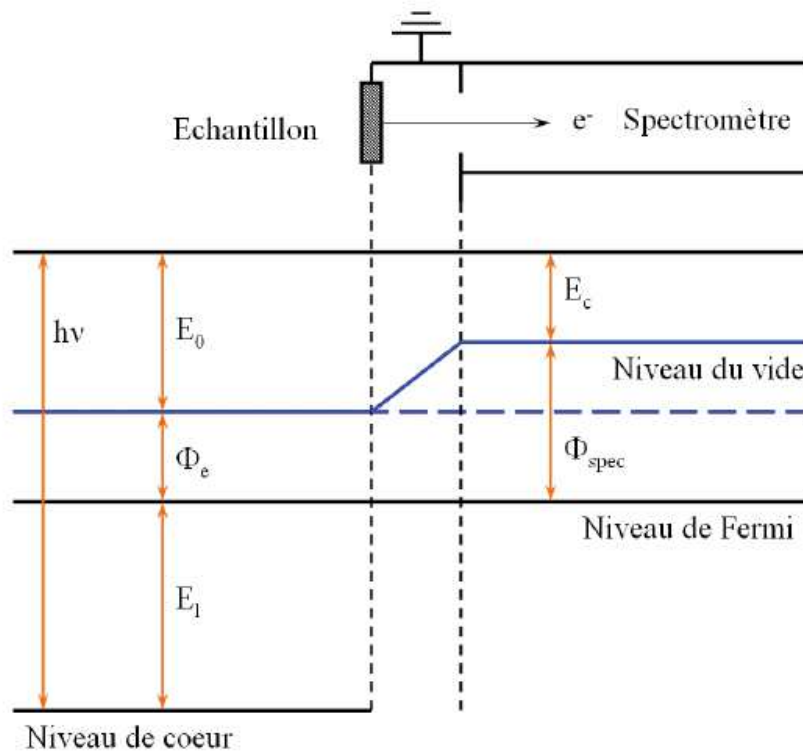


Figure II.4 Diagramme d'énergie en XPS, cas d'un échantillon métallique en équilibre thermodynamique avec le spectromètre

$$h\nu = E_l + \phi_{spec} + E_c \quad (2.2)$$

où Φ_{spec} correspond au travail de sortie du spectromètre. Afin de déterminer l'énergie de liaison, il faut alors de procéder à une calibration des énergies de liaison utilisant par exemple la raie de carbone C(1s) à 284,6 eV [111].

1.4.2. Dispositif expérimental

Le dispositif expérimental XPS a été développé au laboratoire *Lab-STICC* (Figure II.5). Il est constitué d'une source de photoélectrons X, d'un porte échantillon, d'un système de focalisation électronique, d'un spectromètre, d'un détecteur d'électrons et d'un dispositif d'abrasion ionique. La source X utilisée pour ces travaux est non monochromatique : Al K α 1486,6 eV. L'émission des photons X est obtenue par bombardement de l'anode d'aluminium Al par des électrons énergétiques. Le spectre d'émission est constitué d'un fond continu en énergie constituant le rayonnement de freinage de Bremsstrahlung, ainsi que de raies d'émissions caractéristiques de l'anode d'Al utilisée.

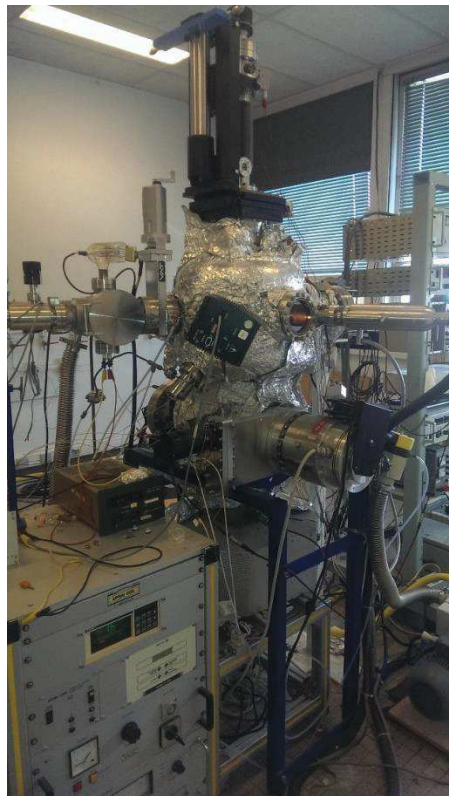


Figure II.5 Dispositif expérimental de spectroscopie de photoélectrons X au Lab-STICC

Techniques de caractérisation et protocoles expérimentaux

La source n'étant pas complètement monochromatique, elle émet une raie principale $K\alpha$, mais aussi des raies moins intenses. Ceci provoque l'apparition de pics satellites qui peuvent interférer avec le pic principal sur le spectre XPS. Le Tableau II.1 présente les caractéristiques des différentes raies d'émission pour la source d'aluminium. L'axe central de la source X est fixé à 5° par rapport à la normale à l'échantillon et le faisceau X irradie une surface de 1 cm^2 .

Tableau II.1 Caractéristiques de la source X d'aluminium

Elément	Raie d'excitation	$\alpha_{1,2}$	α_3	α_4	α_5	α_6
Al	Energie (eV)	1486,6	1495,3	1496,9	1503,9	1506,9
	Intensité relative	100	8	4	0,5	0,5
	Largeur mi-hauteur (eV)	0,85				

Le système de focalisation électronique est constitué d'un ensemble de lentilles électrostatiques focalisant les électrons émis de l'échantillon sur l'entrée du spectromètre. Ce dernier est un analyseur dispersif de type cylindrique miroir (CMA). Il est constitué de deux cylindres coaxiaux de rayon R_1 et R_2 . En établissant une différence de potentiel ΔV entre les deux secteurs cylindriques, un champ électrique est formé qui disperse la trajectoire des électrons incidents en fonction de l'énergie cinétique par rapport à une énergie caractéristique de l'analyseur : l'énergie d'analyse E_α , ou énergie de passage. En fonction de la constante de l'analyseur K , cette énergie peut s'exprimer de la façon suivante :

$$\frac{E_\alpha}{\Delta V} = \frac{K}{\ln \frac{R_1}{R_2}} \quad (2.3)$$

Ainsi, seuls les électrons ayant une énergie de E_α traversent l'analyseur et atteignent la fente de sortie où un détecteur d'électrons est placé. Ce dernier est un channeltron qui joue un rôle de multiplicateur d'électrons. Le dispositif est ensuite relié à un dispositif d'acquisition piloté par LabView[®].

La technique XPS requiert un dispositif sous ultravide, correspondant à une pression résiduelle de 10^{-9} - 10^{-10} mbar. Dans le but d'atteindre cette pression, deux étapes de pompages sont nécessaires. Le pompage primaire est assuré par des pompes mécaniques garantissant un vide de l'ordre de 10^{-2} mbar. Ce dernier est couplé à un pompage secondaire. Trois types de pompes sont utilisées : une pompe turbomoléculaire, une pompe ionique ainsi qu'une pompe à sublimation de titane. Un étuvage de l'enceinte permet préalablement de dégazer les parois de la chambre d'analyse et d'en extraire l'eau résiduelle. Par ailleurs, un système de vannes et le sas d'introduction garantissent une mise en place de l'échantillon sans remise à l'air de la chambre d'analyse.

2. Protocoles expérimentaux pour l'évaluation anti-microbienne

Afin d'évaluer la bioactivité contre les organismes responsables du microfouling (bactéries en milieu médical, bactéries marines et microalgues), il est important d'évaluer l'inhibition d'adhésion cellulaire aux puits ainsi que l'inhibition de croissance. Dans cette partie, nous détaillerons les différents protocoles expérimentaux entrepris pour l'étude de l'activité bactérienne et microalgale en présence de nos matériaux.

2.1. Test antibactérien (bactéries pathogènes)

Ce protocole expérimental est utilisé dans les travaux pour déterminer la zone d'inhibition en présence des matériaux élaborés avec des souches de bactéries ATCC présentes dans le milieu médical *E.coli* et *S.aureus*. Ces expériences ont été effectués au Liban.

Cette expérience consiste à étaler une suspension bactérienne à l'aide d'un écouvillon stérile sur un milieu de culture agar TSA (TSA : *Tryptic Soy Agar*). Ce milieu de culture est constitué de : peptone de caséine (17 g/L), peptone de farine de soja (3 g/L), D(+)-glucose (2,5 g/L), chlorure de sodium (5 g/L) et de phosphate dipotassique (2,5 g/L). Le matériau solide à tester est ensuite placé dans la boîte de pétri contenant le milieu de culture ainsi que la suspension bactérienne étalée. La

boîte de pétri est alors incubée pendant 48h à 37°C. Une fois la période d'incubation terminée, nous mesurons à l'aide d'une règle graduée le diamètre de la zone d'inhibition de croissance des bactéries. Un exemple de zone d'inhibition est présenté dans la Figure II.6.



Figure II.6 Zone d'inhibition obtenue en présence d'un film d'alginate de zinc déposé sur acier pour la souche *S.aureus*

2.2. Test antimicroalgues marines

Les matériaux élaborés ont été testés sur deux souches de microalgues (*Halamphora Coffeaeformis* AC 713 et *Cylindrotheca Closterium* AC 170) à Biodimar – Université de Bretagne Occidentale, Brest dans le but d'évaluer leurs croissance et adhésion. Ces souches sont utilisées dans les études d'antifouling puisqu'elles forment une couche visqueuse résistante sur les surfaces marines [15,112]. Ces souches de microalgues sont considérées comme pouvant faire partie des souches pionnières du biofouling.

Nous avons placé les matériaux préparés dans une plaque de 24 puits (4 lignes et 6 colonnes) de façon à avoir une ligne de 6 répliques pour chaque matériau. Chaque plaque est utilisée pour une souche donnée afin d'éviter toute contamination. La plaque incluant les matériaux est stérilisée sous rayonnement UV pendant 30 min avant l'expérience.

Techniques de caractérisation et protocoles expérimentaux

Un milieu de culture f/2-Guillard est préparé [114]. Ce milieu consiste à ajouter à de l'eau de mer filtrée et stérilisée par autoclave des solutions de nitrate NaNO_3 , de phosphate NaH_2PO_4 , des traces de métaux (FeCl_3 , Na_2EDTA , CuSO_4 , Na_2MoO_4 , ZnSO_4 , CoCl_2 et MnCl_2), du silicate Na_2SiO_3 et une solution de vitamines : Thiamine HCl (vitamine B₁), biotin (vitamine H) et cyanocobalamin (vitamine B₁₂). Le volume de l'eau de mer utilisé étant de 1L, les solutions d'oligo-éléments et vitamines sont ajoutés avec des volumes de 1mL de chaque solution (Tableau II.2).

Tableau II.2 Composition du milieu de culture préparé f/2 pour microalgues marines

Composant	Quantité	Concentration molaire dans la solution finale
NaNO₃	1 mL	$8,82 \times 10^{-4}$ mol/L
NaH₂PO₄ H₂O	1 mL	$3,62 \times 10^{-5}$ mol/L
Na₂SiO₃ 9H₂O	1 mL	$1,06 \times 10^{-4}$ mol/L
Traces de métaux	1 mL	
FeCl ₃ 6H ₂ O	3,15 g	$1,17 \times 10^{-5}$ mol/L
Na ₂ EDTA 2H ₂ O	4,36 g	$1,17 \times 10^{-5}$ mol/L
CuSO ₄ 5H ₂ O	1 mL	$3,93 \times 10^{-8}$ mol/L
Na ₂ MoO ₄ 2H ₂ O	1 mL	$2,6 \times 10^{-8}$ mol/L
ZnSO ₄ 7H ₂ O	1 mL	$7,65 \times 10^{-8}$ mol/L
Vitamines	1 mL	
Thiamine HCl (vitamine B ₁)	200 mg	$2,96 \times 10^{-7}$ mol/L
Biotin (vitamine H)	1 mL	$2,05 \times 10^{-9}$ mol/L
Cyanocobalamin (vitamine B ₁₂)	1 mL	$3,69 \times 10^{-10}$ mol/L

La souche de microalgues à tester est ajoutée au milieu de culture f/2 avec un ratio de 1% (1mL de la souche de microalgues dans 100mL de milieu de culture). 1mL de cette solution est placée dans chaque puit de la plaque (0,1 mg/mL chlorophylle a.).

Techniques de caractérisation et protocoles expérimentaux

La plaque de 24 puits, contenant la solution de microalgues ainsi que les matériaux à tester, est ensuite placée sur une feuille blanche, afin de bien réfléchir la lumière (irradiance : $140 \mu\text{mol.m}^{-2} \text{s}^{-1}$) pendant une semaine à température ambiante sous une exposition de lumière constante. La Figure II.7 présente la plaque de 24 puits après une semaine d'incubation pour une souche de microalgues.



Figure II.7 *Plaque de 24 puits en présence des films déposés sur acier pour une souche de microalgues après une semaine d'incubation*

Après une semaine de culture, les matériaux sont retirés de chaque puit. Les inhibitions de croissance et d'adhésion de la souche de microalgues sont mesurées. Les microalgues présentes au fond de chaque puit sont aspirées et déposées dans une nouvelle plaque dans laquelle sont ajoutées 2mL de méthanol. Pour l'étude de l'adhésion des microalgues aux puits, la plaque initiale est rincée à l'eau désionisée et 1mL de méthanol est ajouté dans chaque puit. Les deux plaques ainsi obtenues (plaque de croissance et plaque d'adhésion) sont enveloppées dans du papier aluminium et placées au réfrigérateur pendant 30 min. La croissance de microalgues est estimée par une quantification de chlorophylle a. en utilisant une méthode fluorimétrique avec une longueur d'onde d'excitation $\lambda = 485 \text{ nm}$ et d'émission $\lambda = 645 \text{ nm}$. L'adhésion des microalgues est déterminée d'une façon identique.

La première ligne de la plaque correspondant au contrôle (solution de microalgues sans matériau), nous présentons les valeurs obtenues sous forme d'un pourcentage d'inhibition par rapport à ce contrôle. Un pourcentage d'inhibition de 0% par rapport au contrôle signifie que la concentration algale n'a pas été affectée par le matériau testé (taux de chlorophylle a. similaire à celui du contrôle). Par contre, un pourcentage d'inhibition de 100% signifie que la concentration algale est désormais nulle. Le matériau testé aurait inhibé la totalité des microalgues.

En ce qui concerne l'adhésion des microalgues, un pourcentage d'inhibition de 0% par rapport au contrôle signifie que l'adhésion des microalgues n'a pas été affectée par le matériau présent dans le puit. Alors qu'un pourcentage d'inhibition d'adhésion de 100% révèle que les microalgues n'ont pas adhéré au puit.

2.3. Test antibactérien (bactéries marines)

Le protocole expérimental utilisé afin d'évaluer l'adhésion et la croissance des bactéries marines est décrit dans ce qui suit. Les souches de bactéries marines utilisées lors de cette étude sont : *Halomonas aquamarina* ATCC 14400 (HA), *Vibrio aesturianus* ATCC 35048 (VA), *Vibrio harveyi* ATCC 14126 (VH) et la *Pseudoalteromonas elyakovii* ATCC 700519 (PE). Ce sont les souches bactériennes marines représentatives des espèces responsables du fouling marin [112].

De manière similaire aux tests sur les microalgues, nous stérilisons sous rayonnement UV la plaque de 24 puits contenant les matériaux. Nous contrôlons la concentration initiale des bactéries en mesurant la densité optique (DO) de la solution à une longueur d'onde $\lambda = 620$ nm. En effet, la DO de la solution bactérienne obtenue par spectrophotomètre est directement liée à la concentration (CFU/mL) de cette dernière d'après la table d'Amsterdam. Une remise en suspension spécifique pour chaque valeur obtenue de DO est effectuée dans le but d'aboutir à une concentration de $2 \cdot 10^8$ CFU/mL. Le milieu de culture est préparé en ajoutant de la peptone bactériologique neutralisé à 0,5% dans de l'eau de mer stérile. 1mL de la solution ainsi préparée (bactéries + milieu de culture) est versé dans chaque puit de la plaque stérilisée contenant les matériaux. La plaque est ainsi laissée

sous lumière naturelle pendant 48 h d'incubation avant analyse. La Figure II.8 présente une plaque de 24 puits contenant les matériaux à tester après incubation.



Figure II.8 Plaque de 24 puits en présence des matériaux à tester pour une souche de bactéries marines après 24h d'incubation

Après 48 h de culture à température ambiante (20°C), il est alors possible d'évaluer la croissance et l'adhésion des bactéries. Pour étudier la croissance, il faut extraire de chaque puit 100µL à deux reprises (afin d'obtenir 12 répliques pour chaque matériau testé) et mettre chaque extraction dans un puit d'une plaque de 96 puits. La plaque de 96 puits (plaque de croissance) est étudiée au spectrophotomètre pour une longueur d'onde d'absorbance de $\lambda=620$ nm par mesure de la densité optique.

Afin d'étudier l'adhésion des bactéries à la surface du puit, la plaque de culture initiale est rincée à l'eau désionisée. Une solution de crystal violet est préparée avec une concentration de 0,1%. 1 mL de crystal violet est ajouté à chaque puit afin de teindre les bactéries toujours en vie adhérant aux parois des puits. Après 20 min, la solution de crystal violet est retirée et la plaque est rincée à l'eau désionisée. Après un temps de séchage suffisant (20 min), 1mL d'éthanol est ajouté à chaque puit afin de diluer les bactéries toujours présentes teintées au crystal violet et d'obtenir une solution homogène qui est ensuite examinée au spectrophotomètre. L'absorbance est alors mesurée à 595 nm. Nous présentons les résultats ainsi obtenus en fonction de pourcentage d'inhibition de croissance et d'adhésion en comparant au contrôle.

3. Evolution du potentiel d'abandon (OCP : *Open Circuit Potential*)

Comme nous l'avons déjà expliqué, l'OCP est une technique expérimentale permettant de mesurer la différence de potentiel entre une électrode de travail et une électrode de référence en l'absence de courant. Cette technique simple permet de déterminer le potentiel de corrosion d'un matériau. Dans notre étude, nous avons mesuré l'évolution du potentiel d'aciers inoxydables en milieu marin naturel [45–55]. Les mesures de potentiel ont été enregistrées de façon continue durant l'expérience : le montage expérimental a été relié à un système d'acquisition automatique.

L'expérience simule un cas réel à l'aide d'une alimentation en eau de mer naturelle renouvelée à 1L/h grâce aux pompes hydrostatiques. Il s'agit de mettre en évidence l'effet de nos matériaux sur la croissance et l'adhésion des microorganismes marins présents dans l'océan.

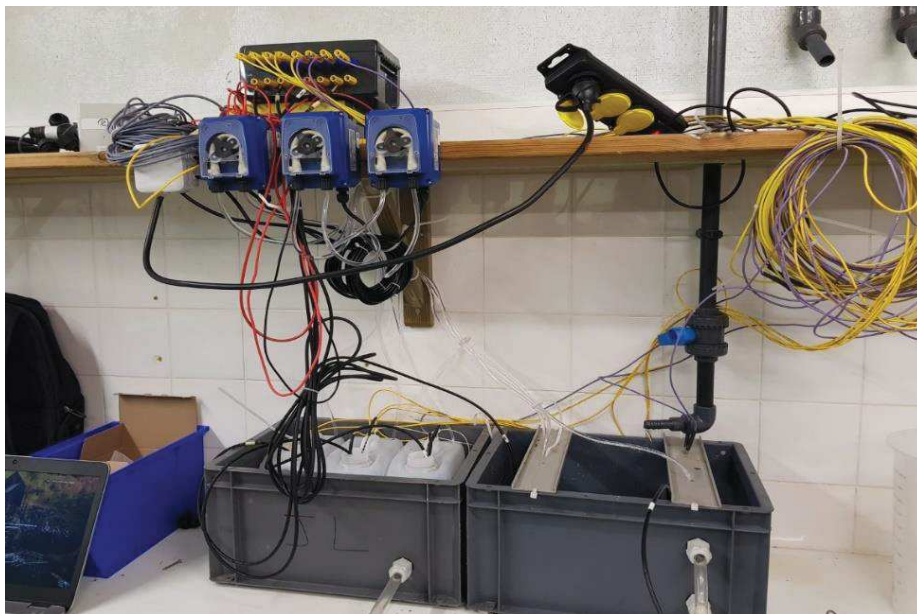


Figure II.9 Montage expérimental d'OCP monté par l'Institut de corrosion afin d'observer la montée du biofilm sur l'électrode d'Inox dans un système ouvert

Pour ce faire, trois bacs ont été utilisés. Le premier dit témoin ne contient que l'eau naturelle sans matériau. Il nous renseigne par conséquent sur le comportement réel de l'acier inoxydable en

immersion dans l'eau de mer. Deux autres bacs contenant chacun quatre cubes d'hydrogels de nature différente sont aussi remplis d'eau naturelle. Ils devraient nous renseigner sur leur comportement vis à vis des microorganismes marins (bactéries et microalgues). Le montage expérimental est présenté sur la Figure II.9.

L'eau de mer est pompée dans la rade de Brest puis filtrée. Elle alimente les trois bacs simultanément. Chaque bac contient un système à trois électrodes : deux électrodes d'Inox 2205 et une électrode de référence ECS. L'inox 2205 (inox poli miroir) est choisi dans cette expérience puisqu'il est plus résistant à la corrosion que l'inox 316L. La différence de potentiel est mesurée pour chaque bac pendant 30 jours. Cette expérience a été effectuée au mois de Décembre à Brest. Un schéma explicatif de chaque bac est présenté dans la Figure II.10.

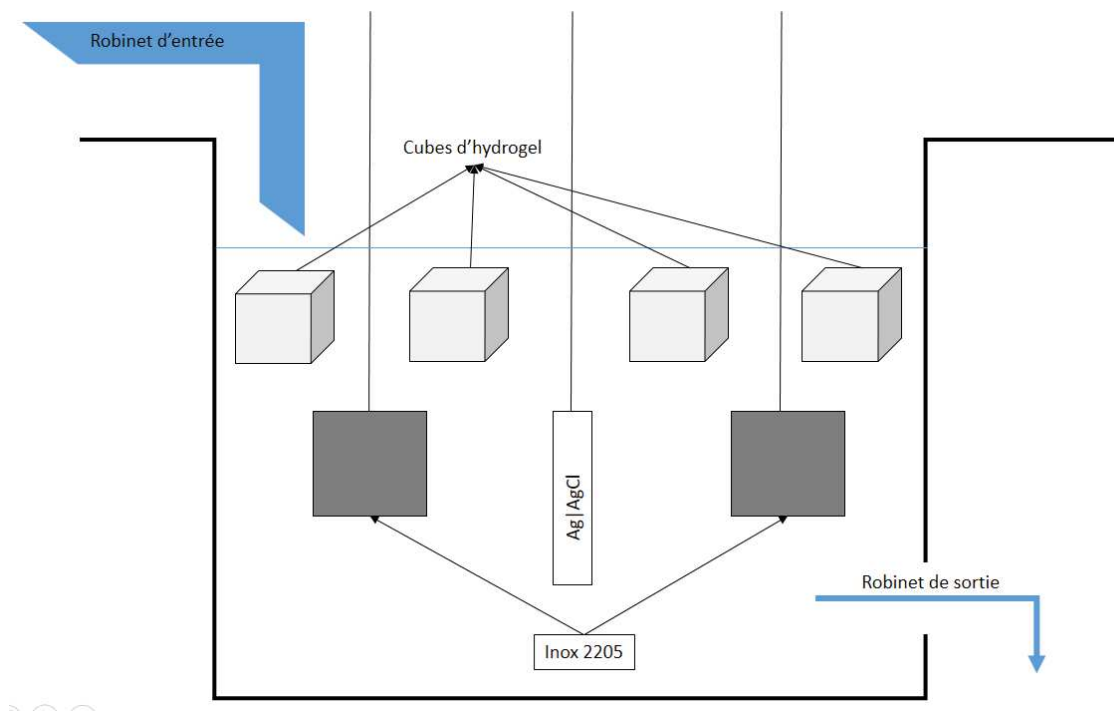


Figure II.10 Montage expérimental montrant le contenu de chaque bac

Chapitre III Matériaux à base d'alginate testés sur des bactéries pathogènes

Dans le milieu médical, la présence de bactéries pathogènes entraîne la formation de biofilms bactériens sur les implants orthopédiques ou dentaires et sur les outils médicaux tels que les cathéters, les outils chirurgicaux, les biocapteurs...

Nous nous proposons alors, dans ce chapitre, d'élaborer des films antibactériens à base d'alginate. La propriété antibactérienne de ces matériaux provient de l'intégration de cuivre et de zinc dans la matrice d'alginate. Ces matériaux sont des hydrogels de différentes porosités ou des revêtements. Ils pourront être utilisés dans diverses applications. Ainsi, pour recouvrir une surface non métallique telle que des plaies, il est intéressant d'utiliser des films d'alginate. Alors que, pour des surfaces métalliques telles que le titane ou l'acier inoxydable, il est alors préférable d'utiliser des films minces déposés sur ces métaux.

Les films élaborés dans ce chapitre sont caractérisés par des techniques physico-chimiques avant d'être testés sur des souches pathogènes répandues dans le milieu médical telles que l'*E.coli* et *S.aureus*.

1. Méthodes d'élaboration et caractérisations physico-chimiques

L'alginate de sodium utilisé pour tous les matériaux provient de Sigma Aldrich 71238. Ce dernier présent sous forme de poudre jaunâtre possède un rapport M/G = 0,85. Le rapport M/G définit le ratio entre les blocs d'acide mannuroniques et les blocs d'acide guluroniques. Pour un rapport inférieur à 1, comme dans l'alginate utilisé dans ces travaux, les blocs d'acide guluroniques sont les plus abondants. Ces blocs sont considérés responsables des liaisons intermoléculaires avec les ions divalents [102]. Pour ce fait, l'alginate 71238 choisi présente une forte gélification avec les ions divalents.

1.1.Films d'hydrogels

1.1.1. Méthode d'élaboration

Les films d'hydrogels ont été élaborés par la méthode dite *casting*. Nous avons procédé à verser dans un moule une solution d'alginate de sodium préparée de concentration de 50 g/L et la laisser sécher à température ambiante pendant 48h. Lorsque la solution versée est sèche, le film d'alginate de sodium produit est épilé. Ce film soluble dans l'eau devient insoluble après un trempage dans des solutions ioniques possédants des ions divalents pendant 24h. Les solutions ioniques choisies dans ces travaux sont du chlorure de calcium ($C = 0,36 \text{ mol/L}$), du sulfate de cuivre ($C = 0,1 \text{ mol/L}$) et de l'acétate de zinc ($C = 0,1 \text{ mol/L}$). Nous obtenons ainsi des films d'alginate de calcium, d'alginate de cuivre et d'alginate de zinc respectivement. Les films sont ensuite retirés et rincés à l'eau déionisée dans le but de se débarrasser des excès d'ions. Un schéma explicatif de la méthode d'élaboration de ces films est représenté dans la Figure III.1.

Matériaux à base d'alginate testés sur des bactéries pathogènes

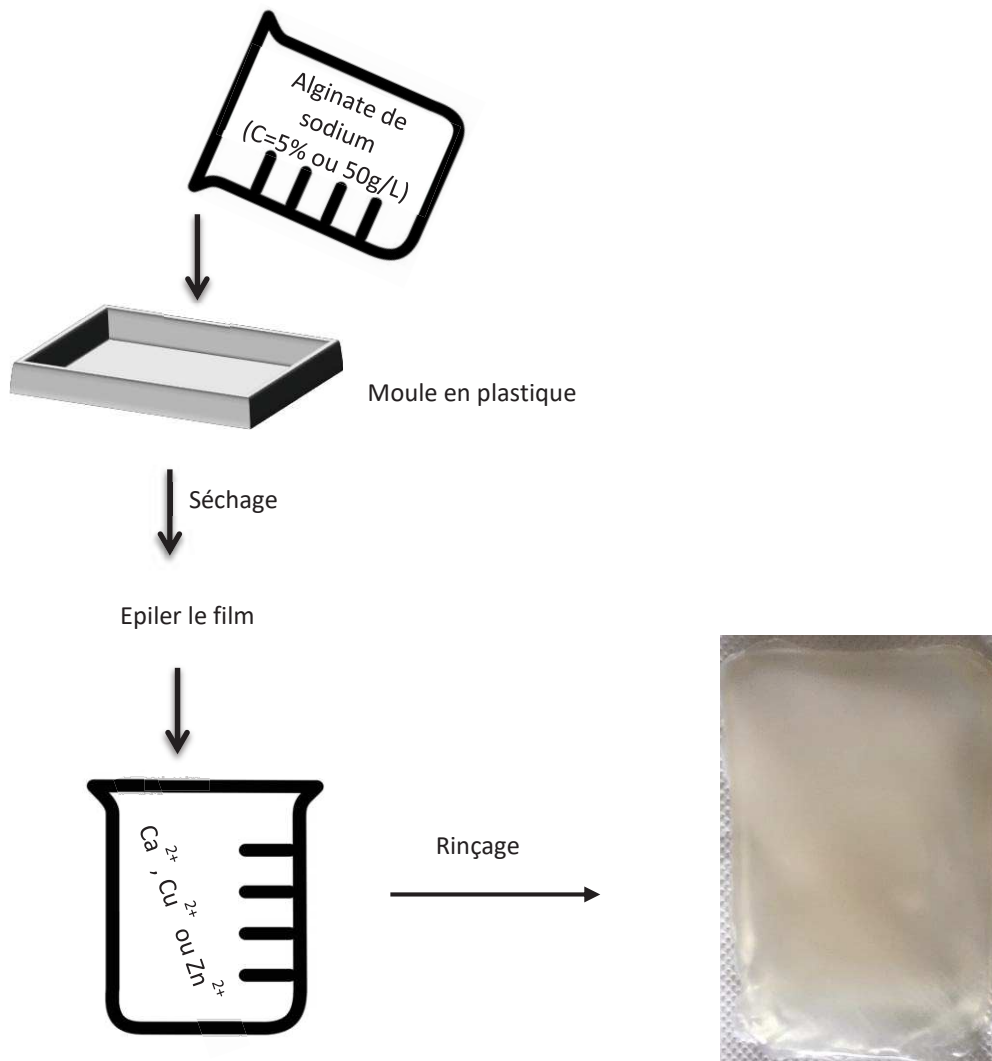


Figure III.1 Schéma explicatif de la méthode d'élaboration des films d'hydrogels

L'épaisseur des films fabriqués dépend de la quantité de la solution d'alginate de sodium versée, de sa concentration et de la dimension du moule. Les films élaborés durant nos travaux ont une épaisseur millimétrique ($e \approx 0,6$ mm) en lien avec la concentration de la solution utilisée (50 g/L), la quantité versée de cette dernière ($m = 8$ g) et la taille du récipient (boîte de pétri de diamètre $d = 55$ mm). Les films d'hydrogel insolubles élaborés peuvent être utilisés sous forme humide ou sec (Figure III.2) suivant l'application.

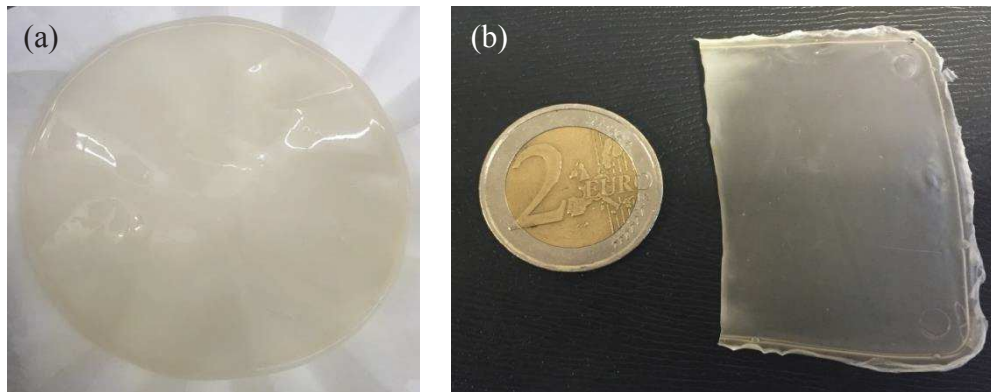


Figure III.2 Films d'hydrogel alginate de calcium élaborés par la méthode de casting sous aspect (a) humide et (b) sec

La surface des films d'hydrogel élaborés est étudiée à l'aide d'un microscope électronique à balayage (MEB). Cette étude est complétée par la détermination de la composition chimique des matériaux effectuée par analyse élémentaire.

1.1.2. Microscope électronique à balayage (MEB) et analyse élémentaire par énergie dispersive aux rayons X (EDX)

Plusieurs films d'hydrogel ont été étudiés à l'aide du MEB. Nous présentons sur la Figure III.3, les films d'hydrogel d'alginate de sodium (a), de calcium (b), de cuivre (c) et de zinc (d).

Matériaux à base d'alginate testés sur des bactéries pathogènes

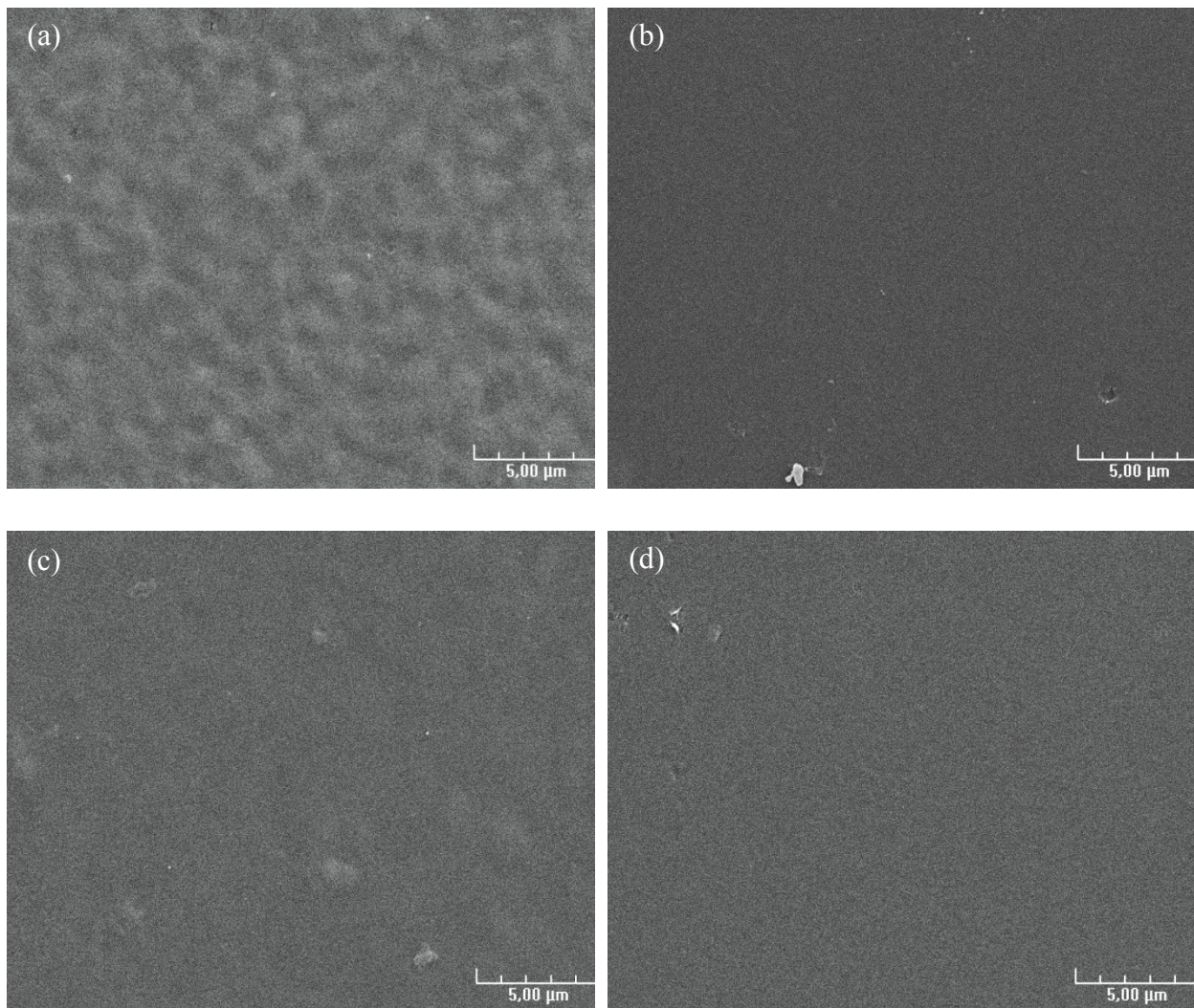


Figure III.3 Clichés MEB des films d'hydrogel non poreux élaborés à base de (a) sodium, (b) calcium, (c) cuivre et (d) zinc pour une échelle de 5µm

Comme le montre la Figure III.3, pour une échelle de 5µm, les différents films d'hydrogel présentent une surface lisse non poreuse. Une analyse élémentaire par énergie dispersive à rayons X a été effectuée sur les différents films présentés dans la figure ci-dessus. Les résultats d'EDX obtenus sont regroupés dans le Tableau III.1.

Matériaux à base d'alginate testés sur des bactéries pathogènes

Tableau III.1 Tableau de composition atomique des films d'hydrogel à base de sodium, calcium, cuivre et zinc

Matériaux	C	O	Na	Ca	Cu	Zn	Cl
Alginate de sodium A(Na)	70,7	17,9	11,4	-	-	-	-
Alginate de calcium A(Ca)	74,4	15,4	8,7	0,5	-	-	1,0
Alginate de cuivre A(Cu)	69,5	27,6	0,9	-	2,0	-	-
Alginate de zinc A(Zn)	71,7	24,3	-	-	-	4,0	-

Nous remarquons, d'après les données du Tableau III.1, un pourcentage atomique important de carbone et d'oxygène ceci est dû aux chaînes polymériques de l'alginate constituées de C et O. De plus, nous observons une présence de sodium très importante dans les films d'alginate de sodium et de calcium. Alors que pour le film d'alginate de cuivre, nous observons des traces de sodium. Le sodium est présent dans tous les matériaux à l'exception de celui à base de zinc. Ceci prouve qu'en trempant les films d'hydrogels de sodium dans les diverses solutions, les atomes de Ca, Cu et Zn viennent se substituer en partie ou totalement au Na dans la matrice d'alginate. La substitution de ces ions divalents au Na est plus ou moins efficace en accord avec la littérature [79,96,101].

1.1.3. Spectroscopie des photoélectrons X (XPS)

Les résultats EDX présentés dans le paragraphe précédent prouvent l'existence des ions divalents mais pas leur état ionique. Jiao *et al.* [115] en 2017 ont étudié l'effet antibactérien du cuivre et du zinc sous leur forme ionique. Ils concluent que l'effet antibactérien de ces ions est dû à l'attraction par forces électrostatiques de la membrane des bactéries chargée négativement aux ions chargés positivement.

Dans le but de confirmer la présence du cuivre et du zinc sous leur forme ionique, des mesures XPS ont été effectuées sur l'alginate de cuivre et l'alginate de zinc et ont été comparées à l'alginate de sodium. Les résultats sont présentés sur les Figures III.4, III.5, III.6, III.7 et III.8. Les spectres C(1s), observés sur la Figure III.4, présentent une structure large qui peut être décomposée en trois parties : C-C (284,8 eV), C-O (286,4 eV) et C=O (288,2 eV) [115,116]. Les spectres ne sont pas identiques ce qui révèle un changement dans le taux de chaque liaison de carbone par rapport aux ions ajoutés dans la matrice d'alginate. Les trois courbes présentent un pic principal à 284,8 eV attribué aux liaisons C-C ainsi qu'un épaulement à 286,4 eV correspondant aux liaisons C-O. La courbe de l'alginate de zinc présente un épaulement secondaire plus accentué à 288,2 eV désignant les liaisons C=O carbonyles (Figure III.4). Nous considérons alors que les liaisons C-C et C=O sont plus abondantes dans le cas du zinc alors que les liaisons C-O sont plus abondantes pour les matériaux à base de sodium et de cuivre. Cette différence de spectres peut être attribuée à la présence d'éléments différents (Na, Cu et Zn) dans chaque matériau.

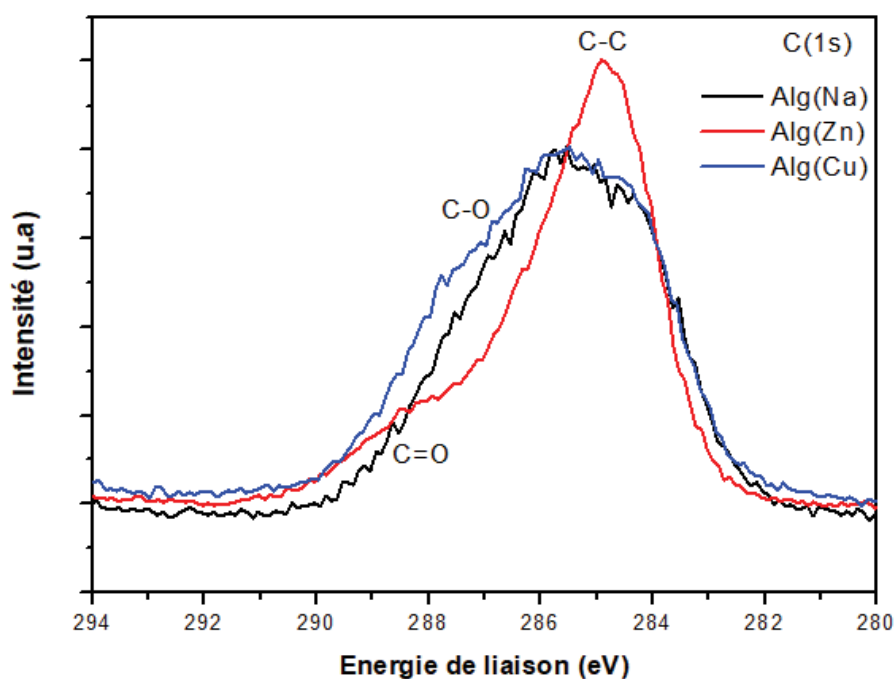


Figure III.4 Spectres XPS de C(1s) pour les matériaux d'alginate de sodium (noir), de cuivre (bleu) et zinc (rouge)

La Figure III.5 présente le spectre de l'oxygène 1s pour l'alginate de sodium, de cuivre et de zinc. Pour les trois matériaux, les spectres O(1s) présentent une structure unique et large à 532,0 eV attribuée aux groupes hydroxyle / carboxyle en accord avec la composition de l'alginate [117,118]. Le pic correspondant à l'oxyde métal (530,0 eV) n'existe pas ce qui montre l'absence de métaux oxydés.

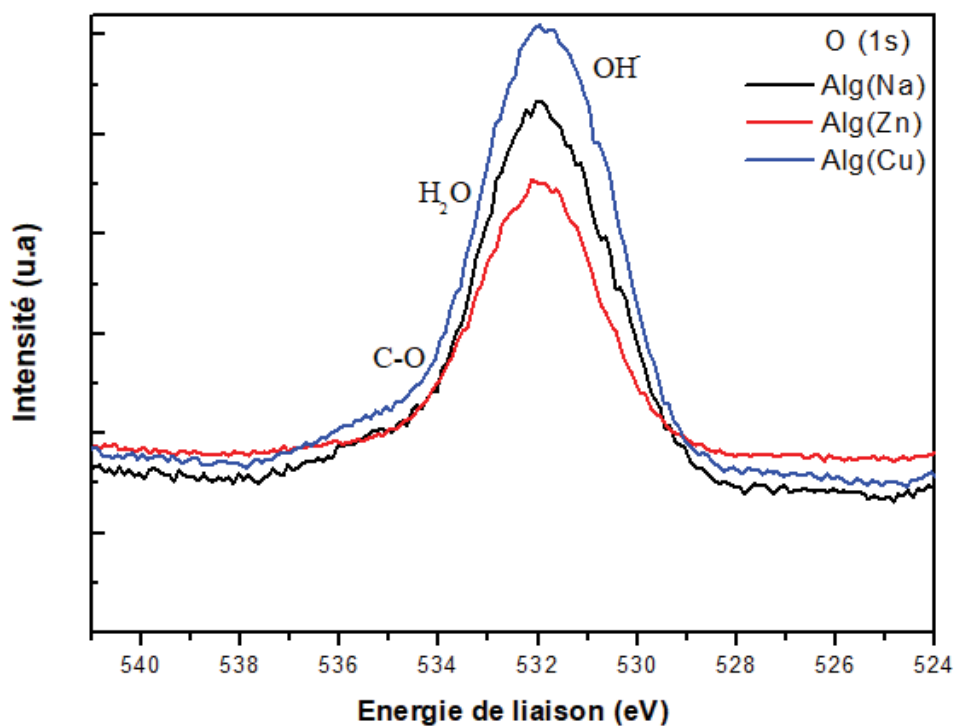


Figure III.5 Spectre XPS de O(1s) de l'alginate de sodium (noir), alginate de cuivre (bleu) et alginate de zinc (rouge)

Sur la Figure III.6, nous observons une structure du Na(1s) à 1071,2 eV, que nous pouvons attribuer aux espèces Na⁺ [120] liés aux groupes fonctionnels négatifs de l'alginate. De plus, nous remarquons que le taux de sodium est plus faible dans l'alginate de zinc que dans l'alginate de cuivre. Ces résultats confirment ceux obtenus en EDX. Les ions de sodium sont remplacés plus efficacement par les ions de zinc que par les ions de cuivre.

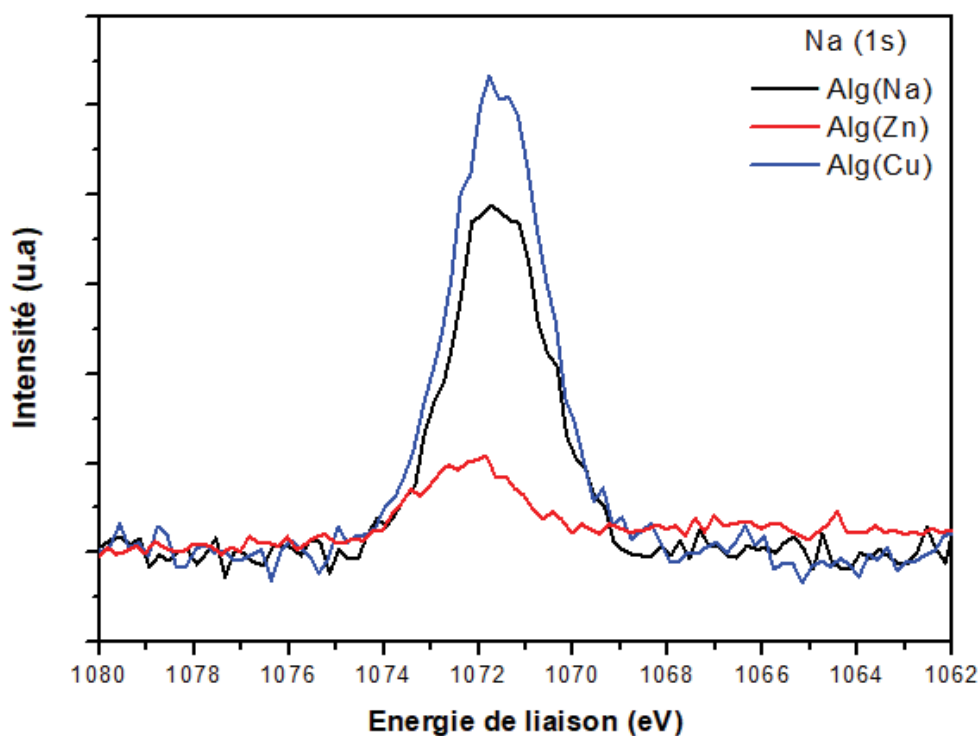


Figure III.6 Spectre XPS de Na(1s) de l'alginate de sodium (noir), alginate de cuivre (bleu) et alginate de zinc (rouge)

La Figure III.7 présente la structure Cu(2p) de l'alginate de cuivre : les pics correspondants au $2p_{3/2}$ (933,5 eV), $2p_{1/2}$ (953,0 eV) et les satellites associés (943,6 / 962,7 eV) sont observés clairement. Ces positions sont en accord avec les données de Ertl *et al* [121] pour l'aluminate de cuivre. La présence de ces satellites prouve que les ions de cuivre sont présents sous la forme Cu^{2+} [121,122]. La forte largeur des pics 2p peut être expliquée par la présence de différents environnements chimiques telles que les espèces hydroxyles ou carboxylate [122,123]. Nos résultats prouvent la présence de liaisons de coordination Cu^{2+} suivant le model egg-box présenté dans le chapitre 2.

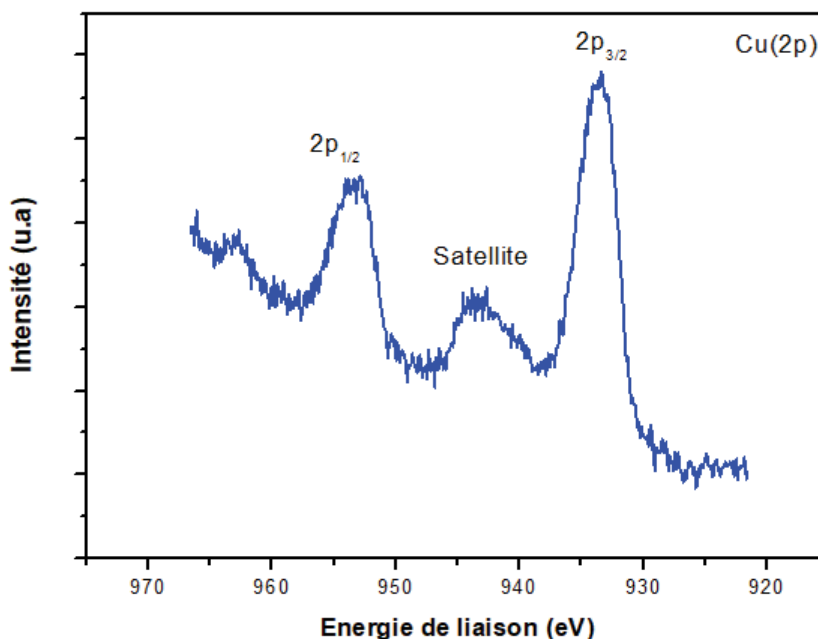


Figure III.7 Spectre XPS de Cu(2p) de l'alginate de cuivre

La Figure III.8(a) montre le spectre de Zn(2p_{3/2}) de l'alginate de zinc qui présente un pic principal symétrique à 1022,3 eV. Compte tenu de la faible énergie qui sépare les différentes contributions de zinc possibles, la position de ce pic n'est pas suffisante pour déterminer l'environnement chimique du Zn. Il est alors nécessaire de mesurer le spectre d'Auger LMM du Zn (Figure III.8(b)). Un épaulement est clairement visible à 990,1 eV. Ceci peut être attribué au pic d'Auger du Na(KLL). La position du pic d'Auger du Zn est à 987,6 eV. Pour s'affranchir d'éventuels effets de charge, il est important de calculer le paramètre α . Il est obtenu en additionnant la position du pic du photoélectron et celle du pic d'Auger ($E_\alpha = E_{\text{photoélectron}} + E_{\text{LMM}}$). Dans notre cas, le paramètre alpha est de 2009,9 eV. Cette valeur est en accord avec une liaison entre le Zn²⁺ et les espèces d'hydroxyle et/ou carboxylate [124].

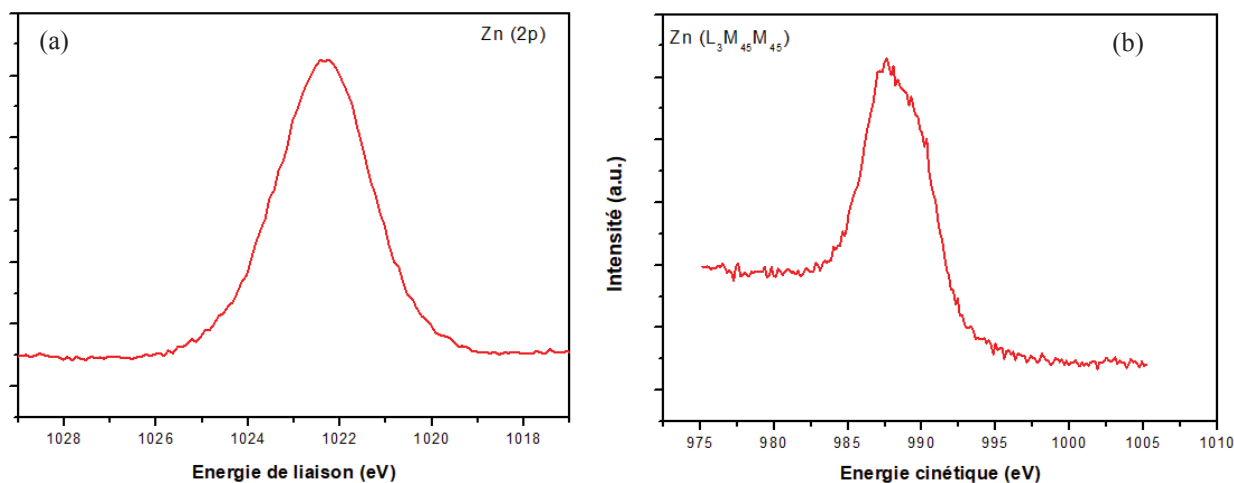


Figure III.8 Spectres XPS de (a) Zn(2p) en fonction des énergies de liaison et (b) Auger Zn(LMM) en fonction des énergies cinétiques d'alginate de zinc

Les données XPS montrent la présence d'ions $\text{Cu}^{2+}/\text{Zn}^{2+}$ dans les matériaux sans contribution d'oxyde. La présence d'ions Zn^{2+} est considérée comme un avantage par rapport à la plupart des travaux de recherche qui eux utilisent des oxydes de zinc tel que le ZnO en tant qu'agent antibactérien [8,124–127].

1.2. Films d'hydrogels poreux

1.2.1. Méthode d'élaboration

Oxley *et al.* en 1993 [129] ont étudié différentes techniques afin d'obtenir des polymères poreux. L'une d'elle consiste à polymériser des monomères autour d'une matrice polymérique cristalline qui est ensuite retirée afin de retrouver finalement un réseau polymérique interconnecté. En se basant sur la technique décrite par Oxley *et al.* [129], le PVA₁ (polyvinyle alcool) étant la matrice polymérique cristalline qui va être retirée par dissolution (lors de l'ajout des solutions ioniques) et l'alginate la solution de monomères utilisé, nous obtenons alors une solution à verser dans le moule contenant de l'alginate de sodium à une concentration massique de 5%, du PVA₁ à 2,5% et du glycérol à 1%. A l'exception de l'ajout du PVA₁ et du glycérol, la méthode d'élaboration des films d'hydrogel poreux est similaire à celle des films d'hydrogel non poreux expliquée dans le paragraphe 1.1.1. de ce chapitre obtenant ainsi des matériaux que nous noterons APG.

1.2.2. Microscopie électronique à balayage (MEB) et analyse élémentaire par énergie dispersive aux rayons X (EDX)

Une étude de morphologie a été effectuée sur les films d'hydrogel avec plastifiants (Figure III.9). Nous observons une surface poreuse pour les films d'hydrogel de calcium, de cuivre et de zinc en ajoutant les plastifiants à une échelle de 10 μ m. La forme et la taille des pores n'est pas identique d'un matériau à un autre.

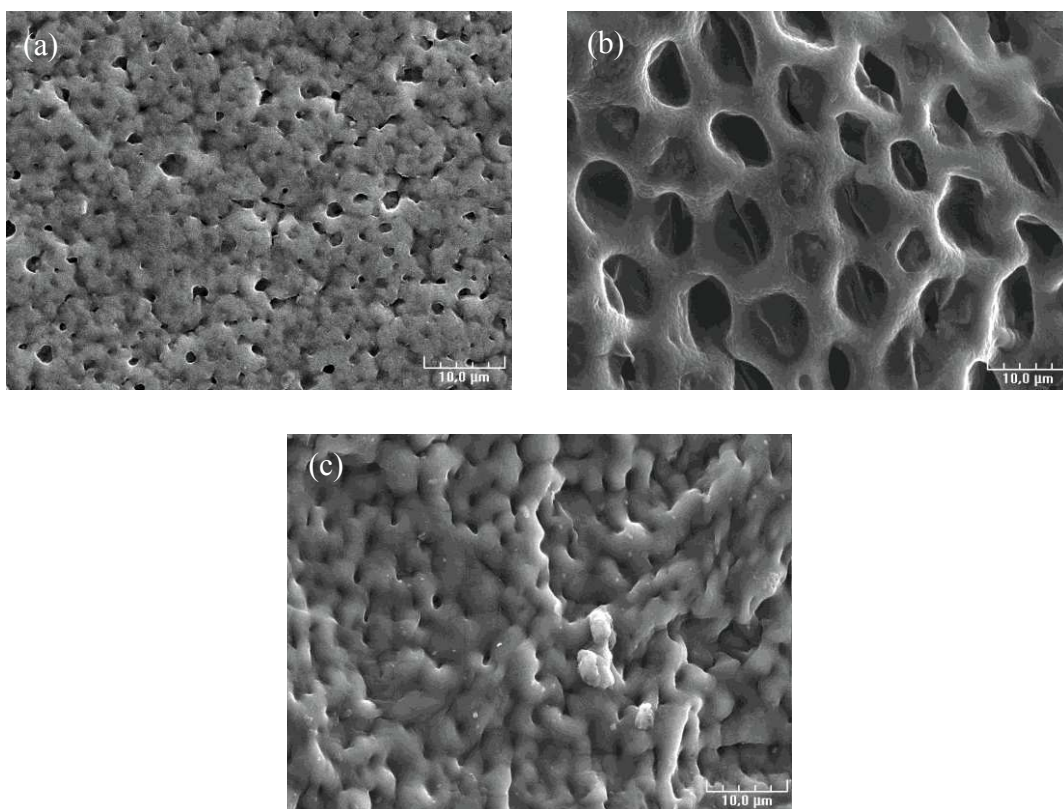


Figure III.9 Clichés MEB des films d'hydrogel poreux de (a) calcium, (b) cuivre et (d) zinc avec plastifiants

Nous observons d'après les clichés MEB présentés dans la Figure III.9, que l'ajout de PVA₁ et de glycérol à la solution d'alginate produit un réseau polymérique interconnecté poreux. La différence de porosité observée est due à la nature de la solution ionique utilisée donc à la nature

du matériau élaboré : alginate de calcium, alginate de cuivre ou alginate de zinc L'alginate de calcium poreux présente des pores de largeur environ égale à 2 μm , l'alginate de cuivre poreux quant à lui d'à peu près 6 μm et le zinc de largeur inférieure à 1 μm . Les solutions ioniques ajoutés aux films d'hydrogel poreux jouent probablement le rôle de dissolvant pour la matrice cristalline en accord avec la littérature [129]. La dissolution de la matrice cristalline lors de l'ajout des solutions ioniques pourrait être prouvée par une caractérisation du matériau en DRX obtenant un matériau amorphe. La différence de pores serait due à la nature de la solution de dissolution.

1.2.3. Microscope à force atomique (AFM)

L'étude fine des pores observées dans les films d'hydrogel poreux à base d'alginate de calcium a été entreprise à l'aide d'un microscope à force atomique AFM. La Figure III.10 représente une zone de 100 μm^2 qui est en accord avec le cliché obtenu en MEB du même matériau (Figure III.9(a)). La pointe de l'AFM oscille tout le long de l'acquisition de l'image. Le relief est représenté par une couleur qui devient plus claire alors que les creux sont reliés à une couleur qui devient plus sombre. Ainsi, nous étudions la largeur et la profondeur de quelques pores observés dans la Figure III.10. La pointe de l'AFM parcourra la distance représentée par une ligne blanche sur la figure dans le but d'obtenir la coupe transversale. Les résultats obtenus sont présentés dans la Figure III.11.

Matériaux à base d'alginate testés sur des bactéries pathogènes

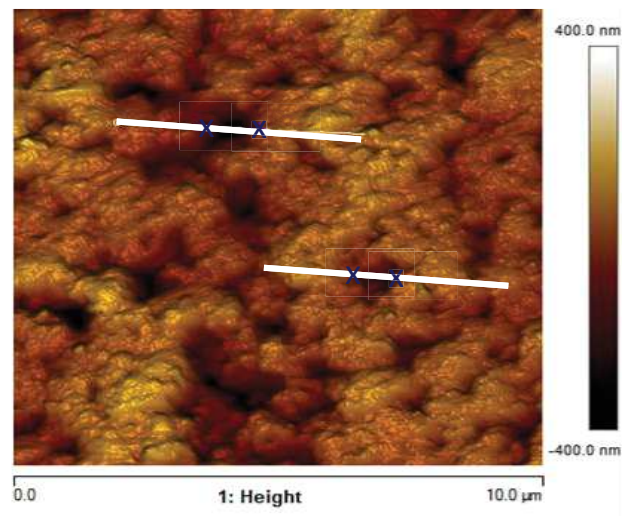


Figure III.10 Relief du film d'alginate de calcium avec plastifiants étudié à l'AFM

Nous pouvons noter que le premier pore étudié a une largeur de $1,08 \mu\text{m}$ et une profondeur de 400 nm . Le deuxième pore étudié a une largeur de $0,64 \mu\text{m}$ et une profondeur de 200 nm . Ces résultats montrent que nous avons un matériau poreux dont les pores ont une largeur d'ordre micrométrique et une profondeur d'une centaine de nm au moins. Cependant, il existe un doute sur la profondeur maximale des pores du fait que la pointe n'atteint pas probablement le fond des pores.

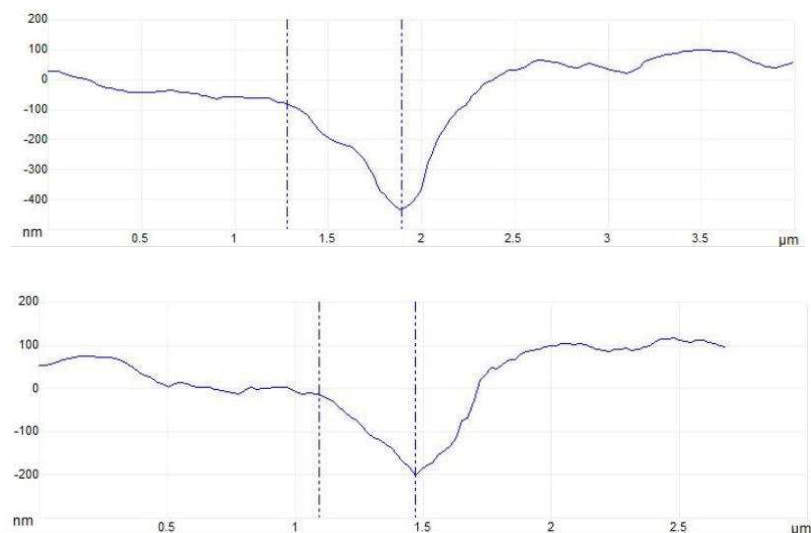


Figure III.11 Etude des pores présents dans le film d'hydrogel de calcium par AFM

1.3.Films déposés sur aciers

1.3.1. Méthode d'élaboration

Dans le but d'obtenir une seconde méthode de protection pour des surfaces métalliques, des films minces à base d'alginate ont été déposés sur de l'acier inoxydable par la méthode d'électrophorèse. Cette méthode facile et rapide consiste à appliquer une différence de potentiel entre deux électrodes plongées dans une solution polymérique [8,129–132]. L'anode, substrat à revêtir (dans notre cas Stainless Steel 316 L), est plongée dans une solution d'alginate de sodium de faible concentration ($C = 10 \text{ g/L}$) obtenant ainsi de l'acide alginique déposé sur l'anode en appliquant une différence de potentiel négative. Les revêtements obtenus sont ensuite trempés dans des solutions de CaCl_2 de $0,36 \text{ mol/L}$, CuSO_4 de $0,1 \text{ mol/L}$ et $\text{Zn}(\text{O}_2\text{CCH}_3)_2(\text{H}_2\text{O})_2$ de $0,1 \text{ mol/L}$ ou des mélanges de solutions de calcium/cuivre et calcium/zinc, afin d'obtenir des dépôts d'alginate de calcium, de cuivre, de zinc, de calcium/cuivre et calcium/zinc respectivement. L'épaisseur du dépôt dépend de trois paramètres : la valeur de la différence de potentiel, la durée de son application ainsi que de la concentration de la solution d'alginate de sodium.

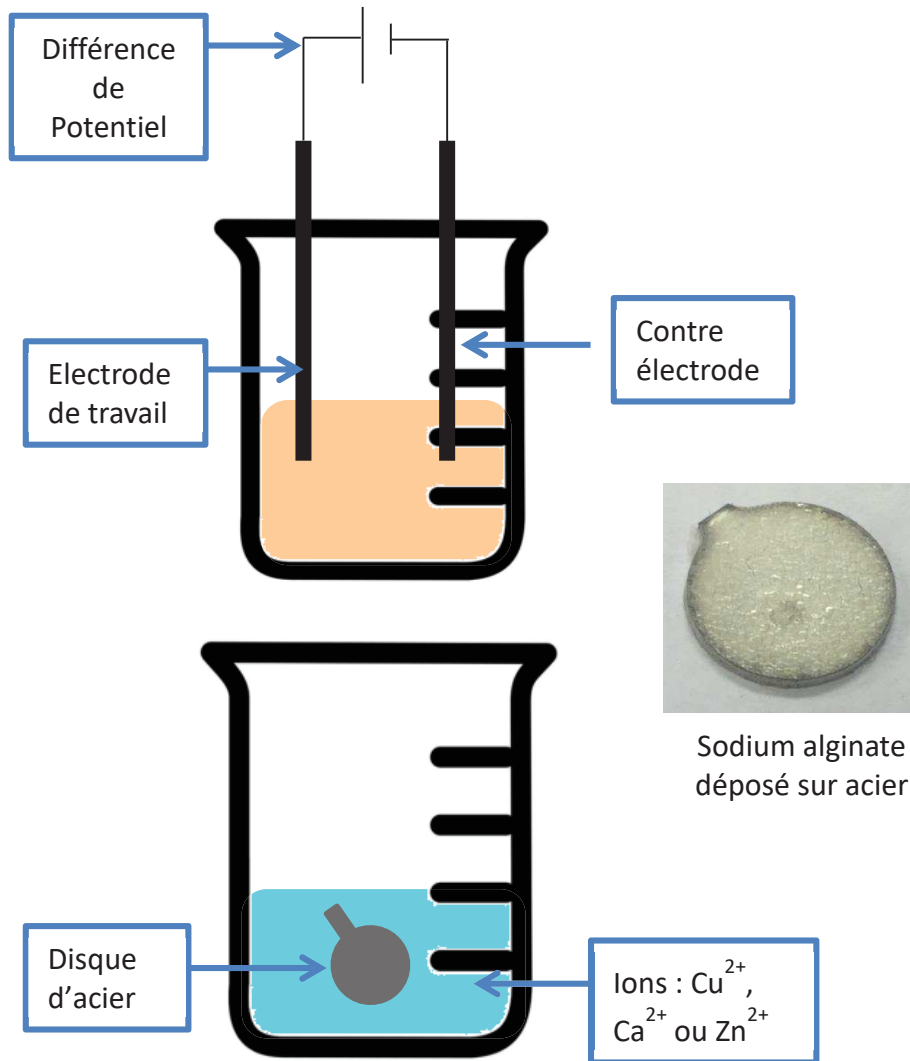


Figure III.12 Schéma explicatif de l'élaboration des films minces déposés sur acier par électrophorèse

1.3.2. Principes chimiques du dépôt par électrophorèse de l'alginate

La dissociation de l'alginate de sodium Na-Alg dans une solution aqueuse aboutit à la formation d'espèces anioniques Alg^- [129,132]:

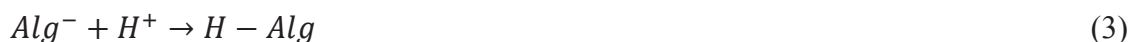


La décomposition électrochimique de l'eau conduit à une diminution du pH à la surface de l'anode :



Matériaux à base d'alginate testés sur des bactéries pathogènes

D'après les travaux de Santacruz *et al.* en 2002 [134], les solutions d'alginate forment des gels pour des pH inférieurs à 3. Par conséquent, l'électrophorèse et la neutralisation des espèces Alg^- chargées négativement dans les régions acides à la surface de l'anode (de charge positive d'après la polarisation) conduisent à la formation de dépôts d'acide alginique (H-Alg) comme démontré dans les travaux de Yokohama *et al.* en 1998 [135] :



En utilisant cette méthode d'élaboration, nous avons rencontré deux problèmes. Le premier est l'adhésion du dépôt au substrat. Le revêtement n'adhère pas fortement au substrat lorsque l'électrode est lisse. Afin de résoudre ce problème, Garcia-Torrès *et al.* en 2015 [136] ont démontré l'intérêt d'utiliser un substrat rugueux. Pour ce faire, l'inox utilisé dans nos travaux a subi une abrasion de surface par papier abrasif ainsi qu'un trempage dans une solution d'acide phosphorique H_3PO_4 . Les plaques d'inox trempées dans une solution de H_3PO_4 de concentration de 1 mol/L pendant 10 min présentent un changement de surface évident par rapport à l'inox non traité. L'altération de la surface, présentée dans la Figure III.13, a été observée en MEB.

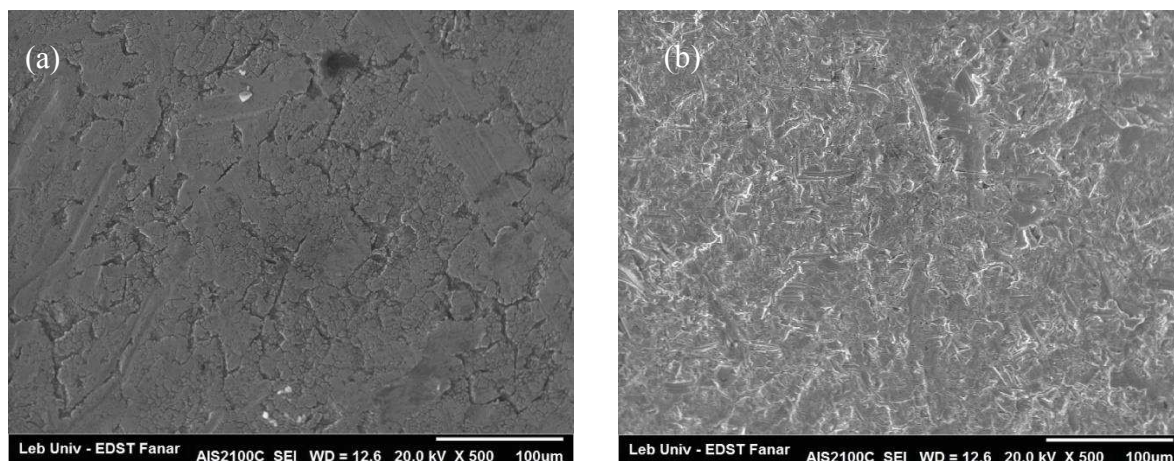


Figure III.13 Clichés MEB de la surface de l'inox non traitée (a) et traitée à l'acide phosphorique (1 mol/L) pendant 10 min après abrasion au papier abrasif

Le deuxième problème est que l'électrolyse de l'eau produit de l'hydrogène conduisant à la formation de bulles emprisonnées à la surface des dépôts. Cordéro *et al.* en 2015 [8] ont proposé de diluer l'alginate de sodium avec un mélange de 60% d'eau désionisée et 40% d'éthanol. Les pourcentages présentés sont des pourcentages volumiques. L'ajout d'éthanol comme solvant

contribue à éviter la formation de l'évolution d'hydrogène lors de la déposition [137]. La concentration d'alginate utilisée dans nos travaux ne permet pas l'ajout d'éthanol qui produit une solution hétérogène, d'où un revêtement hétérogène.

Dans le but d'avoir un dépôt homogène et éviter l'évolution d'hydrogène, nous avons décidé de revêtir l'inox en appliquant des dépôts pulsés de courte durée [131]. Pour un pulse de 5 secondes, l'électrolyse de l'eau est faible et les bulles ne sont plus emprisonnées à la surface du dépôt. La différence de surface entre un revêtement par dépôt non pulsé et pulsé est présentée sur la Figure III.14. La Figure III.14 (a) présente un dépôt pour une différence de potentiel de 10 V pendant 30 s et la Figure III.14 (b) un dépôt pulsé pour une différence de potentiel de 5 V appliquée pendant deux pulses de 5 secondes chacun.

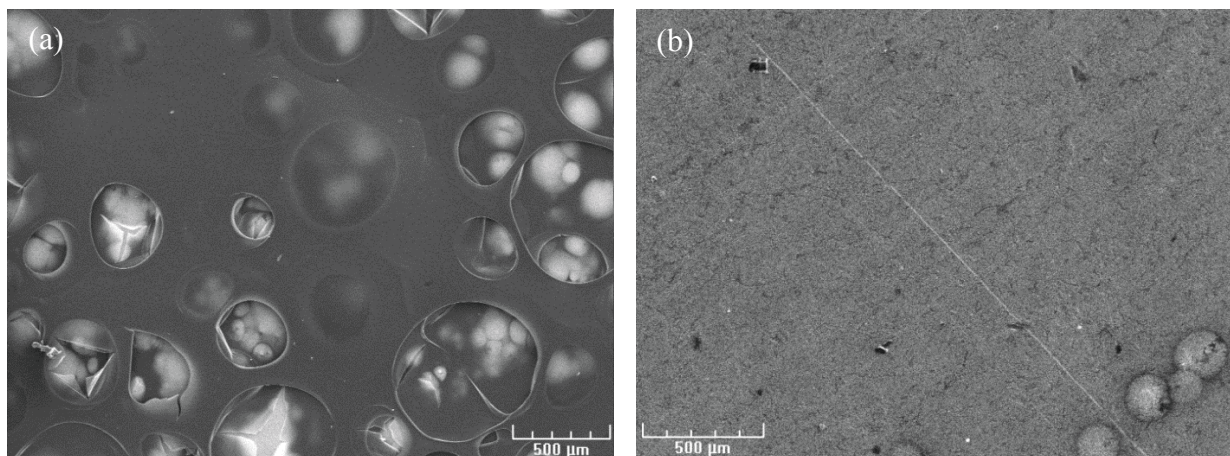


Figure III.14 Clichés MEB des dépôts d'acide alginique pour une différence de potentiel (a) non pulsée et (b) pulsée

Les films déposés sur acier sont caractérisés physico chimiquement dans le paragraphe suivant. Une étude surfacique des différents matériaux élaborés est effectuée.

1.3.3. Microscope électronique à balayage (MEB) et analyse élémentaire par énergie dispersive aux rayons X (EDX)

Afin que l'étude des différents revêtements soit précise, il est essentiel d'étudier préalablement la surface du substrat ainsi que sa composition. Pour ce faire, l'inox 316L utilisé

dans nos travaux est étudié en MEB (Figure III.15) et sa composition en EDX est présente dans le Tableau III.2.

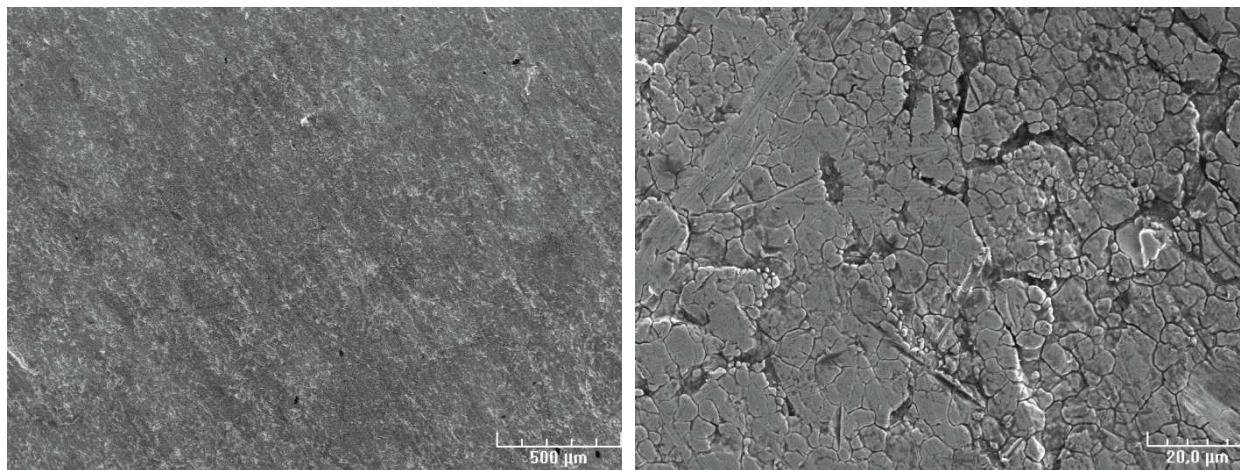


Figure III.15 Clichés MEB de la surface de l'inox 316L

D'après la Figure III.15, nous observons que la surface de l'acier traité par papier abrasif et par la solution d'acide phosphorique présente une surface désormais rugueuse qui devrait faciliter l'adhésion du dépôt d'alginate au substrat. Le Tableau III.2 présente l'analyse EDX effectuée sur cet acier donnant ainsi la composition chimique de ce dernier.

Tableau III.2 Composition chimique de l'inox 316L utilisé

Elément chimique	C	O	Fe	Cr	Ni	Mo	Si	Al	Mn	P	S	N
At%	39,2	4,6	37,6	9,8	4,6	1,9	1,0	1,3	-	-	-	-
Wt%	0,03	-	Bal	17	12	2	0,8	-	2	0,05	0,03	0,1

L'inox 316L est composé majoritairement de fer, chrome et nickel avec des traces de molybdène, silicium et aluminium (Tableau III.2). Cette composition chimique n'est pas en accord

Matériaux à base d'alginate testés sur des bactéries pathogènes

avec la littérature puisque nous observons un pourcentage atomique important de carbone. Cet élément est majoré à cause d'une couche de pollution sur la surface.

Dans la suite, nous étudions les dépôts d'acide alginique, d'alginate de calcium, de cuivre, de zinc, de calcium/cuivre et de calcium/zinc. La Figure III.16 regroupe les clichés MEB obtenus pour le dépôt d'acide alginique. Nous présentons deux clichés l'un à une échelle de 500 μm et l'autre de 20 μm .

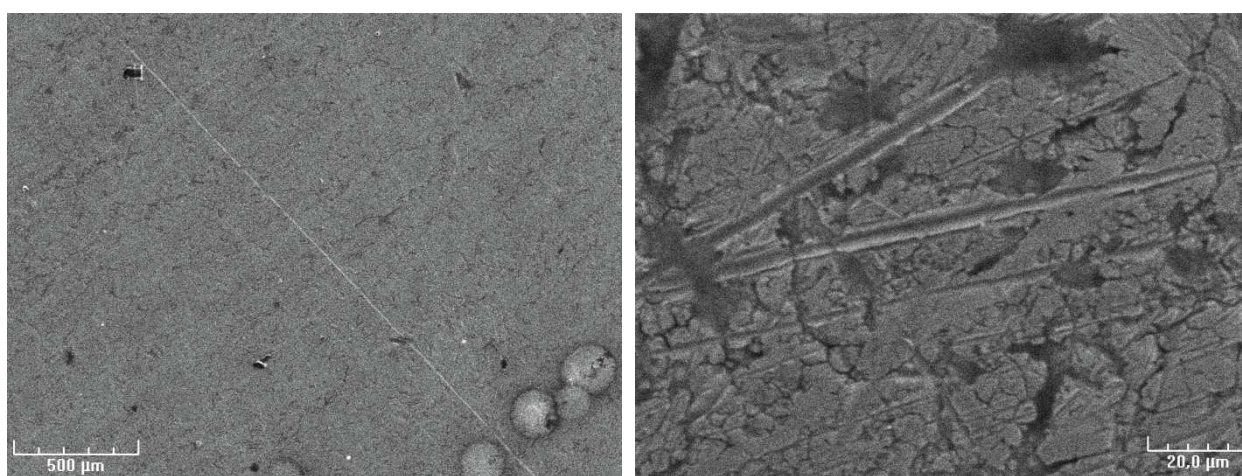


Figure III.16 Clichés en MEB du dépôt d'acide alginique sur inox

En comparant à une échelle de 500 μm la Figure III.15 et la Figure III.16, la surface revêtue paraît être lisse. Par contre, à une échelle de 20 μm , nous n'observons pas de différence significative entre les deux matériaux. Ceci montre que le dépôt d'acide alginique suit le relief de l'acier inoxydable.

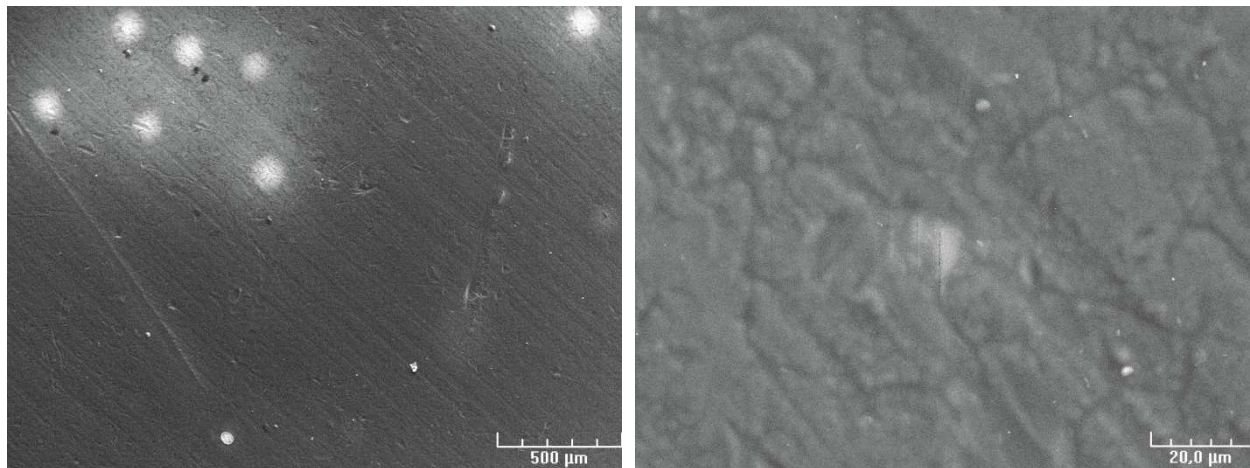


Figure III.17 Clichés en MEB du dépôt d'alginate de calcium sur inox

La Figure III.17, présente les clichés MEB du dépôt d'alginate de calcium. Le revêtement d'alginate de calcium observé ne présente pas de différence significative par rapport au revêtement d'acide alginique.

Le reste des dépôts étudiés ont le même aspect de surface (surface lisse) que les deux autres présentés ci-dessus.

Une étude a été effectuée sur un dépôt décollé par MEB en vue transversale afin d'estimer l'épaisseur du revêtement. La Figure III.18 représente la vue transversale d'un dépôt sur inox décollé.

Matériaux à base d'alginate testés sur des bactéries pathogènes

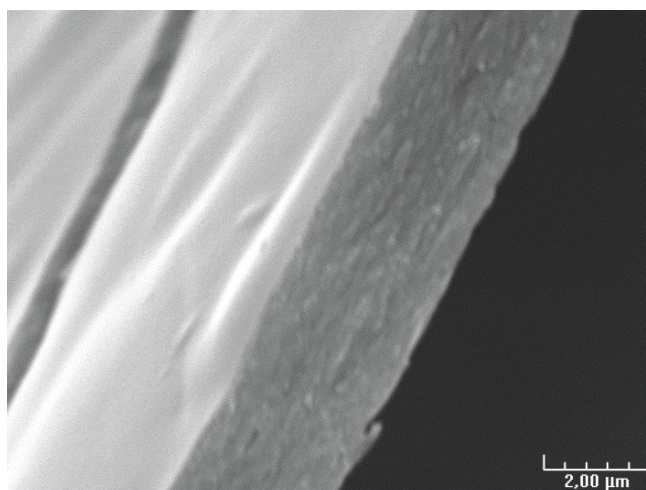


Figure III.18 Clichés MEB en vue transversale d'un revêtement décollé de l'inox

D'après l'échelle du cliché MEB, l'épaisseur du dépôt peut être estimée à 2,9 μm . Ceci nous permet de déterminer que les revêtements élaborés sont des films d'alginate d'épaisseur micrométrique.

En étudiant les dépôts d'alginate de sodium, calcium, cuivre et zinc en analyse élémentaire, nous avons déterminé la composition chimique des revêtements (Tableau III.3). Les proportions présentées sont des pourcentages atomiques.

Tableau III.3 Composition chimique des dépôts d'acide alginique, d'alginate de calcium, cuivre et zinc sur l'acier inoxydable 316L

Matériau	C	O	Fe	Cr	Ni	Mo	Si	Al	Na	Ca	Cu	Zn	Cl
Inox	39,2	4,6	37,6	9,8	4,6	1,9	1,0	1,3	-	-	-	-	-
Ac(H)	73,3	14,0	7,9	2,1	0,9	0,4	0,2	-	1,1	-	-	-	-
Ac(Ca)	67,4	24,3	3,7	1,2	0,3	0,4	0,2	-	-	1,9	-	-	0,7
Ac(Cu)	66,0	28,5	2,0	0,7	0,2	0,4	0,1	-	-	-	2,2	-	-
Ac(Zn)	71,3	19,5	4,5	1,3	0,4	0,5	0,2	-	-	-	-	2,3	-

En comparant les résultats présentés Tableau III.3, nous observons une composition chimique formée majoritairement de carbone et d'oxygène. La présence de ces deux éléments est due à la composition chimique de l'inox utilisé ainsi qu'aux chaînes polymériques de l'alginate. La présence de fer, chrome, nickel, molybdène et silicium est attribuée à la composition de l'acier qui est toujours visible en dessous des dépôts micrométriques. Le rapport Fe/Cr est de 3 dans tous les matériaux. Les revêtements d'acide alginique étant insolubles dans l'eau, nous pouvons considérer la présence de sodium dans ces matériaux sous forme de traces. De plus, nous confirmons d'après les résultats d'EDX du Tableau III.3, qu'en trempant les films d'acide alginique déposés sur acier dans les solutions ioniques contenant du calcium, cuivre ou zinc, nous remplaçons le Na présent dans le revêtement initial par les éléments Ca, Cu et Zn respectivement. Les traces de Cl dans le dépôt d'alginate de calcium sont dues à la solution ionique de CaCl_2 utilisée pour rendre insoluble le dépôt.

Les différentes plaques d'inox revêtues par les différents dépôts d'acide alginique, cuivre et zinc ont été étudié en spectroscopie des photoélectrons X (XPS) dans le but de déterminer sous quelle forme les différents éléments sont présents et leur environnement chimique. Les résultats sont présentés dans le paragraphe 1.3.4. qui suit.

1.3.4. Spectroscopie des photoélectrons X (XPS)

Des mesures XPS ont été effectuées sur les alginates de cuivre Ac(Cu) et de zinc Ac(Zn) et comparées avec les résultats de l'inox non revêtu et celui revêtu par de l'acide alginique. Les spectres complets des différents matériaux étudiés sont présentés sur la Figure III.19. Nous observons clairement des pics communs de C(1s) et O(1s) dans les différents matériaux et des différences au niveau du Fe(2p), Fe(3p), du cuivre et du zinc.

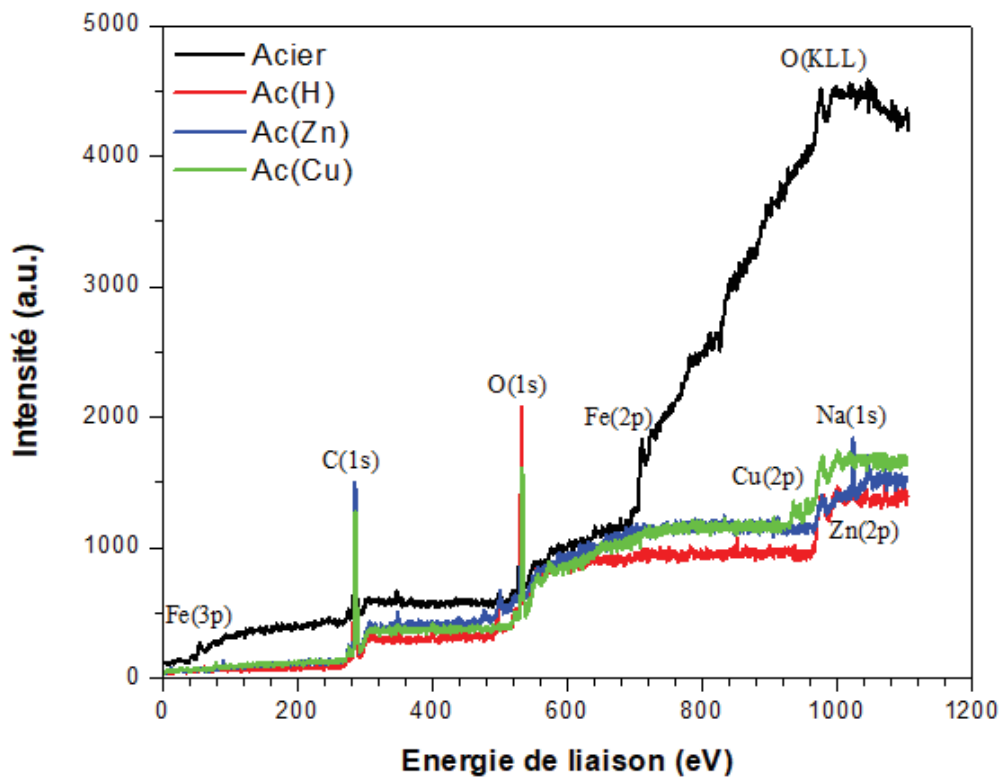


Figure III.19 Spectres XPS des différents matériaux étudiés

Les pics de fer ne sont observables que sur la courbe noire qui correspond à l'acier inoxydable 316L non revêtu. Ces pics correspondent au Fe(2p) et Fe(3p).

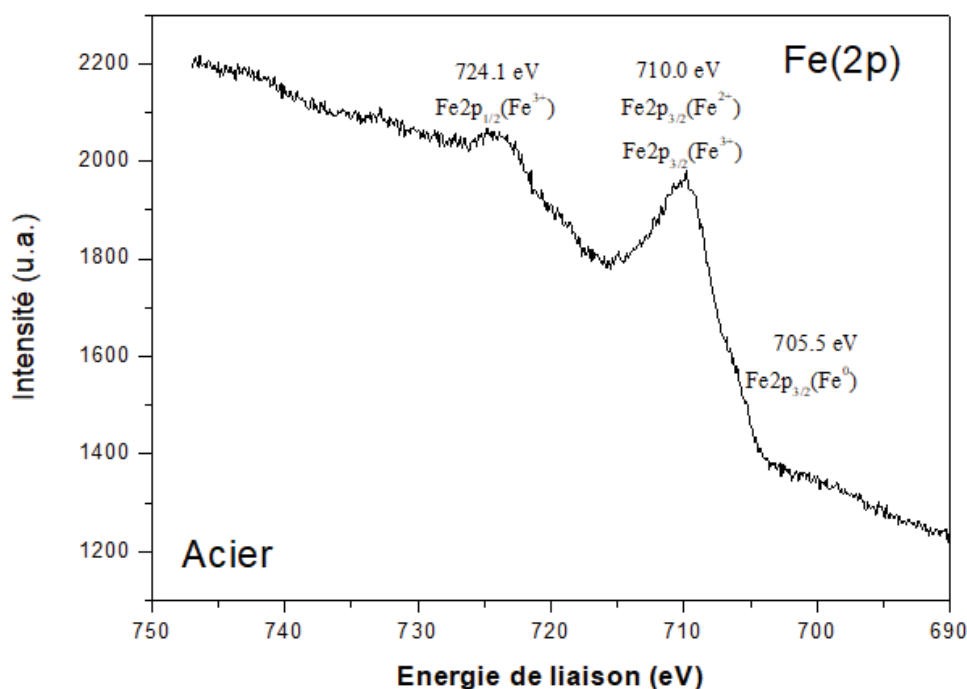


Figure III.20 Spectre XPS de Fe(2p) de l'acier 316L non revêtu

Sur la Figure III.20, nous présentons le spectre XPS pour le fer. Le spectre Fe(2p) présente une structure large correspondant aux états $2p_{1/2}$ et $2p_{3/2}$ pour lesquels coexistent différents environnements chimiques. Le pic à 710,0 eV présente une structure large pour le Fe($2p_{3/2}$) qui correspond au Fe^{2+} et à 705,5 eV qui correspond au Fer sous sa forme métallique [137,138]. Nous pouvons conclure que le fer est présent sous sa forme ionique Fe^{2+} et Fe^{3+} (FeO et Fe_2O_3 ou Fe_3O_4 de l'ordre de 2-3 nm) ainsi que sous sa forme métallique Fe^0 . Le spectre du fer n'étant visible que dans l'acier non revêtu, ceci montre que les dépôts d'acide alginique, d'alginate de cuivre et zinc recouvrent totalement l'acier d'un dépôt supérieur à 5nm.

Nous observons sur la Figure III.21(a) les spectres C(1s) présentant une structure large vers 285 eV qui peut être décomposée en trois parties : C-C (284,8 eV), C-O (286,4 eV) et C=O (288,2 eV) [116,139]. De même, nous observons dans la Figure III.21(a) vers 288,2 eV une différence légère mais réelle entre les deux courbes noire et rouge et les deux courbes bleue et verte. Cette différence peut être attribuée aux liaisons organiques C=O présentes surtout dans le cas des dépôts d'alginate de cuivre et de zinc.

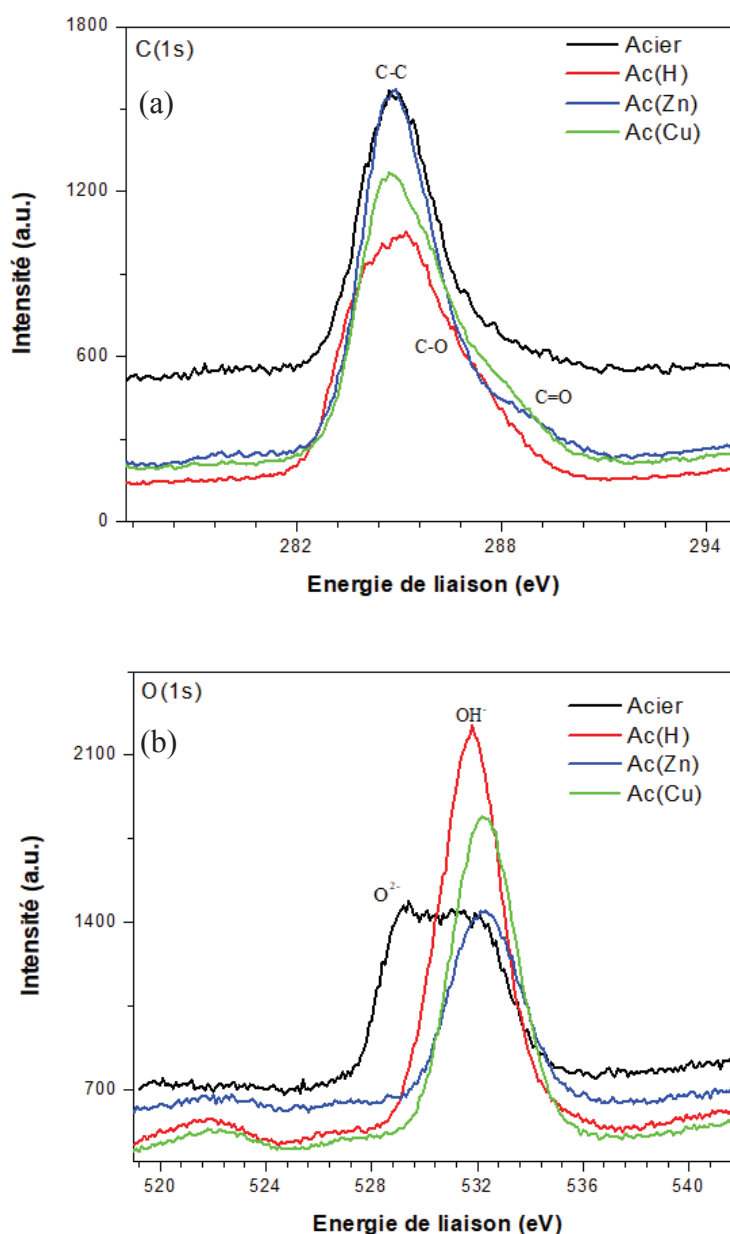


Figure III.21 Spectres XPS de (a) C(1s) et (b) O(1s) de l'acier 316L non revêtu (noir), le dépôt d'alginate de sodium (rouge), cuivre (vert) et zinc (bleu)

Le spectre de l'oxygène (Figure III.21(b)) dans le cas de l'acier 316L non revêtu présente une structure différente de celle de l'acier recouvert par les différents matériaux. Cette structure supplémentaire observée à 530 eV est attribuée à l'oxyde de métal. Ce dernier est absent dans les spectres correspondants aux autres matériaux, nous observons par contre une structure unique dans le cas des autres matériaux à 532,0 eV attribuée aux groupes hydroxyle/carboxyle en accord avec

la composition de l'alginate. Ceci montre que l'acier inoxydable 316L est composé d'oxygène sous forme d'oxyde et d'hydroxyde OH^- et qu'il est totalement recouvert par l'alginate.

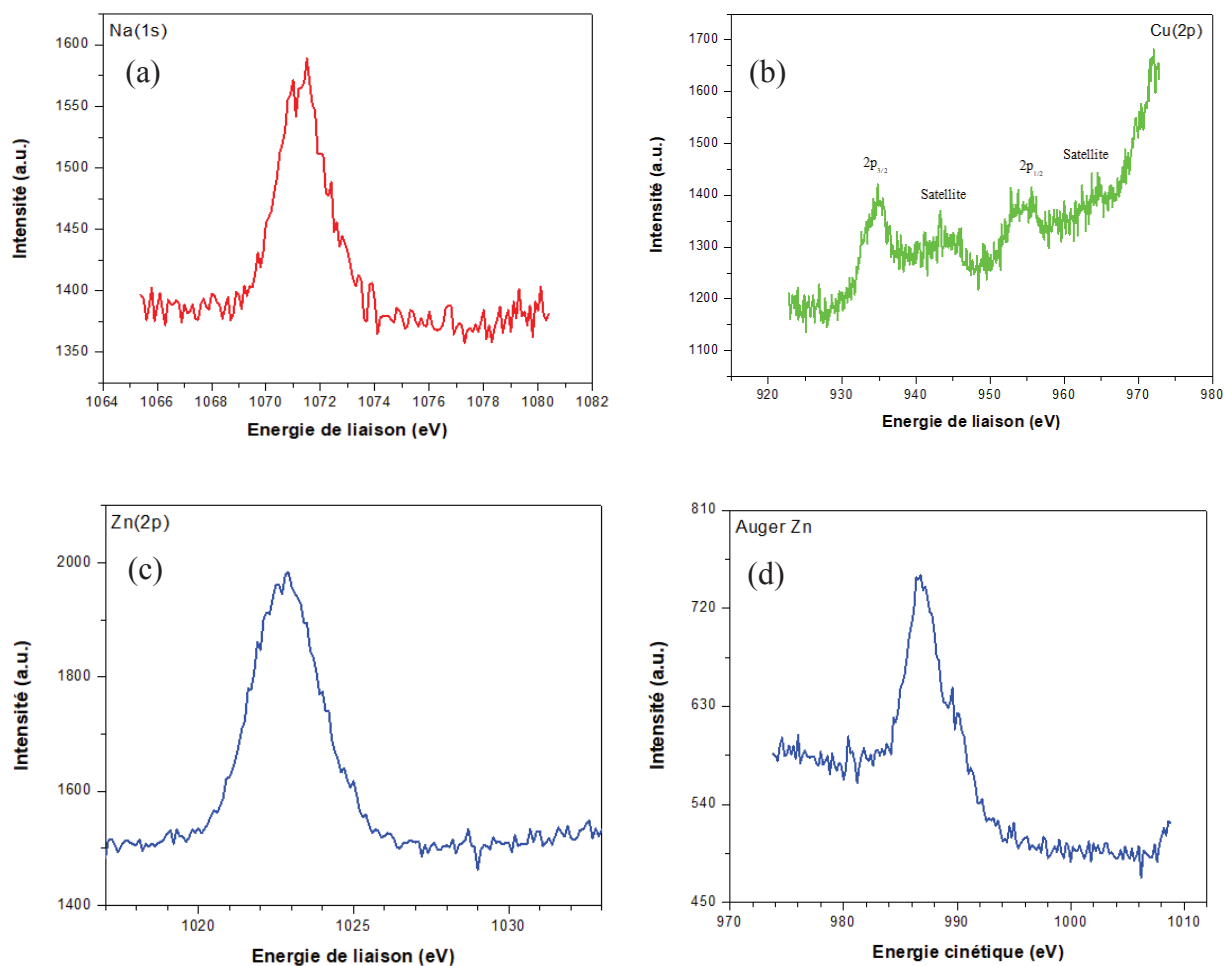


Figure III.22 Spectres XPS de (a) Na(1s), (b) Cu(2p), (c) Zn(2p) et (d) Auger Zn

La structure à 1071,2 eV observée sur le spectre de l'acier revêtu d'acide alginique (Figure III.22(a)) peut être attribuée à l'état ionique Na^+ [120]. Les traces d'ions de sodium sont absentes dans les revêtements de cuivre et de zinc. Les résultats XPS du sodium confirment ceux obtenus à ce sujet en EDX.

La Figure III.22(b) présente le spectre du cuivre présent pour le revêtement d'alginate de cuivre. La structure Cu(2p) de l'alginate de cuivre peut être décomposée en trois parties ; le pic

correspondant au $2p_{3/2}$ (933,5 eV), $2p_{1/2}$ (953,0 eV) et le satellite associé (943,6 / 962,7 eV) qui sont observés clairement. La présence de ces satellites prouve que les ions de cuivre sont présents sous la forme Cu^{2+} [124], comme ce que nous observons généralement dans des biomatériaux tels que le polyéthylèneimine [123]. Ces positions sont en accord avec les données de Ertl *et al* [121] obtenues pour l'aluminat de cuivre. La largeur des pics 2p peut être expliquée par la présence de différents environnements chimiques telles que les espèces hydroxyles ou carboxylate [121,140] en accord avec les données de C(1s). Les données présentées confirment la présence de liaisons de coordination Cu^{2+} suivant le model egg-box présenté dans le chapitre 1.

Le spectre de $Zn(2p_{3/2})$ de l'alginate de zinc présente un pic symétrique à 1022,3 eV. Cependant, plusieurs espèces chimiques de zinc (Zn, ZnO, $Zn(OH)_2$...) possèdent des énergies de liaisons très proches. Il est alors nécessaire de mesurer le spectre Auger afin d'identifier l'état chimique du zinc. Diler *et al.* en 2014 [108] ont montré que pour un paramètre α égal à 2014,1 eV, la position du pic d'Auger du Zn^0 (métallique) est à 992,4 eV, du ZnO (Zn^{2+}) à 988,4 eV et du $Zn(OH)_2$ (Zn^{2+}) à 986,4 eV. En tenant compte du paramètre α dans notre étude (2009,9 eV), de la position du pic d'Auger du Zn(LMM) à 987,6 eV ainsi que de celle du $Zn(2p_{3/2})$ à 1022,3 eV nous pouvons en conclure que le zinc est lié aux espèces d'hydroxyle et/ou carboxylate [124].

Par conséquent, les données XPS montrent la réussite du recouvrement de l'acier 316L par les différents films. De même, ces résultats confirment la présence d'ions Cu^{2+}/Zn^{2+} dans les matériaux sans aucune contribution d'oxyde.

Les différents films élaborés par la méthode de casting ainsi que ceux par la méthode de déposition par électrophorèse ont été ainsi caractérisés. Dans la partie suivante, nous présentons les résultats des tests antibactériens en présence de ces matériaux.

2. Evaluations antibactériennes

Le protocole expérimental utilisé pour évaluer la propriété antibactérienne des matériaux a été expliqué dans le paragraphe 2.1 du chapitre 2. Le but des matériaux antibactériens est de détruire ou d'empêcher la multiplication des bactéries. L'effet de nos matériaux est alors étudié en mesurant la zone d'inhibition des bactéries pour les souches pathogènes *E.coli* (Gram-) et *S.aureus* (Gram+).

Matériaux à base d'alginate testés sur des bactéries pathogènes

Cependant, l'extraction des données n'est pas toujours évidente puisque les photos prises ne montrent pas toujours ce qui observé à l'œil nu. Nous rencontrons alors quatre résultats possibles :

- a) Une zone d'inhibition claire dépassant le matériau
- b) Une zone d'inhibition en dessous du matériau qui ne le dépasse pas
- c) Une accumulation de bactéries autour du matériau
- d) Une absence de la zone d'inhibition

Ces quatre différentes possibilités sont présentées Figure III.23. Dans la Figure III.23(b), le matériau a été déplacé afin de voir la zone d'inhibition présente en dessous de celui-ci mais qui ne le dépasse pas.

Matériaux à base d'alginate testés sur des bactéries pathogènes

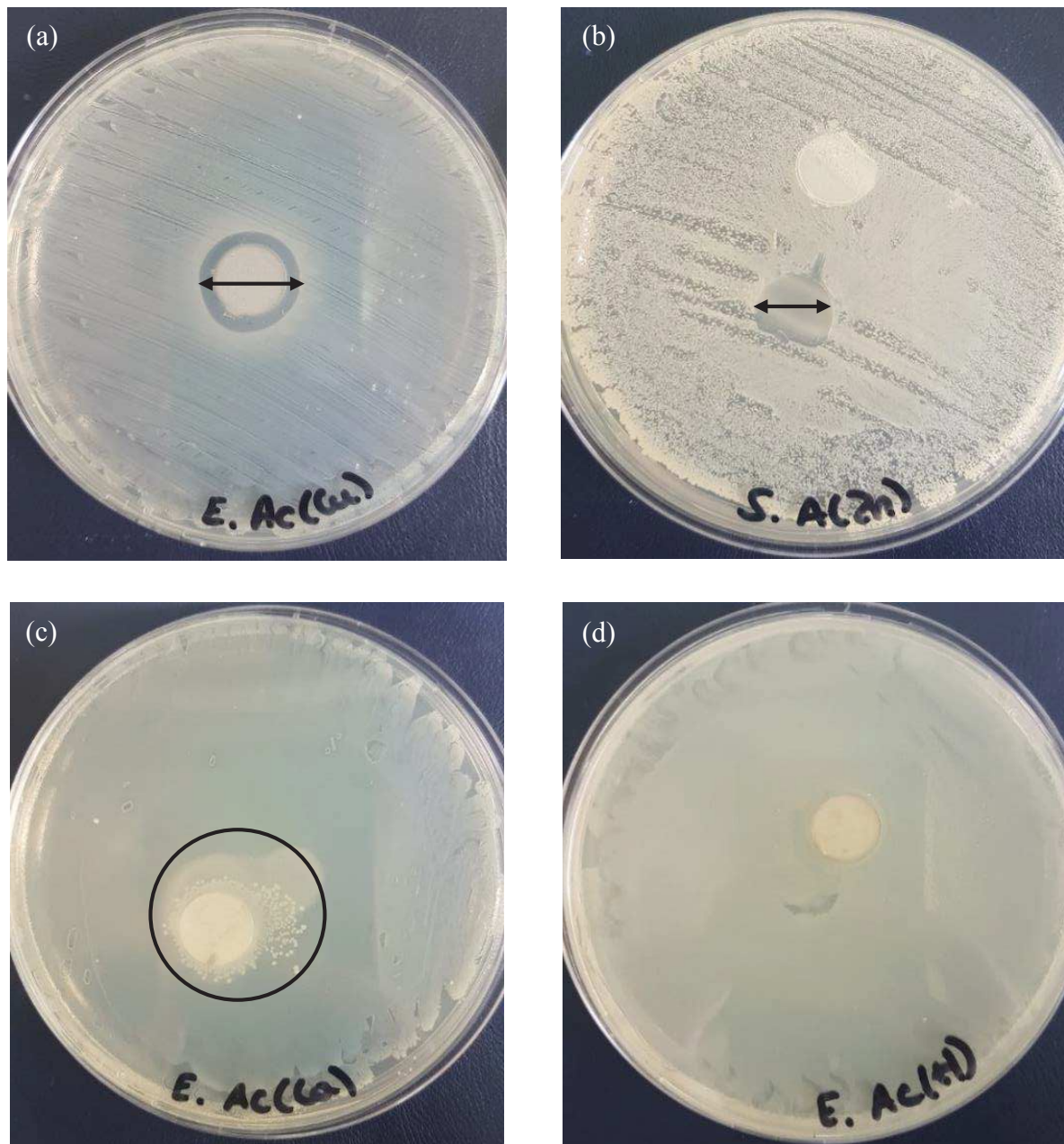


Figure III.23 Quatre cas de zone d'inhibition que nous pouvons avoir lors de l'évaluation antibactérienne (a) zone d'inhibition dépassant le matériau, (b) zone d'inhibition ne dépassant pas le matériau, (c) accumulation des bactéries *E.coli* autour du matériau et (d) pas de zone d'inhibition

Puisque le cuivre et le zinc utilisés à de grandes concentrations sont considérés comme toxiques pour le corps humain et l'environnement, les matériaux testés sont élaborés en utilisant une faible concentration ionique de 0,05 mol/L (inférieure à 0,3 mol/L limite de concentration en cuivre pour les produits antifouling aux Etats Unis). Cette concentration ionique utilisée étant

insuffisante pour le remplacement total du sodium, du calcium a été ajouté à ces films d'hydrogel à une concentration de 0,27 mol/L. Nous obtenons ainsi des films d'hydrogel de mélange Ca/Cu et Ca/Zn.

Le diamètre des films d'hydrogel a été fixé à 12 mm alors que ceux des films déposés sur acier sont de 14 mm.

2.1.Films d'hydrogel

Nous présentons les résultats obtenus pour *E.coli* en présence de films d'hydrogel A(Ca_{0,36}), A(Ca_{0,27}Cu_{0,05}) et A(Ca_{0,27}Zn_{0,05}) après 48h d'incubation à 37°C. Les tests ont été effectués en quatre répliques. Les résultats de deux répliques de chaque matériau sont présentés sur la Figure III.24.

Les films d'hydrogel d'alginate de calcium notés A(Ca_{0,36}) ne présentent pas de zone d'inhibition même en dessous du film (Figure III.24 (a) et (b)). Nous observons dans le cas des films A(Ca_{0,27}Cu_{0,05}) une zone d'inhibition qui ne dépasse pas le film (Figure III.24 (c) et (d)). Ceci est aussi vrai en présence des films d'hydrogel A(Ca_{0,27}Zn_{0,05}) (Figure III.24 (e) et (f)).

La zone d'inhibition moyenne sur les quatre répliques atteint 14,75 mm pour les films de cuivre et 14,25 mm pour ceux de zinc. Ceci montre que dans le cas d'*E.coli*, nous n'avons pas de différence significative entre le cuivre et le zinc insérés dans les films à la même concentration (0,05 mol/L). Une activité antibactérienne est observée en présence de ces deux matériaux A(Ca_{0,27}Cu_{0,05}) et A(Ca_{0,27}Zn_{0,05}). Le film d'hydrogel A(Ca_{0,27}Cu_{0,05}) perd sa couleur initialement verte. Nous supposons donc que les ions Cu²⁺ sont relargués du matériau et qu'il en est de même pour les ions Zn²⁺ contenus dans les films d'hydrogel A(Ca_{0,27}Zn_{0,05}).

Dans le cas de la souche de bactéries pathogènes *S.aureus*, des photos des zones d'inhibitions sont présentées Figure III.25. Nous n'observons pas de zone d'inhibition dans le cas des films d'hydrogel A(Ca_{0,36}) (Figure III.25 (a) et (b)). Par contre, nous observons en présence des A(Ca_{0,27}Cu_{0,05}) une zone d'inhibition bien visible qui dépasse le matériau (Figure III.25 (c) et (d)). La zone d'inhibition observée dépasse faiblement le film A(Ca_{0,27}Zn_{0,05}) dans le cas d'un contact uniforme (Figure III.25 (e)). Nous obtenons alors une zone d'inhibition de 15 mm pour le zinc et une moyenne sur quatre répliques de 17,25 mm pour le cuivre. A noter que les A(Ca_{0,27}Cu_{0,05}) perdent tous leur couleur verte comme dans le cas de l'*E.coli*.

Matériaux à base d'alginate testés sur des bactéries pathogènes

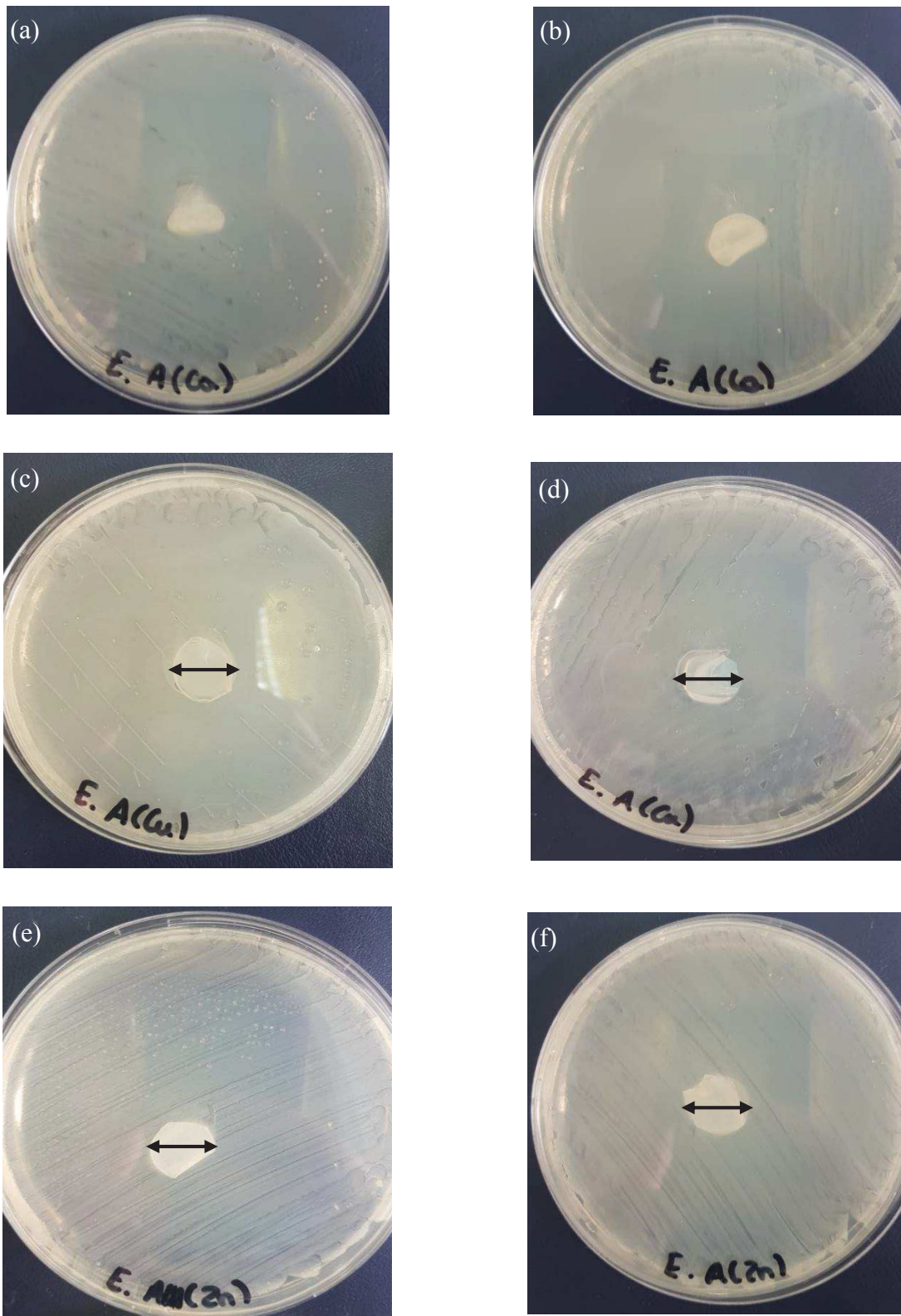


Figure III.24 Résultats des tests antibactériens effectués sur la souche E.coli en présence de films d'hydrogel d'alginate de calcium, calcium/cuivre et calcium/zinc

Matériaux à base d'alginate testés sur des bactéries pathogènes

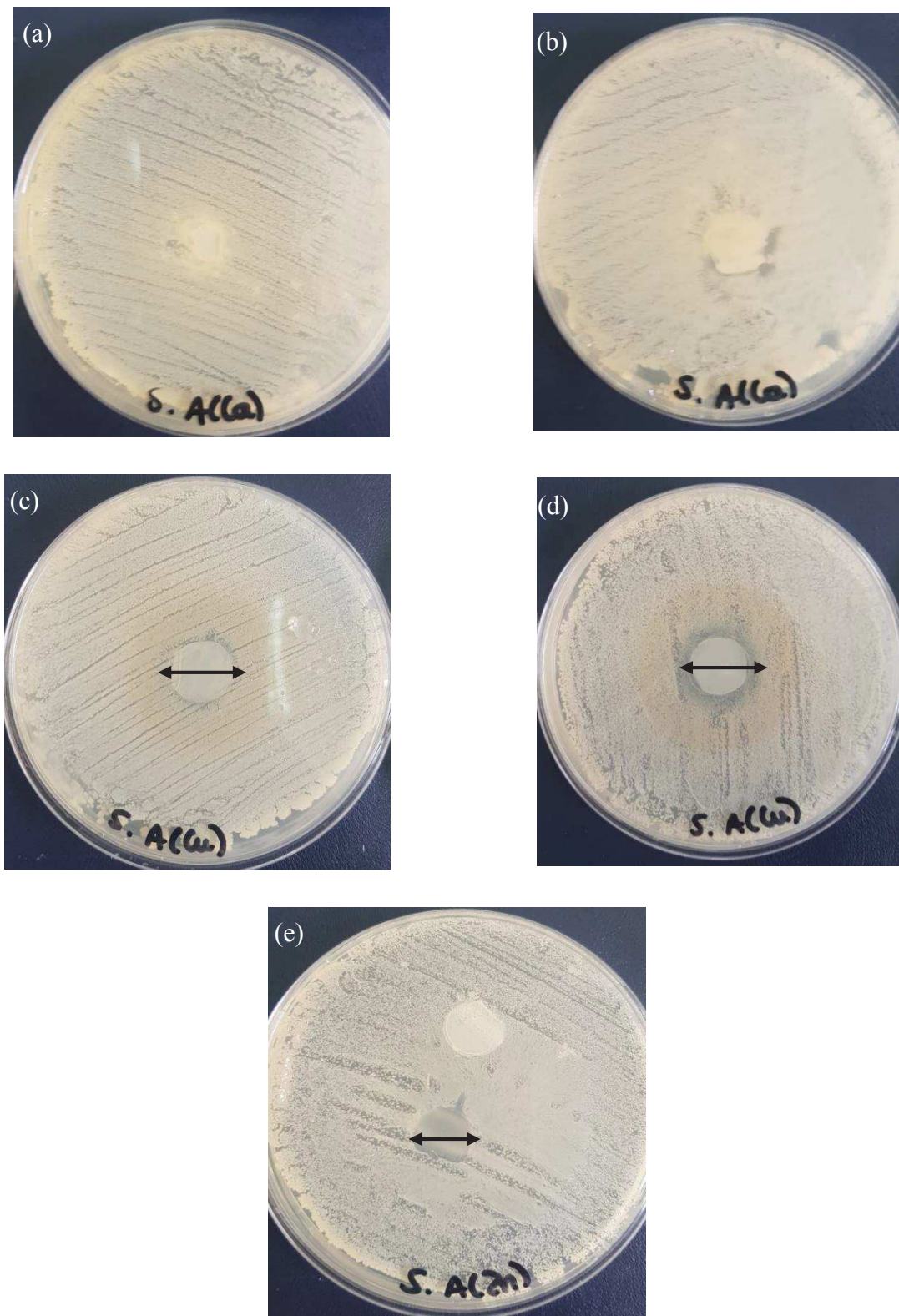


Figure III.25 Résultats des tests antibactériens effectués sur la souche *S.aureus* en présence de films d'hydrogel d'alginate de calcium, calcium/cuivre et calcium/zinc

En comparant les résultats obtenus pour *E.coli* et ceux pour *S.aureus*, nous pouvons en conclure que les films d'hydrogel à base de calcium n'affectent pas la croissance bactérienne. Alors que ceux à base de cuivre et de zinc agissent similairement sur *E.coli* obtenant des zones d'inhibition de diamètre à peu près identiques. De plus, les matériaux de cuivre inhibent plus efficacement les bactéries de la souche *S.aureus* que les matériaux de zinc à une même concentration ionique.

2.2.Films d'hydrogel poreux

Dans le but d'étudier l'influence de la porosité de la matrice sur les propriétés antibactériennes, nous étudions dans cette partie les films d'hydrogels contenant des plastifiants. Ces matériaux ont été testés sur la souche *E.coli*. Les photos prises après la période d'incubation sont présentées Figure III.26. Les films d'hydrogel poreux à base de calcium notés APG(Ca_{0,36}) ne présentent pas de zone d'inhibition (Figure III.26 (a) et (b)). Dans le cas des films poreux de cuivre APG(Ca_{0,27}Cu_{0,05}) et de zinc APG(Ca_{0,27}Zn_{0,05}) (Figure III.26 (c), (d), (e) et (f) respectivement), la zone d'inhibition dépasse faiblement les matériaux pour les deux souches de bactéries. En présence des APG(Ca_{0,27}Cu_{0,05}) et des APG(Ca_{0,27}Zn_{0,05}), nous mesurons respectivement une zone d'inhibition de diamètre de 15,5 mm et de 14,25 mm en moyenne. Les films poreux à base de cuivre sont donc légèrement plus inhibiteurs que ceux à base de zinc. Comme observé précédemment, les APG(Ca_{0,27}Cu_{0,05}) perdent aussi leur couleur verte.

Matériaux à base d'alginate testés sur des bactéries pathogènes

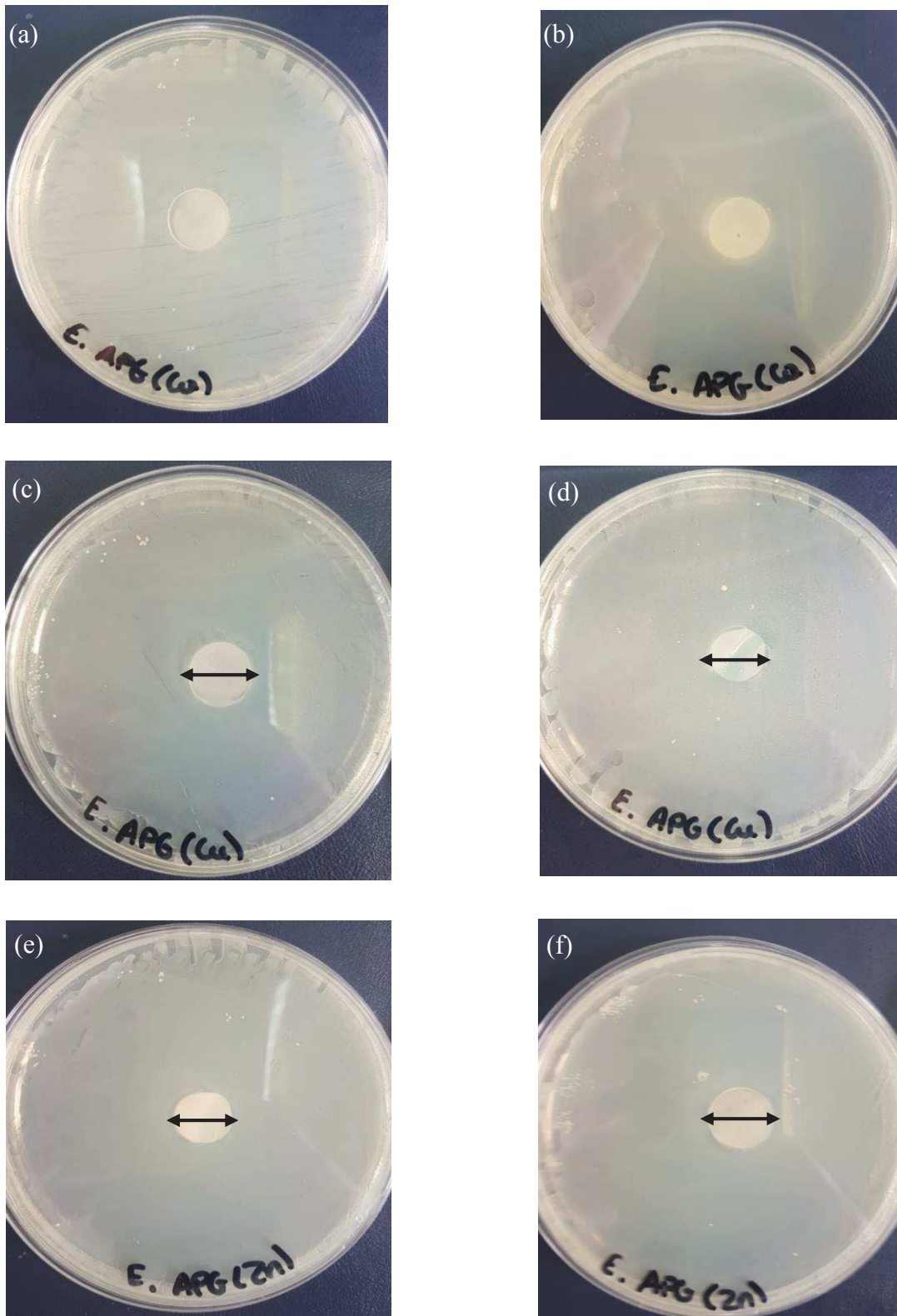


Figure III.26 Résultats des tests antibactériens effectués sur la souche *E.coli* en présence de films poreux d'alginate de calcium, cuivre et zinc

Matériaux à base d'alginate testés sur des bactéries pathogènes

Les résultats obtenus pour *S.aureus* en présence de films poreux sont présentés sur la Figure III.27. Nous observons en présence des APG(Ca_{0,36}) une accumulation de bactéries autour du matériau. Ceci a été observé sur la Figure III. 23 (c). Cette accumulation encerclée dans la Figure III.27(a), (b) peut vraisemblablement être expliquée par le fait que le calcium contenu dans nos matériaux serait une source de nourriture pour ces bactéries ; ces dernières migreraient vers le matériau et s'accumuleraient autour de ce dernier.

L'importance du calcium dans les organismes eucaryotes a été étudié [141,142]. Il a été montré que le calcium est impliqué dans la maintenance de la structure cellulaire des organismes, leur motilité, leur transport et les procédés de différenciation tels que la sporulation, la formation d'hétérocystes et leur développement fruitif. Ce phénomène n'est pas observé en présence des films d'alginate non poreux. Ceci peut être relié à la porosité du matériau.

En présence des matériaux à base de cuivre APG(Ca_{0,27}Cu_{0,05}), nous observons une zone d'inhibition d'un diamètre de 16,5 mm en moyenne alors qu'en présence de ceux à base de zinc APG(Ca_{0,27}Zn_{0,05}) nous mesurons une zone d'inhibition de diamètre de 14 mm en moyenne.

Matériaux à base d'alginate testés sur des bactéries pathogènes

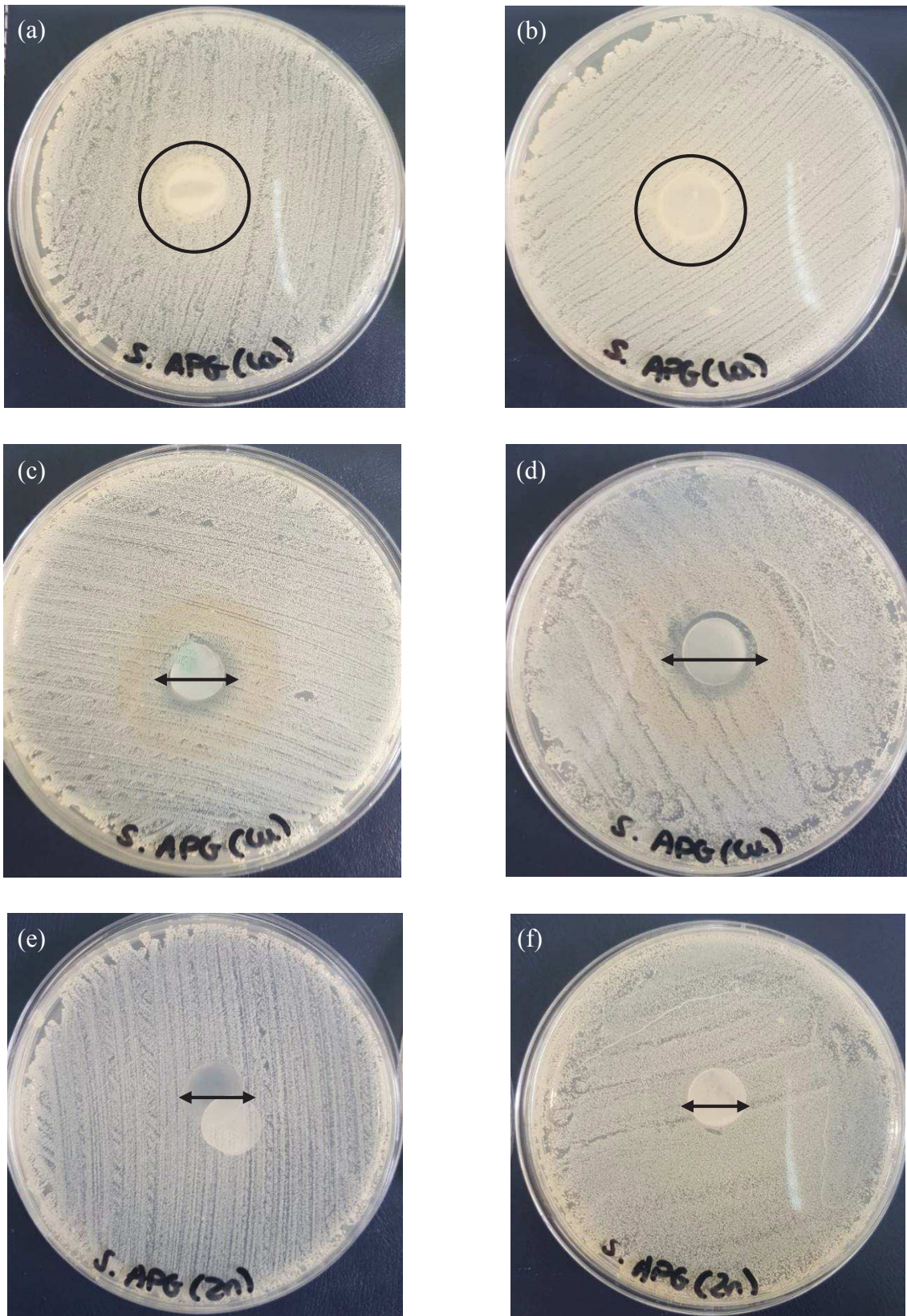


Figure III.27 Résultats des tests antibactériens effectués sur la souche *S.aureus* en présence de films poreux d'alginate de calcium, cuivre et zinc

Matériaux à base d'alginate testés sur des bactéries pathogènes

Les films d'hydrogel et les films d'hydrogel poreux ayant le même diamètre (12 mm) et étant élaborés avec les mêmes concentrations de solutions ioniques, nous pouvons comparer les résultats des tests antibactériens en présence de ces deux types d'hydrogel (Tableau III.4).

Tableau III.4 Récapitulatif des résultats de l'évaluation antibactérienne sur les souches *E.coli* et *S.aureus* en présence des films d'hydrogel et des film d'hydrogel poreux (0 pas de zone d'inhibition et + accumulation des bactéries autour du matériau)

Matériau	<i>E.coli</i>					<i>S.aureus</i>				
	1	2	3	4	Moyenne	1	2	3	4	Moyenne
A(Ca _{0,36} Cu _{0,05})	-	15	16	-	15,5	17	17	16	16	16,5
A(Ca _{0,36} Zn _{0,05})	14	15	14	14	14,25	14	-	-	-	14
APG(Ca _{0,36} Cu _{0,05})	14	15	15	15	14,75	16	19	18	16	17,25
APG(Ca _{0,36} Zn _{0,05})	14	14	14	15	14,25	-	-	15	-	15

Les résultats listés dans le tableau montrent que la porosité de la matrice n'affecte pas significativement l'effet antibactérien observé.

Par contre, les films poreux à base de calcium améliorent la croissance bactérienne autour du matériau dans le cas de la souche Gram+.

En comparant les résultats obtenus pour le même matériau, nous remarquons que les zones d'inhibition sont légèrement plus larges dans le cas de *S.aureus* que dans le cas de *E.coli* sauf pour A(Ca_{0,36}Zn_{0,05}) où la différence n'est pas significative. Il semble que les matériaux élaborés affectent plus les bactéries de Gram+ ayant une couche de peptidoglycane plus épaisse. Plusieurs matériaux à base de cuivre et de zinc ont été testés sur *E.coli* et *S.aureus* dans la littérature [3,80,143] en présentant leurs résultats sous forme de concentrations de colonies bactériennes et non sous forme de zones d'inhibition. Safaei *et al.* [145] mesurent des zones d'inhibition en présence de nanocomposites d'alginate contenant des NPs de CuO (sans donner le diamètre de leur matériaux) atteignant pour *S.aureus* 19,33 mm et pour *E.coli* 17,33 mm. Ils obtiennent des zones d'inhibition plus importantes pour la bactérie de Gram+. Visurraga *et al.* [146] comparent plusieurs concentrations de NPs de Cu insérés dans des matrices d'alginate ; la différence de concentration n'affecte pas vraiment le diamètre de la zone d'inhibition. Ils obtiennent pour *S.aureus* 11 mm en

moyenne alors que pour *E.coli* 9,75 mm en moyenne. La faible différence observée par Safaei et Visurraga est en accord avec nos observations. Les ions divalents Cu^{2+} et Zn^{2+} sembleraient affecter plus les bactéries de Gram⁺ comme en accord avec la littérature [146–148].

En conclusion, les films d'hydrogel élaborés à base de calcium/cuivre et calcium/zinc présentent des propriétés antibactériennes prometteuses en accord avec la littérature sans avoir recours à des nanoparticules et à des concentrations ioniques très grandes susceptibles d'être toxiques.

2.3.Films déposés sur acier

Afin d'évaluer la capacité d'inhibition des matériaux déposés sur l'acier inoxydable, une étude microbiologique sur les deux souches de bactéries *E.coli* et *S.aureus* a été entreprise. L'acier non revêtu Ac, revêtu par de l'acide alginique Ac(H), de l'alginate de calcium Ac(Ca), de l'alginate de cuivre Ac(Cu) et de l'alginate de zinc Ac(Zn) ont été examinés. Ces matériaux ayant une épaisseur micrométrique, la diminution de la concentration ionique du cuivre et du zinc n'est pas nécessaire. L'utilisation alors de matériaux pur cuivre et pur zinc n'est pas considéré comme toxique. Les matériaux testés possèdent un diamètre de 14 mm. Les clichés des résultats sont regroupés sur les Figures III.28 et III.29.

Matériaux à base d'alginate testés sur des bactéries pathogènes

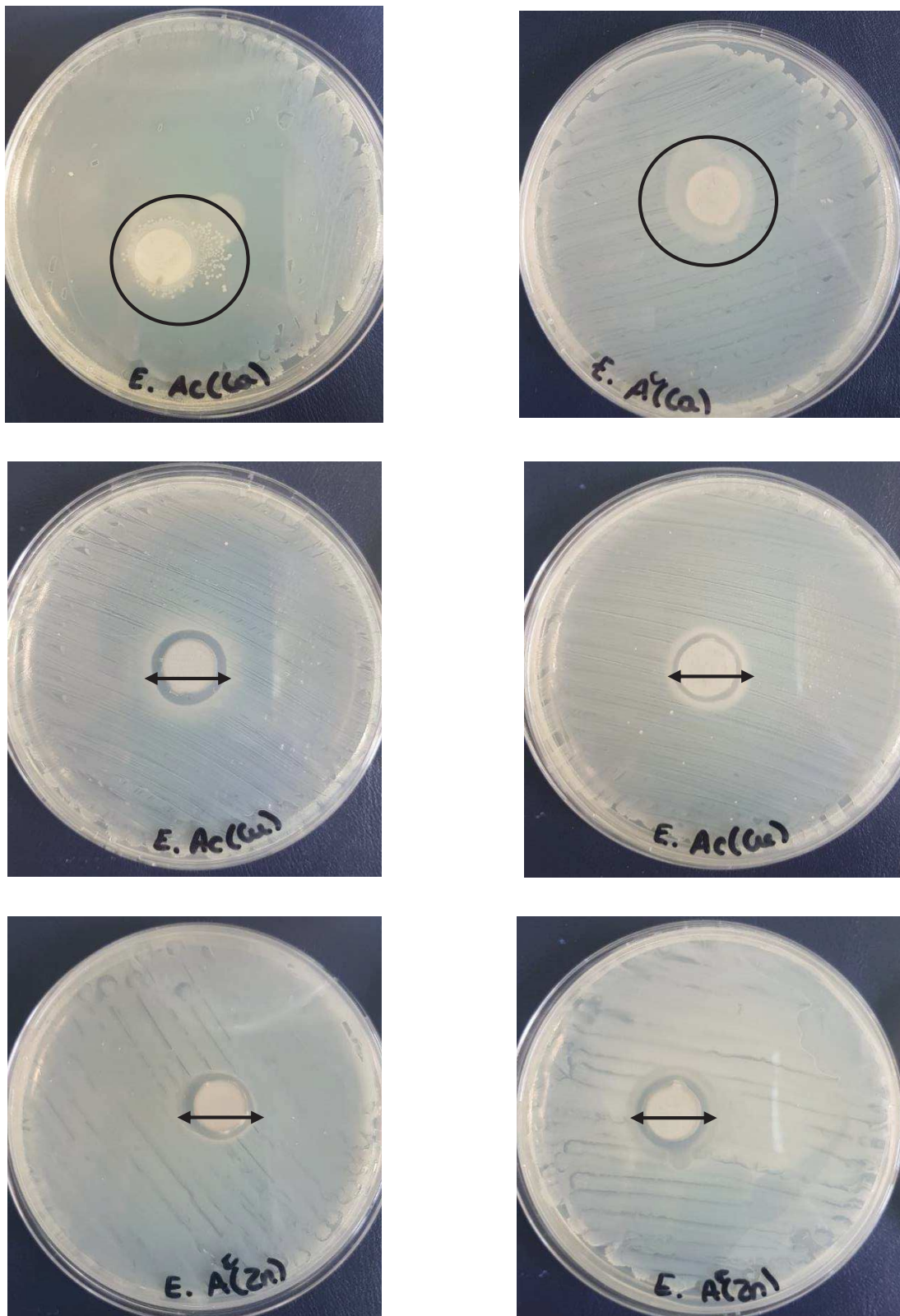


Figure III.28 Résultats des tests antibactériens effectués sur la souche *E.coli* en présence de films déposés sur acier d'alginate de calcium, cuivre et zinc

Matériaux à base d'alginate testés sur des bactéries pathogènes

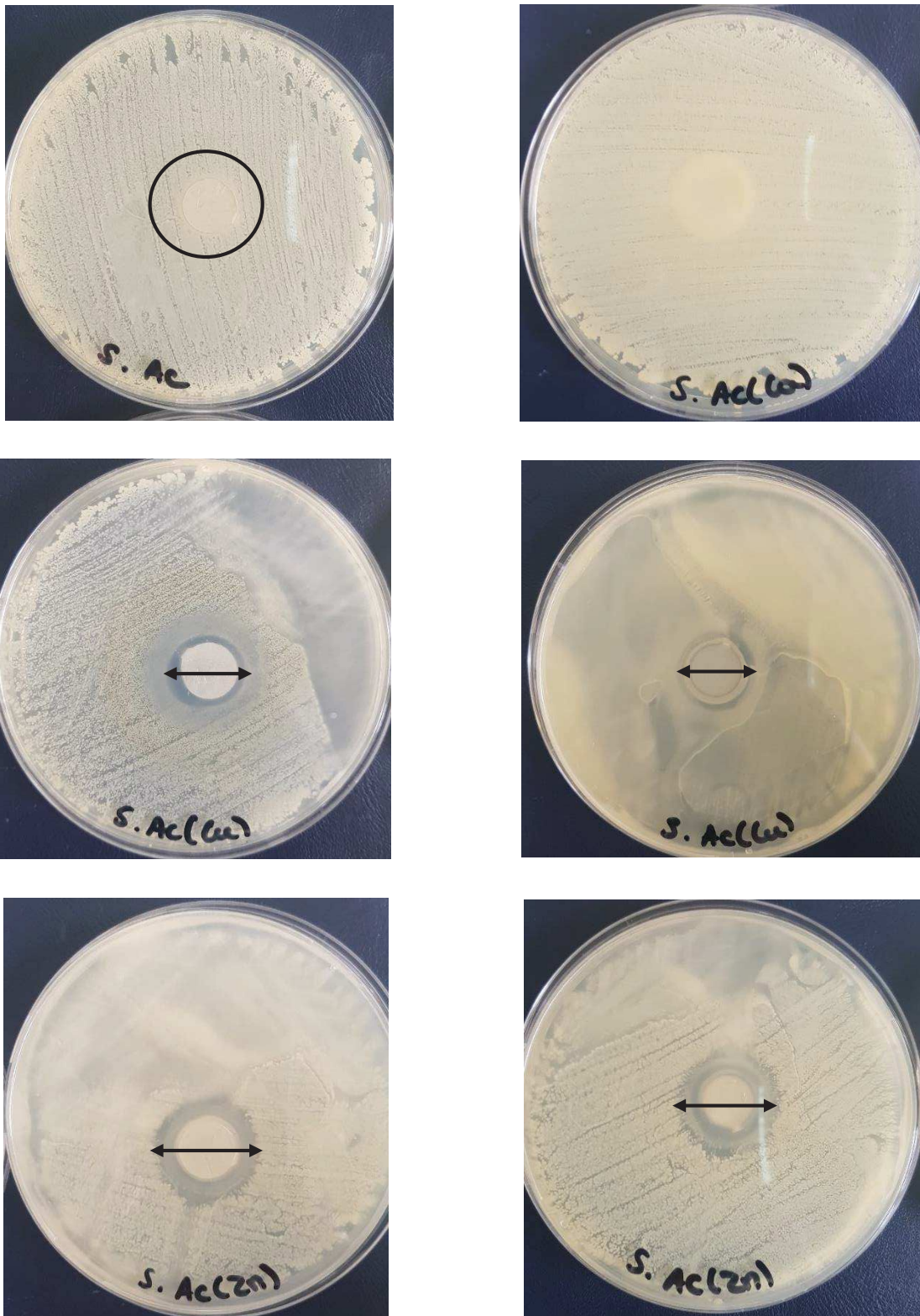


Figure III.29 Résultats des tests antibactériens effectués sur la souche *S.aureus* en présence d'acier non revêtu et de films déposés sur acier d'alginate de calcium, cuivre et zinc

Matériaux à base d'alginate testés sur des bactéries pathogènes

L'acier non revêtu ainsi que celui recouvert par un dépôt d'acide alginique ne semblent pas affecter la croissance bactérienne : nous n'observons pas de zone d'inhibition pour les deux souches de bactéries. En présence de l'acier revêtu par l'alginate de calcium, nous observons pour *E.coli* ainsi que pour *S.aureus* une accumulation de bactéries autour du matériau. Etant donné que c'est uniquement la présence du calcium qui conduit à une accumulation de bactéries autour du matériau, nous pouvons en conclure que les bactéries croissent grâce au calcium qui est un élément nécessaire à leur croissance ce qui est en accord avec la littérature [141,142] et nos résultats précédents.

Les résultats obtenus pour la souche *E.coli* sont regroupés sur la Figure III.28. La présence des matériaux Ac(Cu) et Ac(Zn) affecte de façon similaire la croissance bactérienne. Nous obtenons en présence de ces deux matériaux une zone d'inhibition de diamètre en moyenne de 14,75 mm et 15,75 mm respectivement.

Les résultats correspondants à la souche *S.aureus* sont regroupés sur la Figure III.29. Les matériaux à base de zinc paraissent inhiber plus la croissance bactérienne que ceux à base de cuivre. Nous observons une zone d'inhibition de 17 mm en moyenne pour Ac(Cu) et 20 mm pour Ac(Zn).

Le bilan des résultats de l'évaluation antibactérienne en présence des films déposés sur acier est regroupé dans le Tableau III.5.

Tableau III.5 Récapitulatif des résultats de l'évaluation antibactérienne sur les souches *E.coli* et *S.aureus* en présence des films déposés sur acier (+ accumulation des bactéries autour du matériau)

Films déposés sur acier	Matériau	<i>E.coli</i>					<i>S.aureus</i>				
		1	2	3	4	Moyenne	1	2	3	4	Moyenne
	Ac(Ca)	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	Ac(Cu)	15	14	14	16	14,75	20	15	16	17	17
	Ac(Zn)	16	15	15	17	15,75	19	19	21	21	20

D'après ces résultats, nous pouvons en conclure que l'acier inoxydable ainsi que le film d'acide alginique déposé sur l'acier n'ont aucun effet sur la croissance bactérienne. Les films de calcium, cuivre et zinc présentent un comportement similaire aux films d'hydrogel et films d'hydrogels poreux. Les résultats obtenus pour ces films déposés sur acier sont en accord avec la littérature [8].

3. Conclusion

Différents films à base d'alginate ont été élaborés dans ce chapitre par la méthode de casting ainsi que par la méthode de déposition par électrophorèse. Ces deux méthodes d'élaboration simples et rapides ont permis d'élaborer des films d'hydrogels d'épaisseur millimétrique de surface lisse ou poreuse ainsi que des films d'épaisseur micrométrique revêtant de l'acier inoxydable.

Du cuivre et du zinc ont été insérés dans les matrices d'alginate. Ces deux éléments se trouvent sous leur forme ionique Cu^{2+} et Zn^{2+} dans nos matériaux. L'utilisation d'ions divalents à l'intérieur d'une matrice permet d'éviter l'utilisation de NPs suspects d'être toxiques pour l'environnement ainsi que pour l'être humain.

Les différents matériaux élaborés dans ce chapitre ont été testés sur des souches de bactéries pathogènes *E.coli* (Gram-) et *S.aureus* (Gram+). Les films d'hydrogel de mélange Ca/Cu et Ca/Zn ainsi que les films déposés sur acier de cuivre et de zinc pur ont présenté une activité inhibitrice des bactéries. Les films de cuivre et de zinc déposés sur acier ont inhibé la croissance bactérienne surtout pour la souche de Gram+.

Les films d'hydrogel de différentes porosités peuvent être utilisés pour recouvrir des plaies ou toute autre surface non métallique dans le but de protéger cette dernière de la formation d'un biofilm. Les films déposés sur acier peuvent être utilisés quant à eux pour recouvrir toute surface métallique comme les outils chirurgicaux, les implant médicaux... Il serait alors important d'étudier le relargage des ions antimicrobiens et leur toxicité sur l'être humain.

Chapitre IV Matériaux à base d'alginate antimicrobiens dans le milieu marin

La corrosion est définie comme une dégradation physique du matériau et de ses propriétés chimiques sous l'influence de l'environnement. Le milieu marin est un environnement connu pour être favorable à la détérioration des matériaux métalliques. En effet, l'eau de mer est agressive du fait de ses propriétés physico-chimiques : conductivité élevée due à la salinité, forte teneur en ions chlorure, oxygène dissous... De plus, elle est riche en organismes vivants (bactéries, microalgues...). L'adhésion et la prolifération de ces organismes conduit à la formation de biofilms sur les surfaces métalliques immergées. Les modifications de surface qui en résultent peuvent avoir des conséquences importantes sur le processus de corrosion. En effet, la corrosion influencée par les microorganismes (ou CIM) affecte plusieurs domaines tels que l'industrie pétrolière, navale, nucléaire, les zones portuaires, les installations géothermiques, les réseaux de distribution d'eau... Les enjeux économiques liés à ce type de corrosion justifient les efforts employés pour lutter contre la détérioration des surfaces métalliques en milieu marin.

L'objectif de ce chapitre consiste à élaborer des biomatériaux à base d'alginate incluant des ions métalliques dans le but de lutter contre les biofilms. Ces matériaux doivent résister en milieu aqueux (eau douce et/ou eau marine) et lutter contre l'adhésion et la croissance microbienne (bactéries marines et microalgues) et donc à la formation de biofilms.

1. Méthode d'élaboration

La méthode d'élaboration des hydrogels en volume est la méthode de casting déjà utilisé pour l'élaboration des matériaux dans le chapitre 3 et décrite dans le chapitre 1.

Ce qui différencie les hydrogels en volume des films d'hydrogel précédents est le fait que nous ajoutons les solutions ioniques sans sécher la solution d'alginate de sodium. La dimension des hydrogels étant en relation avec le moule utilisé [150], nous obtenons des matériaux

volumiques de taille centimétrique. La Figure IV.1 présente un schéma explicatif pour l'élaboration des hydrogels en volume.

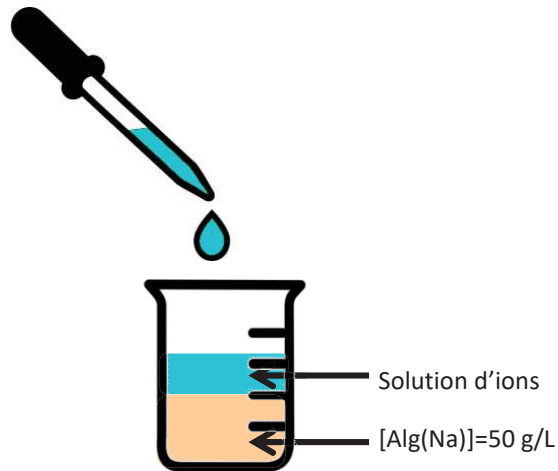


Figure IV.1 Schéma montrant la méthode d'élaboration des hydrogels en volume par la méthode de casting

Les solutions d'ions utilisées sont : chlorure de calcium ($C = 0,36 \text{ mol/L}$), sulfate de cuivre ($C = 0,1 \text{ mol/L}$) et acétate de zinc ($C = 0,1 \text{ mol/L}$). Ainsi, l'hydrogel en volume fabriqué dépendra de la solution d'ions ajoutée : alginate de calcium, alginate de cuivre ou alginate de zinc (Figure IV.2). Une période de 24h est nécessaire afin que la totalité de l'alginate se gélifie et que l'hydrogel soit saturé en ions.



Figure IV.2 Hydrogels en volume : (a) alginate de calcium, (b) alginate de cuivre et (c) alginate de zinc

La Figure IV.2 montre une photographie de cubes d'hydrogels d'alginate de calcium, cuivre et zinc. La couleur est caractéristique des ions utilisés. L'alginate de calcium présente une couleur blanche et transparente. L'alginate de cuivre a une couleur verte. Alors que l'alginate de zinc présente une couleur blanche et opaque.

2. Caractérisations physico-chimiques

2.1. Microscopie électronique à balayage et Spectroscopie à rayons X à dispersion d'énergie (MEB et EDX)

Une étude surfacique à l'aide du microscope électronique à balayage a été effectuée sur ces différents matériaux afin d'étudier leur surface ainsi que leur composition chimique.

Comme le montre la Figure IV.3, les différents hydrogels de calcium, cuivre et zinc présentent une surface lisse non poreuse pour une échelle de 20 μm . La surface apparaît lisse pour toutes les échelles (plus petites et plus grandes). La surface des différents hydrogels en volume est donc identique à celle des films d'hydrogel. Le fait d'avoir les hydrogels en films ou en volume n'affecte pas la surface des matériaux.

Matériaux à base d'alginate antimicrobiens dans le milieu marin

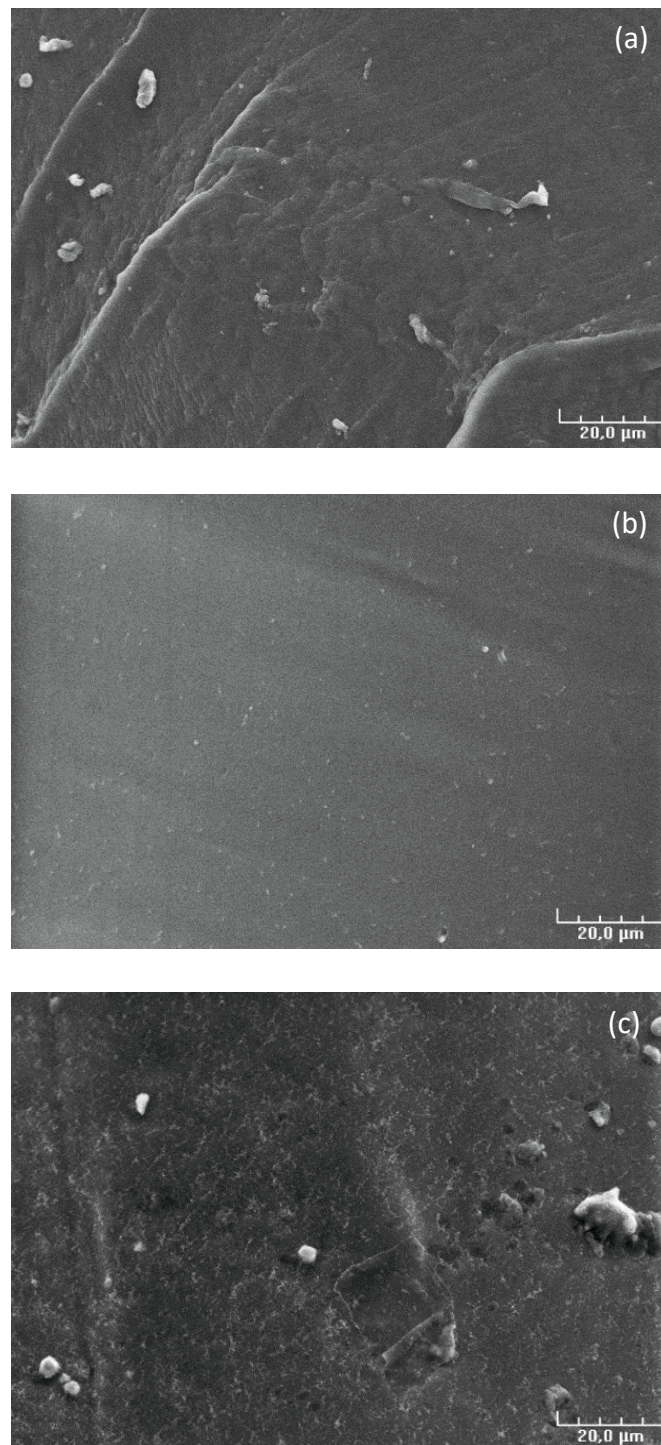


Figure IV.3 Clichés MEB des hydrogels à base d'alginate de calcium (a), de cuivre (b) et de zinc (c)

Matériaux à base d'alginate antimicrobiens dans le milieu marin

En étudiant ces matériaux via l'analyse élémentaire EDX, nous avons pu déterminer la composition chimique de ces hydrogels rincés (Tableau IV.1). Les proportions présentées dans les différents tableaux sont des pourcentages atomiques.

Tableau IV.1 Composition atomique (%) des différentes hydrogels (a) $Ca_{0,36}$, (b) $Cu_{0,1}$ et (c) $Zn_{0,1}$

Matériau	C	O	Na	Ca	Cu	Zn
$Ca_{0,36}$	54,5	40,5	0,3	4,7	-	-
$Cu_{0,1}$	68,1	27,3	1,7	-	2,7	-
$Zn_{0,1}$	65,8	32,4	-	-	-	1,5

Le Tableau IV.1 nous permet de démontrer la présence des ions insérés dans les hydrogels par adsorption [96,150]. Nous remarquons que les pourcentages atomiques de C et O sont très importants comme déjà vu précédemment. De même, nous observons, une présence de sodium dans les matériaux $Ca_{0,36}$ et $Cu_{0,1}$. Le matériau $Zn_{0,1}$ ne contient pas de sodium. En ajoutant alors, la solution ionique à l'alginate de sodium, nous avons pu remplacer en partie ou totalement les ions de sodium présents dans la solution d'alginate initiale. Ces résultats EDX observés pour les hydrogels en volume sont comparables aux résultats EDX (Tableau III.1) obtenus pour les films d'hydrogel.

Des matériaux de mélange calcium/cuivre et calcium/zinc de même concentrations que les films d'hydrogels étudiés dans le Chapitre III sont caractérisés physico-chimiquement par la suite. Pour ce faire, des tranches de surface rincées (SR), des tranches de surface non rincées (SNR), des tranches du centre rincées (CR) et des tranches du centre non rincées (CNR), comme le montre la Figure IV.4, provenant des cubes d'hydrogel élaborés ont été découpées au cutter et étudiées par EDX.

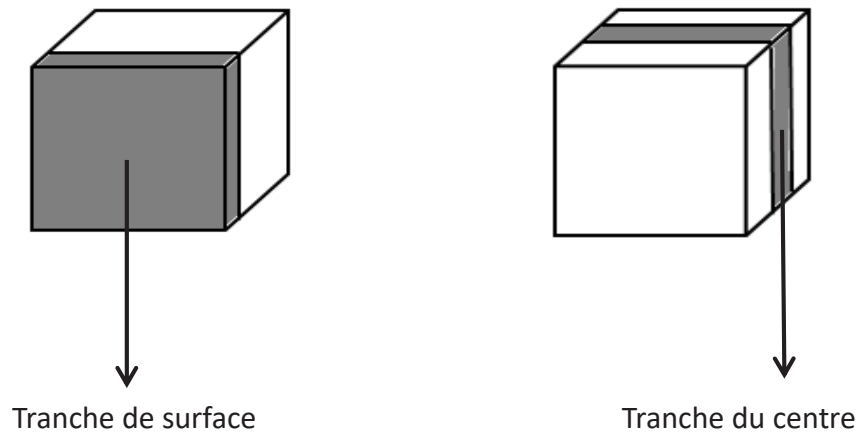


Figure IV.4 Schéma explicatif des tranches d'hydrogels coupés pour les différentes caractérisations en EDX (a) tranche de surface et (b) tranche de centre

Dans le Tableau IV.2, nous présentons une tranche de centre et l'autre de surface du même matériau afin d'étudier l'effet du rinçage sur des tranches de surface et sur des tranches de centre.

Tableau IV.2 Tableau de composition atomique des différentes tranches de l'hydrogel $Ca_{0,27}Cu_{0,05}$

Matériaux	C	O	Na	Ca	Cu	S	Cl
$Ca_{0,27}Cu_{0,05}CNR$	24,3	19,9	22,4 (85,5)	3,2 (12,2)	0,6 (2,3)	3,3	26,3
$Ca_{0,27}Cu_{0,05}CR$	68,3	25,3	1,1 (29,7)	1,8 (48,7)	0,8 (21,6)	-	2,7
$Ca_{0,27}Cu_{0,05}SNR$	56,8	22,5	3,3 (32,7)	4,9 (48,5)	1,9 (18,8)	-	10,6
$Ca_{0,27}Cu_{0,05}SR$	58,2	39,9	-	0,9 (47,4)	1,0 (52,6)	-	-

Nous remarquons d'après le Tableau IV.2 que les pourcentages de carbone et d'oxygène dans les matériaux évoluent puisque ce sont des éléments légers et que le carbone et l'oxygène peuvent être majorés à cause d'une couche de pollution sur le matériau. Pour s'affranchir des variations

Matériaux à base d'alginate antimicrobiens dans le milieu marin

observées pour le carbone et l'oxygène, nous avons considéré uniquement les cations (normalisés à 1).

$$\%_{Na} + \%_{Ca} + \%_{Cu} = 100\% \quad (IV.1)$$

Les valeurs normalisées sont présentées entre parenthèses dans le Tableau IV.2. Nous pouvons remarquer que le rinçage du matériau avec de l'eau désionisée conduit à une diminution du pourcentage de Na, S et Cl : ces éléments ne sont pas liés à la matrice d'alginate. Ce sont des ions libres présents à la surface de la matrice. Le Na provient de la solution d'alginate de sodium initiale, il diminue de 55% (au centre) et de 33% (à la surface) après rinçage. Le sodium lié toujours à la matrice d'alginate n'est présent qu'au centre du matériau à 30%. Ce pourcentage peut être plus faible en laissant la solution ionique plus longtemps avant le rinçage. Le S ainsi que le Cl proviennent des solutions ioniques de sulfate de cuivre et de chlorure de calcium utilisées respectivement. Nous pouvons en conclure que le calcium est présent de façon homogène dans le matériau alors que le cuivre est plus abondant à la surface qu'au centre où la présence de sodium est observée.

Nous avons effectué les mêmes mesures sur les différentes tranches pour l'hydrogel d'alginate de zinc (Tableau IV.3). Nous remarquons que les pourcentages atomiques de carbone et d'oxygène sont du même ordre de grandeur.

Tableau IV.3 Tableau de composition atomique des différentes tranches de l'hydrogel $Ca_{0,27}Zn_{0,05}$

Matériaux	C	O	Na	Ca	Zn	Cl
Ca_{0,27}Zn_{0,05}CNR	62,1	24,9	4,2 (48,3)	1,8 (20,7)	2,7 (31,0)	4,3
Ca_{0,27}Zn_{0,05}CR	64,4	30,4	-	1,0 (19,6)	4,1 (80,4)	0,1
Ca_{0,27}Zn_{0,05}SNR	62,4	27,0	3,1 (49,2)	2,9 (46,0)	0,3 (4,8)	4,3
Ca_{0,27}Zn_{0,05}SR	58,0	34,0	-	4,1 (83,7)	0,8 (16,3)	3,1

Matériaux à base d'alginate antimicrobiens dans le milieu marin

L'effet du rinçage est similaire pour les hydrogels de cuivre et de zinc. Il diminue la proportion du sodium et du chlore. Les rapports Ca/Cu et Ca/Zn sont différents que ce soit à la surface du matériau ou au centre. Ceci peut vraisemblablement impliquer une affinité différente entre la matrice d'alginate de sodium et les cations présents dans la solution ionique. Les matériaux présentés dans le Tableau IV.3 semblent être hétérogènes. Nous observons une présence de zinc plus importante au centre qu'en surface contrairement au calcium qui est majoritairement à la surface. Il est probable que ces matériaux présentent une couche extérieure (surface) formée majoritairement de calcium qui enveloppe un cœur formé majoritairement de zinc.

Dans le but d'utiliser des matériaux contenant des mélanges calcium/cuivre et calcium/zinc, il est important d'étudier l'effet d'ajout du calcium dans les solutions ioniques. Ainsi nous avons comparé des hydrogels élaborés avec la même concentration d'ions de cuivre ou de zinc, l'un contenant du calcium et l'autre sans calcium. Nous nous intéressons aux tranches centrales rincées possédant 80,4% de zinc qui seront utilisées ultérieurement dans les tests antimicrobiens.

Tableau IV.4 Tableau de composition atomique des tranches de centre rincées des hydrogels $\text{Cu}_{0,05}$ et $\text{Ca}_{0,27}\text{Cu}_{0,05}$

Matériaux	C	O	Na	Ca	Cu	S	Cl
$\text{Cu}_{0,05}\text{CR}$	58,2	37,4	3,0 (68,2)	-	1,4 (31,8)	-	-
$\text{Ca}_{0,27}\text{Cu}_{0,05}\text{CR}$	68,3	25,3	1,1 (29,7)	1,8 (48,7)	0,8 (21,6)	-	2,7

Nous comparons initialement les deux tranches centrales rincées d'hydrogel à base de cuivre. Nous remarquons que pour une faible concentration de cuivre de 0,05 mol/L, l'échantillon est sous forme solide aux extrémités mais visqueux au centre ; en effet, seule une petite partie de l'alginate est gélifiée expliquant le fort pourcentage de Na (68,2%). L'ajout du calcium fait diminuer la proportion de Na à 29,7%. Nous pouvons en déduire que l'ajout du calcium gélifie une plus grande partie de l'alginate.

Nous comparons ensuite les deux tranches centrales rincées d'hydrogel à base de zinc. Les résultats EDX sont présentés dans le Tableau IV.5.

Matériaux à base d'alginate antimicrobiens dans le milieu marin

Tableau IV.5 Tableau de composition atomique des tranches de centre rincées des hydrogels $Zn_{0,05}$ et $Ca_{0,27}Zn_{0,05}$

Matériaux	C	O	Na	Ca	Zn	Cl
$Zn_{0,05}CR$	64,0	28,6	4,9 (66,2)	-	2,5 (33,8)	-
$Ca_{0,27}Zn_{0,05}CR$	64,4	30,4	-	1,0 (19,6)	4,1 (80,4)	0,1

En comparant les deux tranches centrales rincées d'hydrogel à base de zinc, le pourcentage de Na initialement à 66,2% devient nul après ajout du calcium. D'ailleurs nous observons à l'œil nu pour le matériau de zinc sans calcium, le même phénomène observé pour celui de cuivre (des extrémités solides et un cœur visqueux). Les concentrations de cuivre et zinc de 0,05 mol/L ne sont pas suffisantes pour remplacer la totalité du sodium présent dans la matrice de l'alginate.

L'objectif étant d'étudier l'effet de ces matériaux sur des souches de bactéries et de microalgues, il est alors nécessaire de comparer les tranches de surface aux tranches centrales rincées afin de choisir lesquelles des deux utiliser pour les tests antimicrobiens. Nous comparons alors la tranche de surface rincée à celle de centre rincée pour les hydrogels d'alginate de calcium/cuivre (Tableau IV.6) et de calcium/zinc (Tableau IV.7).

Tableau IV.6 Tableau de composition atomique des tranches de centre rincées et des tranches de surface rincées de l'hydrogel $Ca_{0,27}Cu_{0,05}$

Matériaux	C	O	Na	Ca	Cu	S	Cl
$Ca_{0,27}Cu_{0,05}SR$	58,2	39,9	-	0,9 (47,4)	1,0 (52,6)	-	-
$Ca_{0,27}Cu_{0,05}CR$	68,3	25,3	1,1 (29,7)	1,8 (48,7)	0,8 (21,6)	-	2,7

Pour le $Ca_{0,27}Cu_{0,05}$, la présence de cuivre est beaucoup plus importante en surface qu'au centre. La différence de proportion entre une tranche CR et SR pour nos matériaux est la présence du sodium présent au centre (30%) (Tableau IV.6). Ceci est probablement dû à la quantité

Matériaux à base d'alginate antimicrobiens dans le milieu marin

insuffisante d'ions divalents pouvant remplacer le sodium dans la matrice d'alginate. Nous en concluons que le cuivre gélifie en priorité la surface de l'hydrogel alors que le calcium gélifie uniformément la surface et le centre de l'hydrogel. Deux solutions se présentent pour résoudre ce problème : prolonger le temps de gélification ou augmenter le volume de la solution ionique.

Tableau IV.7 Pourcentages des différents éléments présents dans les différentes tranches d'hydrogels d'alginate calcium/zinc

Matériaux	C	O	Na	Ca	Zn	Cl
Ca_{0,27}Zn_{0,05}SR	58,0	34,0	-	4,1 (83,7)	0,8 (16,3)	3,1
Ca_{0,27}Zn_{0,05}CR	64,4	30,4	-	1,0 (19,6)	4,1 (80,4)	0,1

En comparant la tranche surfacique (SR) et centrale (CR) du Ca_{0,27}Zn_{0,05}, la présence de calcium est très importante en surface et faible au centre contrairement au zinc. Ceci montre que cet hydrogel présente une coque surfacique de calcium et un cœur riche en zinc (Tableau IV.7).

Les matériaux étudiés ci-dessus semblent être hétérogènes en comparant des tranches de surface et des tranches centrales du même matériau. Mais il est important d'étudier l'homogénéité sur une même tranche. Pour cette raison, nous avons mesuré par EDX une tranche centrale rincée du matériau Ca_{0,27}Cu_{0,05} en effectuant des mesures sur différentes positions par rapport au centre. La distance entre chaque position est de 1 mm. A l'œil nu et avant séchage du matériau, nous observons un gradient de cuivre (Figure IV.5). Les résultats présents dans le Tableau IV.8 sont normalisés par rapport à C afin de pouvoir comparer les différentes positions.

Matériaux à base d'alginate antimicrobiens dans le milieu marin



Figure IV.5 Photo montrant le gradient de cuivre à l'œil nue dans une tranche centrale de l'hydrogel $Ca_{0,27}Cu_{0,05}$ avant séchage et les différentes positions où l'EDX a été effectué

Tableau IV.8 Tableau montrant le pourcentage de chaque élément pour différentes positions sur la même tranche d'hydrogel

Eléments	O	Na	Ca	Cu	S	Cl
Position 0	40,1	2,5	6,0	0,8	4,2	6,2
Position 1	38,1	2,3	5,7	0,8	3,6	6,2
Position 2	39,7	2,6	5,9	0,8	3,8	6,3
Position 3	41,7	2,6	6,2	0,8	4,2	6,3
Position 4	41,8	2,8	6,0	0,8	4,0	6,3

Les résultats présentés montrent qu'au centre du matériau, nous n'observons pas de gradient et que le pourcentage des éléments est similaire pour les différentes positions choisies

contrairement aux bords de la tranche où le gradient est visible à l'œil nu. Ceci prouve que l'inhomogénéité est présente uniquement sur les bords de la tranche.

Les résultats EDX présentés dans cette partie nous permettent de relever les conclusions suivantes : une concentration de 0,05 mol/L de cuivre ou zinc n'est pas suffisante pour gélifier l'alginate il faut alors ajouter du calcium aux solutions ioniques. De même, le cuivre gélifie prioritairement la surface de l'hydrogel alors que le calcium gélifie uniformément la matrice. Les hydrogels calcium/zinc présentent une coque formée de calcium et un cœur formé de zinc. Finalement, les tranches centrales des hydrogels sont homogènes en accord avec la littérature [76]. Straccia *et al.* [76] ont montré que différentes tranches des hydrogels d'alginate de zinc (élaborés par gélation interne) sont homogènes en mesurant le rapport massique sec à humide. Par contre, Matyash *et al.* [152] ont trouvé qu'une gélation rapide comme celle obtenue par le CaCl₂ produit une structure non homogène. McAllister *et al.* [153] quant à eux, ont montré que l'utilisation d'une solution d'alginate de sodium de grande concentration massique (comme celle utilisée dans nos travaux 5%) augmente la densité du réseau polymérique dans l'hydrogel. Cette augmentation est en relation directe avec la diminution de la diffusivité des différentes espèces ionique à travers la matrice d'hydrogel [153]. Ceci contredit les observations de Matyash *et al.* [152] concernant l'inhomogénéité des hydrogels d'alginate de calcium par gélation externe. Dans le but d'obtenir une répétabilité lors des tests antimicrobiens, nous décidons alors d'utiliser les tranches d'hydrogel centrales considérées désormais comme homogènes.

2.2. Stabilité des matériaux

Puisque ces hydrogels en volume sont élaborés dans le but d'être utilisés pour des applications marines, il est alors intéressant d'étudier le comportement de ces matériaux lors de leur immersion dans des milieux aqueux. Tout d'abord, nous allons étudier leur stabilité dans de l'eau désionisée et ensuite dans une solution de NaCl pour une température ambiante et une température égale à 37°C (température optimale pour la croissance des bactéries pathogènes).

2.2.1. Eau désionisée

Dans le but de bien comprendre ou prédire une éventuelle dissolution des hydrogels dans l'eau, une étude par suivi cinétique de leur évolution de masse a été entreprise. Pour ce faire, trois matériaux, $Ca_{0,36}$, $Cu_{0,1}$ et $Zn_{0,1}$ ont été étudiés. Cette étude consiste à immerger des cubes d'hydrogel dans de l'eau désionisée à température ambiante puis de mesurer en fonction du temps l'évolution de leur masse $M(\%)$. L'expérience a duré 30 jours. A $t=0$, les hydrogels immergés ont été saturés en solutions ioniques correspondantes et rincés rapidement en eau désionisée afin d'enlever l'excès d'ions présent en surface.

$$M(\%) = \frac{M(t)}{M_0} \times 100 \quad (IV.2)$$

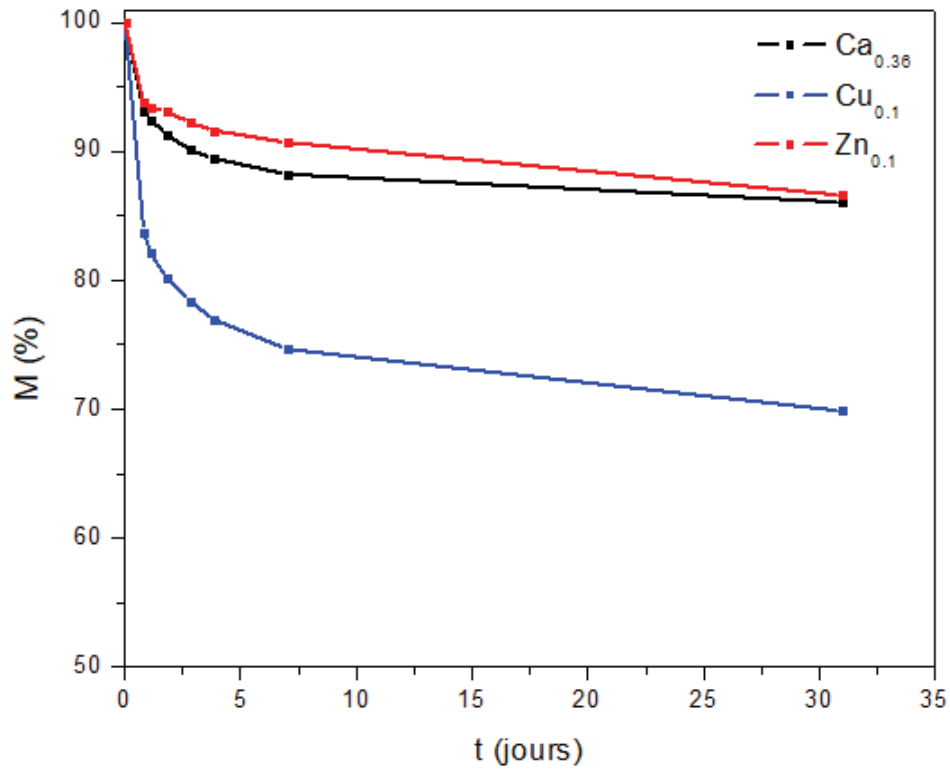


Figure IV.6 Perte de masse des matériaux d'hydrogels $Ca_{0,36}$, $Cu_{0,1}$ et $Zn_{0,1}$ en fonction du temps pour une immersion dans l'eau désionisée

Matériaux à base d'alginate antimicrobiens dans le milieu marin

Nous observons sur le graphe présenté Figure IV.6, trois courbes représentant le pourcentage de variation de masse en fonction du temps pour les trois hydrogels : alginate de calcium (courbe noire), alginate de cuivre (courbe bleue) et alginate de zinc (courbe rouge). Les trois courbes décroissent rapidement lors des cinq premiers jours. Les hydrogels de calcium et de zinc perdent alors 10% de leur masse initiale, tandis que l'hydrogel d'alginate de cuivre en perd 25%. La perte de masse devient plus lente après les cinq premiers jours. Nous remarquons que la dissolution est très importante pour l'alginate de cuivre pour lequel la perte de masse est de 30% au bout de 30 jours d'immersion. Alors que, l'alginate de calcium et de zinc sont plutôt stables avec une perte de masse d'à peu près 10% au bout des 30 jours d'immersion.

La perte de masse observée peut être attribuée à une dissolution, dégradation ou dépolymérisation du matériau. La dissolution conduit à une solution homogène lorsqu'un composé est immergé dans la solution. La dégradation se produit dans le cas d'une immersion dans une solution contenant des ions où se crée un échange d'ions [154]. Finalement la dépolymérisation est le processus de conversion d'un polymère en monomères lors d'un changement de température. Ainsi, dans le cas d'une immersion dans de l'eau désionisée, nous attribuons la perte de masse à une dissolution du matériau.

Après 30 jours d'immersion, un dépôt au fond du bécher est observé dans le cas de l'alginate de cuivre et de l'alginate de zinc. Ce dépôt montre le relargage d'ions ou une dissolution du matériau observé sur les photographies de la Figure IV.7. Ce dépôt est probablement présent mais non observable dans le cas de l'alginate de calcium puisque ce dernier est transparent et non opaque contrairement à l'alginate de zinc.

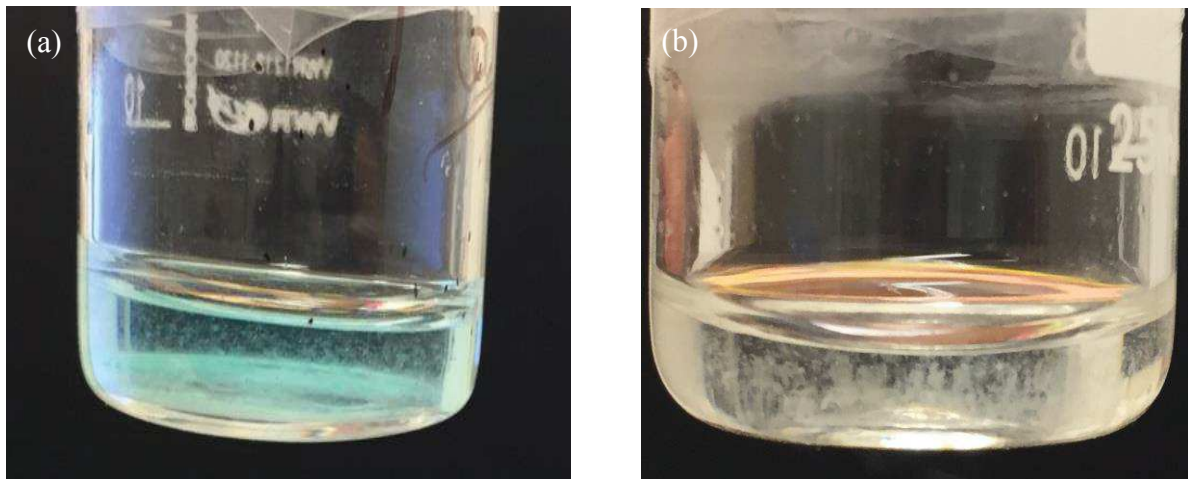


Figure IV.7 Résidus observés au fond du bécher pour l'alginate de cuivre (a) et l'alginate de zinc (b) à la fin de la période d'immersion

Dans le but de comprendre le phénomène observé, nous avons décidé d'approfondir notre recherche et d'étudier les matériaux au niveau microscopique. Les différents matériaux ont alors été examinés par MEB après 30 immersion. La Figure IV.8 présente la surface de ces matériaux. La surface n'est plus lisse désormais par rapport à la Figure IV.3 qui montrait les matériaux avant leur immersion. De plus, nous remarquons sur la Figure IV.9 qu'une partie du matériau semble être épilée ou décrochée, à une échelle de 50 μm . Ceci est dû vraisemblablement à la dissolution partielle de la matrice lorsqu'elle est immergée. Ceci peut être corrélé à la disparition de la couche superficielle des matériaux.

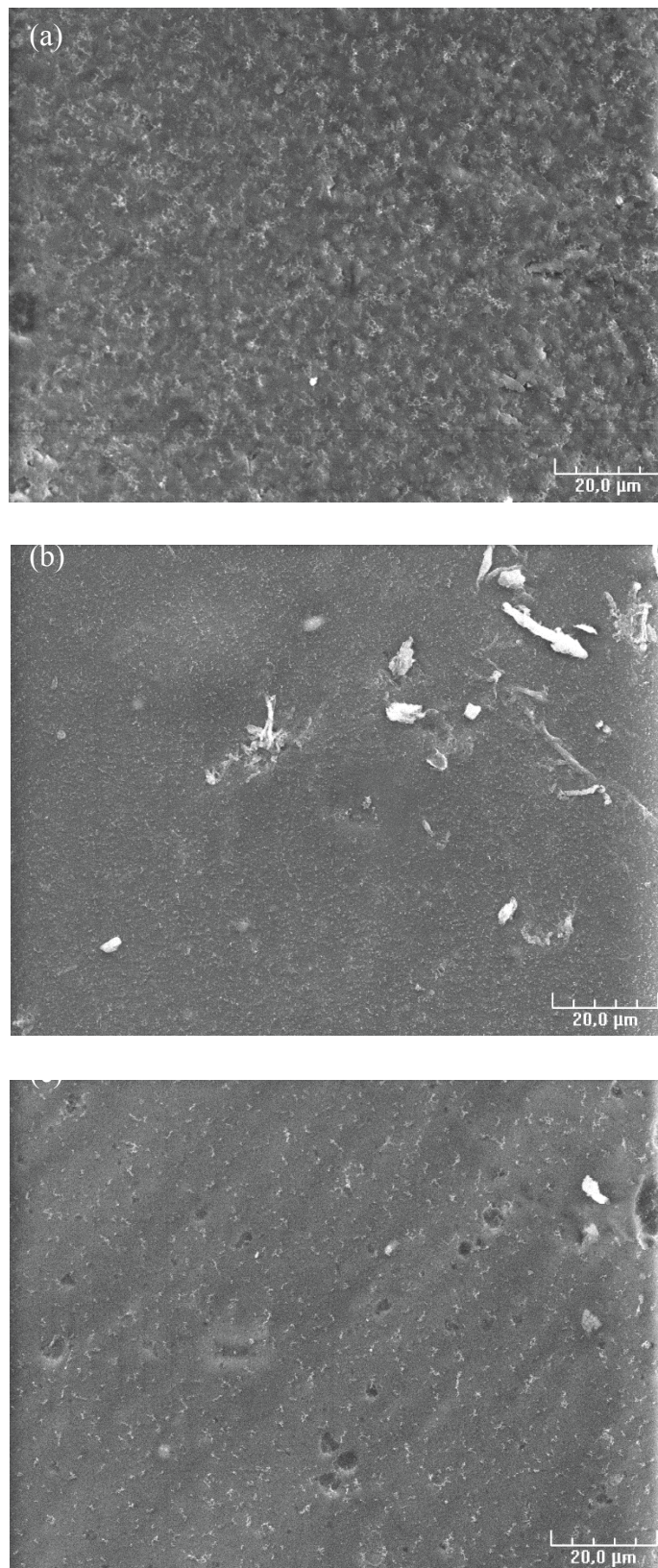


Figure IV.8 Clichés MEB de la surface de (a) $Ca_{0,36}$, (b) $Cu_{0,1}$ et (c) $Zn_{0,1}$ après 30 jours d'immersion dans de l'eau désionisée

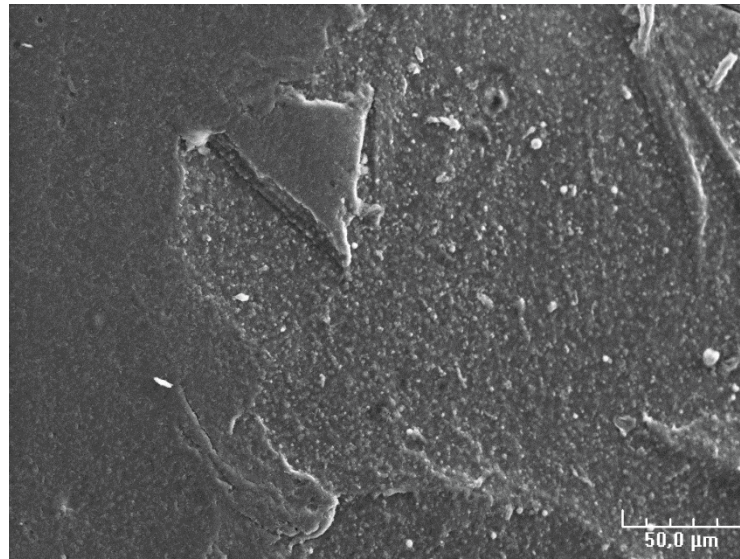


Figure IV.9 Cliché MEB de la surface de $Ca_{0,36}$ à une échelle de 50 μm après 30 jours d'immersion dans l'eau désionisée

D'après ces observations, nous pouvons conclure que les hydrogels de calcium et de zinc présentent une faible perte de masse alors que l'hydrogel à base de cuivre présente une perte de masse supérieure. Benning *et al.* [155] ont observé que l'hydrogel d'alginate de calcium (alginate de sodium de concentration de 2% et $CaCl_2$ de concentration de 0,2 mol/L) perd 16,7% de sa masse initiale au bout de 7 jours d'immersion dans un milieu de culture pour bactéries pathogènes. Ils considèrent que cette perte de masse est modérée et que le matériau peut toujours être considéré comme stable. Cette perte de masse de 16,7% est supérieure à celle que nous observons pour nos matériaux. Ceci peut être dû à la présence d'ions supplémentaires dans le milieu considéré par Benning *et al.* [155]. L'alginate de calcium présentant une faible perte de masse comme observé sur la Figure IV.6, nous pouvons en déduire que l'ajout de calcium aux solutions ioniques utilisées pour préparer les hydrogels de cuivre et de zinc pourrait améliorer la stabilité des hydrogels dans l'eau désionisée. Dans le but de confirmer cette hypothèse, une seconde expérience a été effectuée en immergeant un cube d'hydrogel d'alginate de calcium, d'alginate de calcium/cuivre et d'alginate de calcium/zinc dans l'eau désionisée pendant 48h puisque l'évolution de masse était la plus importante lors des premiers jours. Les résultats de cette expérience sont présentés sur la Figure IV.10.

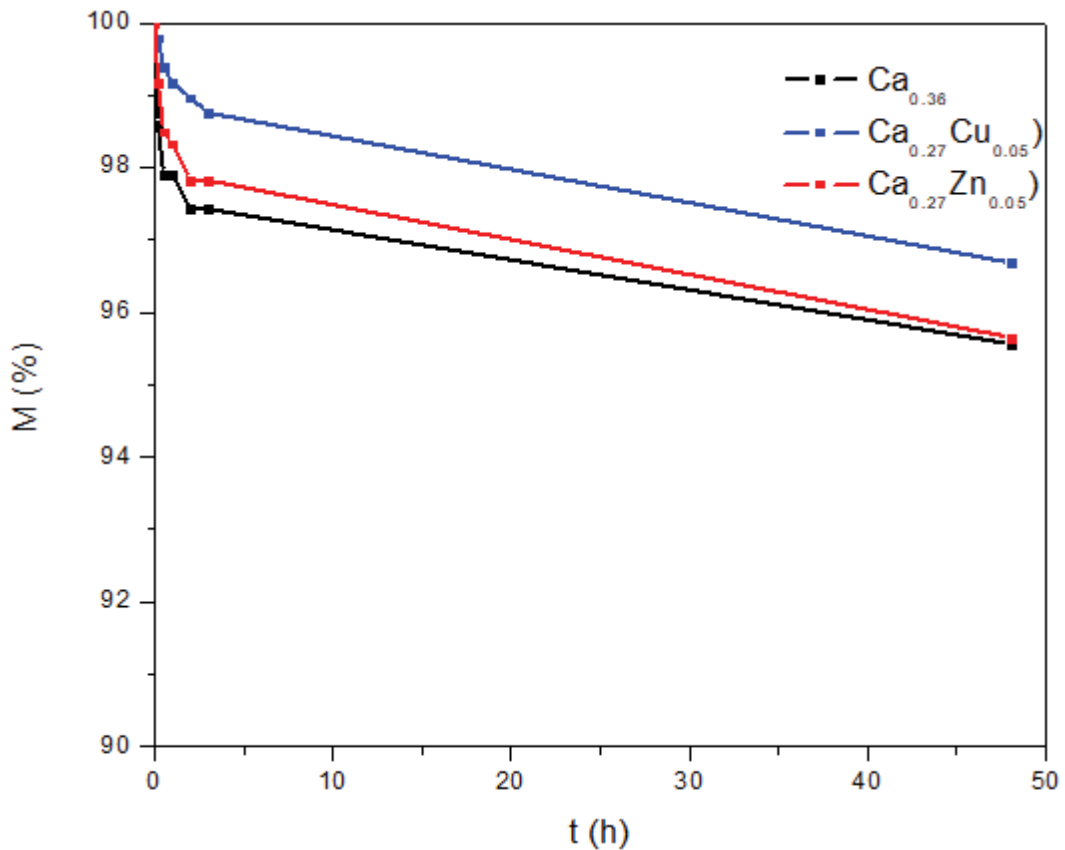


Figure IV.10 Perte de masse des matériaux d'hydrogels $Ca_{0,36}$, $Ca_{0,27}Cu_{0,05}$ et $Ca_{0,27}Zn_{0,05}$ en fonction du temps pour une immersion dans l'eau désionisée

Nous observons sur la Figure IV.10, que les courbes correspondantes au calcium et au calcium/zinc sont presque identiques. L'hydrogel de calcium/zinc est alors aussi stable que l'hydrogel de calcium. Par contre, la courbe bleue pour le calcium/cuivre présente une perte de masse plus faible que dans le cas de l'hydrogel de calcium. Ceci montre que l'ajout du calcium semble rendre le matériau plus stable.

2.2.2. Eau salée (30 g/L)

Le but de ce chapitre étant d'élaborer des matériaux pour des applications dans le milieu marin, il est important d'étudier la stabilité des matériaux dans l'eau salée. Une solution de NaCl de concentration équivalente à 30 g/L a été préparée. Cette solution synthétique contient la même

concentration de NaCl que l'eau de mer afin d'étudier l'influence du sel sur nos matériaux. La perte de masse des hydrogels a été étudiée en fonction du temps dans ce milieu. La Figure IV.11 présente les courbes d'évolution de masse des hydrogels $\text{Ca}_{0,36}$, $\text{Cu}_{0,1}$ et $\text{Zn}_{0,1}$ pendant 30 jours d'immersion dans l'eau salée. A $t=0$, les trois hydrogels étaient saturés en leur solution ionique et rincés rapidement à l'eau désionisée comme précédemment.

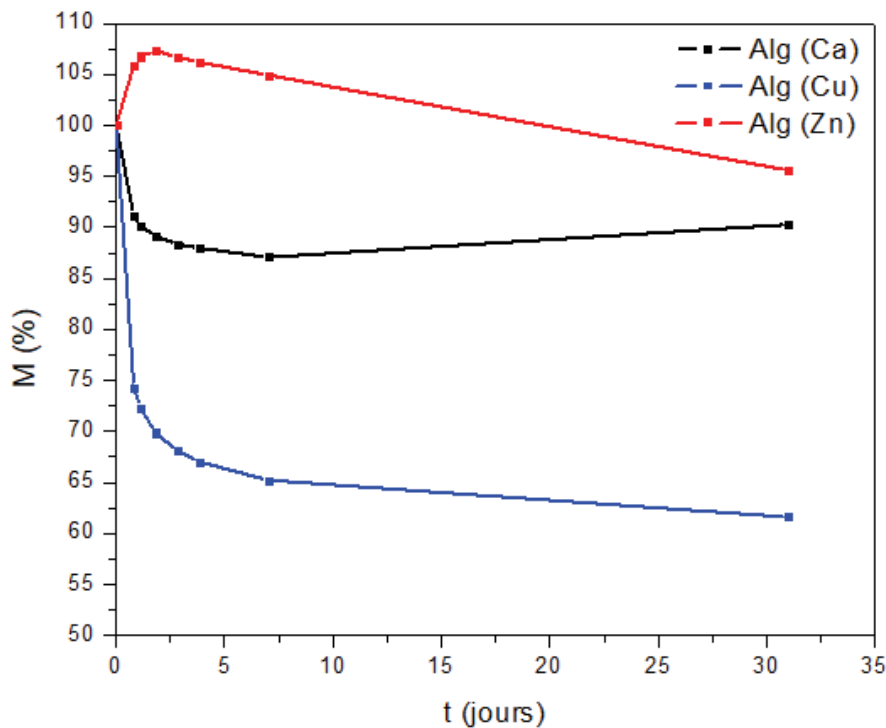


Figure IV.11 Perte de masse des hydrogels $\text{Ca}_{0,36}$, $\text{Cu}_{0,1}$ et $\text{Zn}_{0,1}$ en fonction du temps pour une immersion dans une solution de NaCl pour une durée de 30 jours

Nous observons sur la Figure IV.11, trois courbes dont le comportement diffère contrairement au cas précédent. Lors des 5 premiers jours de l'expérience, les matériaux présentent un changement de masse, que ce soit une diminution ou une augmentation. Après les 5 jours d'immersion, nous observons une faible perte de masse qui continue tout au long de l'expérience pour les trois matériaux. La courbe correspondant au calcium décroît de 10% lors des quelques premiers jours puis augmente de quelques pourcents, atteignant une perte de masse totale de 15% à la fin de l'expérience. La courbe bleue associée à l'alginate de cuivre décroît fortement lors des

cinq premiers jours et continue à décroître faiblement tout au long de l'expérience. Par contre, la courbe de l'alginate de zinc présente un comportement différent des deux autres : nous observons une augmentation de masse les premiers jours suivie d'une perte de masse.

L'alginate de calcium ainsi que l'alginate de cuivre ne semblent pas être affectés par le sel présent dans l'eau salée préparée, le taux de perte de masse pour ces matériaux est identique que ce soit dans le cas d'une immersion dans de l'eau désionisée ou dans l'eau salée. Par contre, la présence de sel dans le milieu d'immersion, produit une perte de masse supplémentaire de 10% par rapport une immersion dans de l'eau désionisée. Dans la littérature, la stabilité des hydrogels est étudiée dans des milieux de culture de bactéries pathogènes contenant du NaCl [155], [156]. Golafshan *et al.* en 2017 [156] ont montré que lors d'une immersion en PBS (*Phosphate Buffer Saline*) à 37°C pendant 28 jours, les hydrogels d'alginate + PVA₁ qu'ils ont élaboré perdent 67% de leur masse initiale. Quant à Benning *et al.* en 2017 [155], ils ont étudié la dégradation de leurs matériaux (mélanges de plusieurs polymères) lors d'une immersion dans du EDCG (*Endothelial Cell Growth Medium*). Ils ont observé une faible diminution de masse modérée pendant 7 jours d'immersion. Aucune comparaison entre nos résultats et la littérature est possible pour les hydrogels à base de cuivre du fait de l'absence d'étude similaire.

L'alginate de zinc présente un comportement différent de l'alginate de calcium et de cuivre. Il gonfle lors de son immersion dans l'eau salée au bout des premiers jours de l'expérience (augmentation de masse de 10%) puis sa masse diminue pour atteindre au bout des 30 jours d'immersion une perte de masse de 5%. Straccia *et al.* [76] expliquent ce phénomène par le fait que lors du remplacement des ions Zn²⁺ par les ions Na⁺, les répulsions électrostatiques des chaînes COO⁻ augmentent ce qui entraînerait une relaxation du réseau polymérique [76], et donc une augmentation de masse due à l'absorption d'eau. Mais cette augmentation de masse est-elle due à l'absorption d'eau ou de sel (Na⁺ et Cl⁻) ou bien à une absorption d'eau salée donc des deux en parallèle (eau et sel) ? Pour y répondre, tous les matériaux récupérés après 30 jours d'immersion ont été examinés par une analyse en MEB et en EDX.

Les clichés de la Figure IV.12 montrent clairement une grande modification de l'état de surface des différents hydrogels après leur immersion : leur surface devient très rugueuse. Nous remarquons une structure cristalline sur l'alginate de zinc due probablement aux cristaux de sel NaCl.

Matériaux à base d'alginate antimicrobiens dans le milieu marin

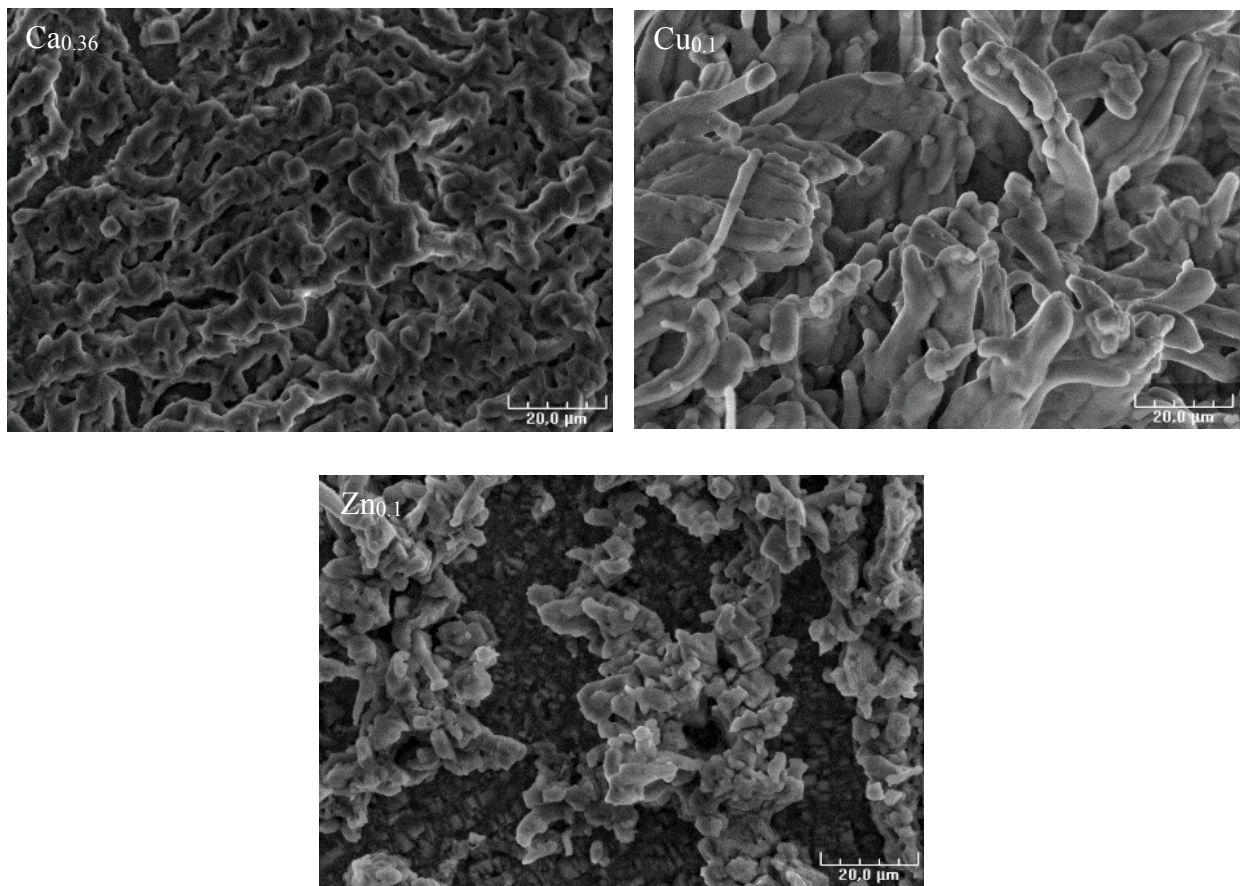


Figure IV.12 Clichés MEB de la surface des matériaux de $Ca_{0,36}$, $Cu_{0,1}$ et $Zn_{0,1}$ après 30 jours d'immersion dans de l'eau salée

Les trois matériaux ont été étudiés par EDX afin d'étudier leur composition chimique et les résultats sont présentés sur le Tableau IV.9.

Tableau IV.9 Pourcentages des différents éléments présents dans les hydrogels $Ca_{0,36}$, $Cu_{0,1}$ et $Zn_{0,1}$ après immersion dans l'eau salée pendant 30 jours

Matériaux	C	O	Ca	Cu	Zn	Na	Cl
$Ca_{0,36}$	21,3	9,5	1,4	-	-	32,9	34,9

Matériaux à base d'alginate antimicrobiens dans le milieu marin

Cu_{0,1}	46,2	1,3	-	0,7	-	25,0	26,7
Zn_{0,1}	31,4	1,7	-	-	0,5	29,5	36,6

Nous observons de très grandes concentrations de Na et de Cl dans les différents hydrogels après leur immersion dans l'eau salée. Les concentrations de sodium et de chlore sont extrêmement proches. Ceci explique que les hydrogels ont absorbé du sel. Afin de mieux comprendre le phénomène de gonflement de l'hydrogel à base de zinc les premiers jours, une deuxième expérience a été effectuée.

Cette expérience consiste à découper en quatre parties de masse initiale identique (Figure IV.13). Chacune a été immergée séparément dans l'eau salée NaCl 30 g/L pendant un temps différent allant de 24 à 80 h afin de comprendre le phénomène observé durant les premiers jours. Chaque échantillon est ensuite retiré, séché puis pesé. Les résultats sont indiqués dans le Tableau IV.10. La masse à t=0 désigne la masse initiale sèche de chaque partie.

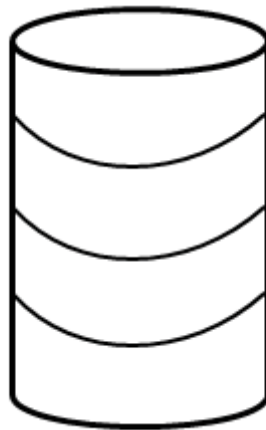


Figure IV.13 Schéma représentant le découpage des morceaux d'hydrogels utilisés pour cette expérience

Tableau IV.10 Tableau présentant la masse de chaque morceau d'hydrogel (g) après un temps d'immersion t(h)

	Masse (g)		
Temps d'immersion (h)	Alg(Ca)	Alg(Cu)	Alg(Zn)

0	0,35	0,34	0,20
24	0,33	0,31	0,26
58	0,34	0,32	0,26
80	0,33	0,30	0,27

D'après les valeurs du Tableau IV.10, nous remarquons que même après le séchage, l'hydrogel à base de calcium diminue très faiblement de masse afin d'arriver à 0,33g au bout de 80h. L'alginate de calcium reste l'hydrogel le plus stable.

La masse des échantillons d'hydrogel de cuivre diminue de 0,34g initialement jusqu'à 0,30g après 80h d'immersion. L'hydrogel de cuivre présente le taux de dégradation le plus important. Le milieu d'immersion devient vert dans le cas de l'hydrogel de cuivre

Les masses des échantillons d'hydrogel à base de zinc augmentent lors de leur immersion. Ces derniers initialement de masse égale à 0,2g augmentent de 0,07g au bout de 80h d'immersion. L'hydrogel de zinc présente une augmentation de masse les premiers jours d'immersions. Nous pouvons en déduire que l'augmentation de masse n'est pas seulement attribuée à l'absorption de l'eau. Mais elle est aussi due à l'absorption de sodium et de chlore, avec un relargage de zinc qui est beaucoup plus faible que celui du cuivre.

La perte de masse est alors associée à une dégradation du matériau que ce soit sous forme de dissolution de la matrice ou sous forme de relargage d'ions. Ainsi, on peut s'attendre à ce que les ions Zn^{2+} soient relargués sur une durée plus longue (faible perte de masse sur 30 jours d'immersion) alors qu'une plus grande partie des ions Cu^{2+} est relarguée sur une durée plus courte (forte perte de masse les premiers jours d'immersion). Les résultats du Tableau IV.10 pour les trois matériaux confirment ceux de la Figure IV.11.

2.2.3. Effet de la température

Dans le but d'étudier l'influence de la température sur la stabilité de nos matériaux, la même expérience que précédemment a été effectuée mais à une température fixe de 37°C. Les hydrogels

ont été pesés en fonction du temps pendant 5 jours d'immersion dans l'eau désionisée et dans l'eau salée (concentration de NaCl de 30 g/L). Nous nous intéressons à la stabilité des hydrogels pour une immersion de 5 jours puisque cette durée inclue le temps d'incubation des bactéries pathogènes qui est de 48h.

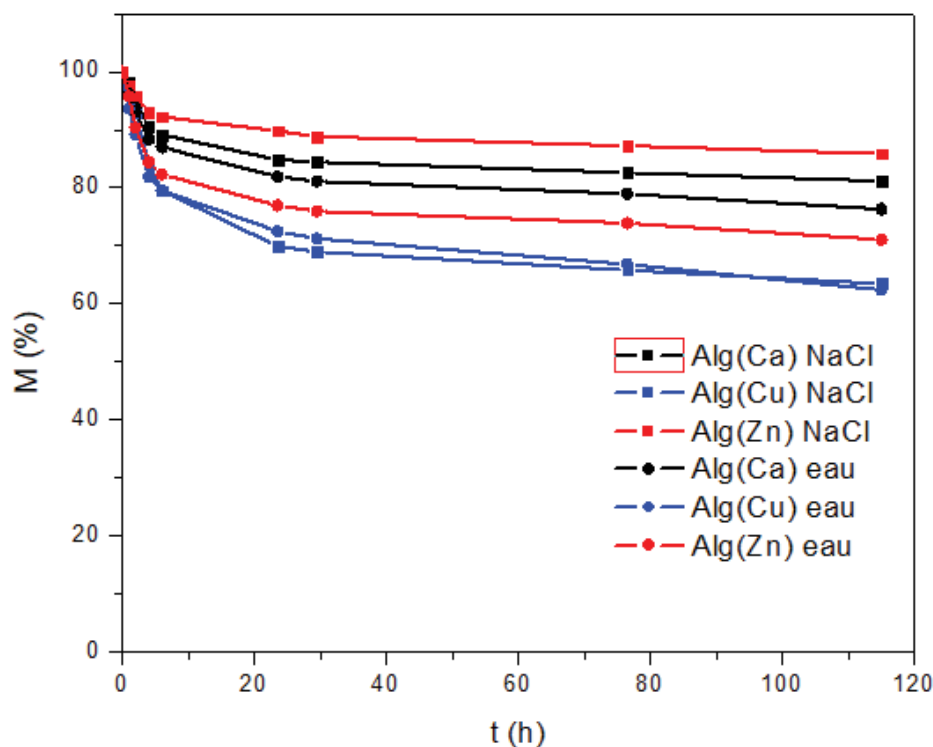


Figure IV.14 Evolution de masse des hydrogels $Ca_{0,36}$, $Cu_{0,1}$ et $Zn_{0,1}$ en fonction du temps pour une durée de 5 jours à 37 °C

Nous observons sur la Figure IV.14, les 6 courbes de la perte de masse pour les hydrogels $Ca_{0,36}$, $Cu_{0,1}$ et $Zn_{0,1}$ pour une immersion de 5 jours dans l'eau désionisée et dans de l'eau salée. Les courbes présentent toutes un comportement identique. Dans de l'eau désionisée, les hydrogels de calcium, de cuivre et de zinc ont des pertes de masse de 24%, 37,5% et 29% respectivement. Dans le cas d'une immersion dans l'eau salée, le $Ca_{0,36}$ atteint une perte de masse de 12%, le $Cu_{0,1}$ de 35% et le $Zn_{0,1}$ de 14%. Le matériau à base de calcium reste le plus stable et celui à base de cuivre le moins stable. L'hydrogel contenant du zinc ne présente plus le phénomène de gonflement observé dans le cas d'une immersion dans l'eau salée à température ambiante, mais perd 14% de sa masse initiale. Physiquement ceci n'est pas une dégradation thermique puisque cette dernière est

observée pour des températures supérieures à 400°C. A 37°C, c'est une dissolution accentuée par l'élévation de la température. En comparant le taux de perte de masse au bout de 5 jours entre l'expérience effectuée à température ambiante et celle à 37°C, nous pouvons émettre deux hypothèses : l'augmentation de température de 20 à 37°C augmenterait la mobilité des ions ce qui entraînerait la migration des ions des matériaux et par conséquent une perte de masse de tous les hydrogels ou l'augmentation de température affaiblirait les liaisons à l'intérieur des matériaux permettant ainsi une dégradation plus importante pour des températures plus élevées.

Les résultats de cette partie nous permettent de conclure que les hydrogels contenant du calcium sont les plus stables indépendamment du milieu d'immersion et de la température. Ainsi, dans le but d'obtenir des hydrogels stables en gardant les propriétés antibactériennes associés aux ions Cu^{2+} et Zn^{2+} , des hydrogels à mélange calcium/cuivre et calcium/zinc sont probablement plus adaptés. Ces hydrogels à mélange Ca/Cu et Ca/Zn seront alors considérés pour des applications dans le milieu marin.

3. Tests antimicrobiens

3.1. Hydrogels en volume

Les tests antimicrobiens présentés dans ce paragraphe ont été effectués en collaboration avec BIODIMAR® à Brest. Les hydrogels élaborés ont été testés sur des souches de microalgues ainsi que sur des souches de bactéries marines.

3.1.1. Microalgues

Le protocole expérimental est expliqué dans le chapitre 2 paragraphe 2.2. La Figure IV.15 présente une photographie de la plaque de 24 puits contenant les différents échantillons testés lors de l'une de nos expériences. Les tranches d'hydrogel peuvent être reconnues suivant leur couleur.

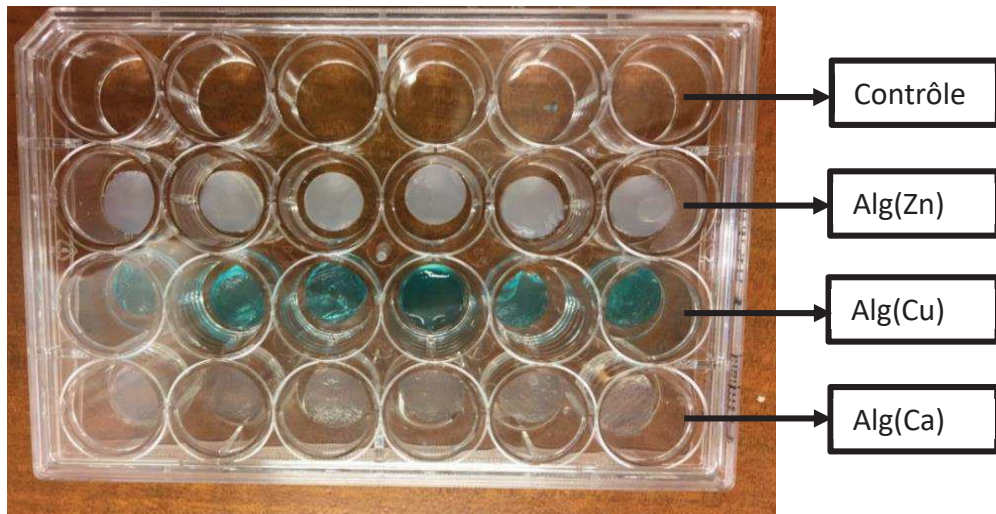


Figure IV.15 Plaque de 24 puits contenant 6 répliques de chaque matériau

Tout d'abord, il est nécessaire de tester nos matériaux sur des souches de microalgues dans le but de déterminer une éventuelle toxicité des concentrations de cuivre et de zinc pour l'environnement marin. La première souche de microalgues testée est *Halamphora Coffeaeformis*. Cette souche de microalgues a été choisie du fait de son adhésion à différents supports et son rôle sur la colonisation de surfaces en produisant des substances polymériques extracellulaires (EPS) [156,157]. L'adhésion de cette microalgue est plus prononcée sur des surfaces hydrophobes que sur des surfaces hydrophiles [159]. Les premiers matériaux testés sont les hydrogels contenant uniquement une espèce chimique $Ca_{0,36}$, $Cu_{0,1}$ et $Zn_{0,1}$. Les résultats sont présentés Figure IV.16 sous forme de pourcentage d'inhibition de croissance en bleu et inhibition d'adhésion en rouge. Le pourcentage d'inhibition est calculé selon l'équation :

$$\%_{inhibition} = \frac{DO_{contrôle} - DO_{matériau}}{DO_{contrôle}} \quad (IV.3)$$

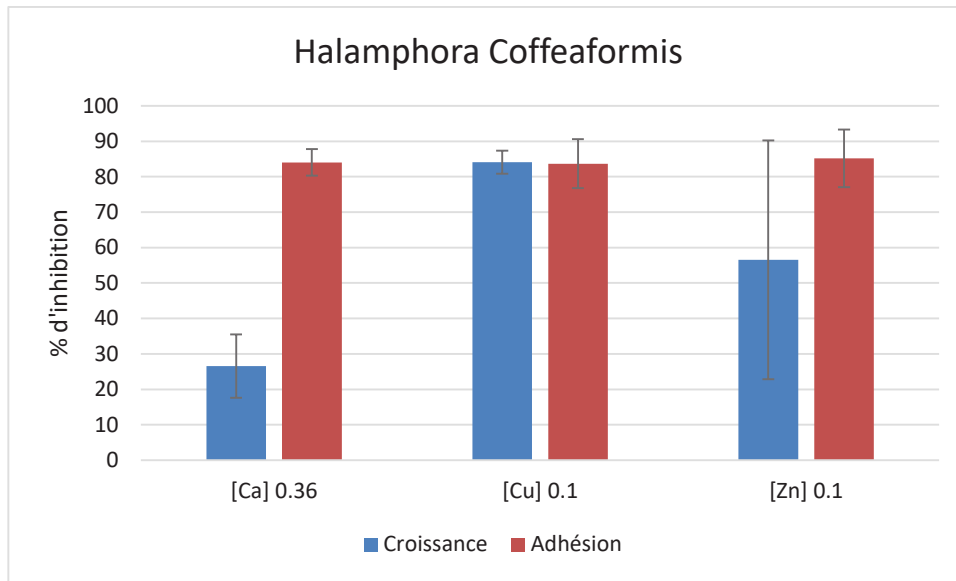


Figure IV.16 Pourcentage d'inhibition de croissance et d'adhésion de la souche de microalgue *Halamphora coffeaformis* pour les hydrogels $Ca_{0,36}$, $Cu_{0,1}$ et $Zn_{0,1}$

Le graphe présenté Figure IV.16 montre clairement un effet de nos matériaux sur la souche de microalgue testée. Les pourcentages d'inhibition d'adhésion sont élevés (voisins de 85%) pour les 3 matériaux. Par contre, la croissance des microalgues diffère suivant les hydrogels. L'alginate de calcium présente un pourcentage d'inhibition de croissance faible de 25%, l'alginate de zinc inhibe moyennement la croissance alors que l'alginate de cuivre inhibe la croissance de 85%. Par conséquent, l'alginate de calcium limite l'adhésion sans vraiment limiter la croissance, l'alginate de cuivre limite la croissance et l'adhésion avec un pourcentage d'inhibition de croissance très élevé de 85% ce qui est considéré comme toxique pour les microalgues. L'hydrogel de zinc limite fortement l'adhésion mais semble moins toxique pour la souche de microalgue.

Pour les concentrations ioniques utilisées, les matériaux à base de cuivre et de zinc conduisent à un mode d'action double : une inhibition de croissance et d'adhésion. Ce mode d'action double permet d'allonger la durée de protection contre le biofouling puisque les quelques cellules adhérant la surface vont croître très lentement. Le fait que pour l'alginate de zinc, l'inhibition d'adhésion soit supérieure à l'inhibition de croissance, présente un résultat très important concernant la législation pour les peintures antifouling. Le mode d'action de ce matériau n'est pas basé sur la toxicité. La mise sur le marché et l'utilisation des produits biocides ont été régulées (BPR, Regulation (EU) 528/2012). Tout matériau antifouling doit agir dans la limite de la fenêtre

thérapeutique. Cette dernière consiste à avoir une concentration conduisant à une inhibition de l'adhésion ou du développement des cellules qui soit inférieure à celle qui conduit à 50% de mortalité. (les valeurs d'EC₅₀ (*efficient concentration leading to inhibition of adhesion or cells development*) < valeurs de LC₅₀ (*concentration leading to 50% mortality of cells*)).

En se basant sur la limite de la fenêtre thérapeutique, nous observons que l'alginate de cuivre dépasse clairement ces limites alors que l'alginate de calcium les respecte. Finalement, l'alginate de zinc peut être considéré moins toxique que l'alginate de cuivre mais toxique malgré tout. L'importante inhibition de croissance observée peut être expliquée par les liaisons électrostatiques des ions avec les régions chargées négativement de la membrane des microorganismes. Les ions en grandes concentrations créeraient des stress qui mèneraient à des membranes cellulaires déformées et une augmentation de perméabilité [160]. De plus, les métaux lourds, en grande concentration, produisent aussi des ROS qui interagissent avec les cellules [161].

Il est plus intéressant d'étudier l'effet antimicrobien de matériaux ayant une longue durée de vie, des propriétés antiadhésives et inhibitrice de la croissance des microorganismes dans la limite de la fenêtre thérapeutique afin d'éviter la toxicité. Pour cette raison, plusieurs mélanges calcium/cuivre et calcium/zinc ont été testés par la suite en variant la concentration des deux solutions utilisées. Ayant des solutions ioniques de concentrations de 0,36, 0,1 et 0,1 mol/L pour le calcium, le cuivre et le zinc respectivement, les mélanges ont été effectués suivant des proportions volumiques. La nomenclature des matériaux élaborés ainsi que la concentration des solutions d'ions utilisées pour chacun sont regroupés dans le Tableau IV.11.

Matériaux à base d'alginate antimicrobiens dans le milieu marin

Tableau IV.11 Nomenclature des matériaux utilisés pour les tests antimicrobiens

Nomenclature	[CaCl₂]	[CuSO₄]	[Zn(O₂CCH₃)₂]
Ca_{0,08}Cu_{0,15}	0,08 mol/L	0,15 mol/L	-
Ca_{0,18}Cu_{0,1}	0,18 mol/L	0,1 mol/L	-
Ca_{0,23}Cu_{0,08}	0,23 mol/L	0,08 mol/L	-
Ca_{0,27}Cu_{0,05}	0,27 mol/L	0,05 mol/L	-
Ca_{0,32}Cu_{0,005}	0,32 mol/L	5,10 ⁻³ mol/L	-
Ca_{0,36}Cu_{0,0005}	0,36 mol/L	5,10 ⁻⁴ mol/L	-
Ca_{0,08}Zn_{0,15}	0,08 mol/L	-	0,15 mol/L
Ca_{0,18}Zn_{0,1}	0,18 mol/L	-	0,1 mol/L
Ca_{0,23}Zn_{0,08}	0,23 mol/L	-	0,08 mol/L
Ca_{0,27}Zn_{0,05}	0,27 mol/L	-	0,05 mol/L
Ca_{0,32}Zn_{0,005}	0,32 mol/L	-	5,10 ⁻³ mol/L
Ca_{0,36}Zn_{0,0005}	0,36 mol/L	-	5,10 ⁻⁴ mol/L

Ces différents matériaux ont été testés sur la souche de microalgue *Halimnobia coffeaeformis*. Les résultats sont présentés pour le cuivre sur la Figure IV.17(a) et pour le zinc (b). Les résultats obtenus sont présentés en densité optique (DO) au lieu de pourcentage d'inhibition dû à l'absence de contrôle ; en effet, les matériaux ont été comparés entre eux par rapport à la DO obtenue. La densité optique, ou absorbance, est reliée directement à la concentration de chlorophylle d'après des courbes de calibration effectuées sur de la chlorophylle d'épinard [162]. Plus cette absorbance est élevée, plus la croissance bactérienne ou microalgale est élevée et inversement.

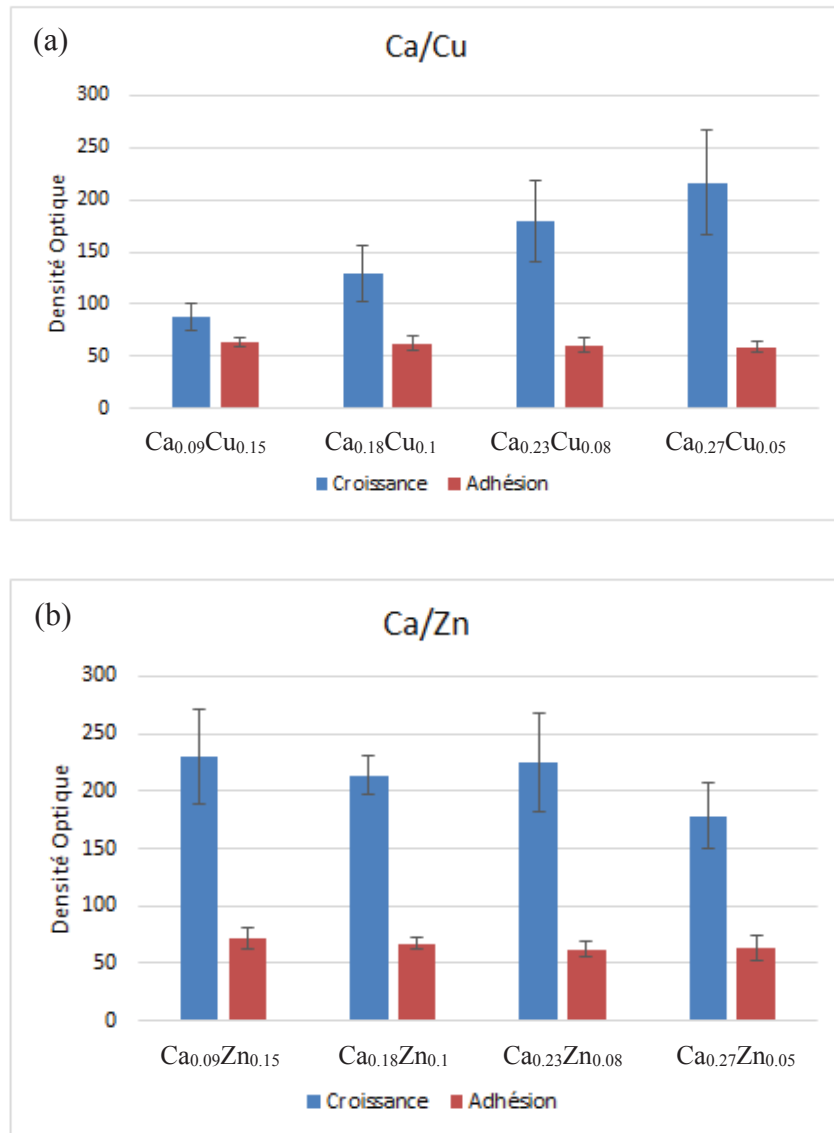


Figure IV.17 Densité optique de la souche de microalgues *Halamphora coffeaeformis* en présence de différents matériaux

La Figure IV.17(a) présente la densité optique en présence des différents mélanges calcium/cuivre. Nous observons que lorsque la concentration des ions cuivriques diminue, la croissance des microalgues *Halamphora coffeaeformis* augmente montrant par conséquent que l'inhibition de croissance diminue aussi. Nous pouvons alors supposer que l'apport d'ions de cuivre affecte l'inhibition des microalgues et joue un rôle anti-croissance effectif. Ces résultats sont en accord avec ceux de Malagurski *et al.* [77] qui admettent que le cuivre produit un stress oxydant.

Toutefois, l'adhésion de ces microalgues ne paraît pas être affectée par le changement de concentration des ions cuivrique : elle est stable.

Par contre, la variation de concentration des ions de zinc n'affecte pas clairement la croissance des microalgues comme dans le cas du cuivre (Figure IV.17(b)). En terme d'adhésion, elle reste inchangée pour les différents matériaux. Le mode d'action des ions Cu^{2+} et Zn^{2+} semble différent. Le cuivre affecte directement la croissance des microalgues contrairement au zinc. Gagneux-Moreaux *et al.* [163] en 2006 ont étudié le mode d'action de différents métaux tels que le Cd, Cu, Pb et Zn sur les microalgues. Ils ont remarqué que le cuivre affecte la croissance des microalgues alors que le zinc affecte leur métabolisme sans affecter la croissance. Ils admettent que le cuivre réduit la motilité des cellules et induit une perte de matière organique. Pour la présence de cuivre en excès (500 $\mu\text{g/L}$), la croissance est inhibée totalement et entraîne la désorganisation totale de la cellule. Par contre, le zinc peut provoquer des modifications ultra-structurales de la cellule : il entraînerait de nombreuses cassures au niveau des membranes des chloroplastes et des mitochondries dans le but d'augmenter les surfaces membranaires capables de fixer du zinc. Les résultats présentés sur la Figure IV.17 sont en accord avec ces résultats.

Comme l'hydrogel ayant la concentration la plus faible de cuivre n'affecte pas la croissance des microalgues mais leur adhésion, l'hydrogel $\text{Ca}_{0,27}\text{Cu}_{0,05}$ semble le plus avantageux. Puisque le changement de concentration de zinc semble peu jouer de rôle sur la croissance et l'adhésion des microalgues, nous choisissons le matériau comportant le moins de zinc $\text{Ca}_{0,27}\text{Zn}_{0,05}$. Des concentrations de cuivre et zinc encore plus faibles que 0,05 mol/L ont été testées dans la suite. Les pourcentages d'inhibition de croissance et d'adhésion en présence des matériaux $\text{Ca}_{0,27}\text{Cu}_{0,05}$, $\text{Ca}_{0,32}\text{Cu}_{0,005}$, $\text{Ca}_{0,36}\text{Cu}_{0,0005}$, $\text{Ca}_{0,27}\text{Zn}_{0,05}$, $\text{Ca}_{0,32}\text{Zn}_{0,005}$ et $\text{Ca}_{0,36}\text{Zn}_{0,0005}$ sont présentés Figure IV.18.

En présence d'une ligne de contrôle sur la plaque contenant les matériaux et la solution de microalgues, nous pouvons présenter Figure IV.18 les résultats obtenus sous forme de pourcentages d'inhibition calculés suivant l'équation (IV.3).

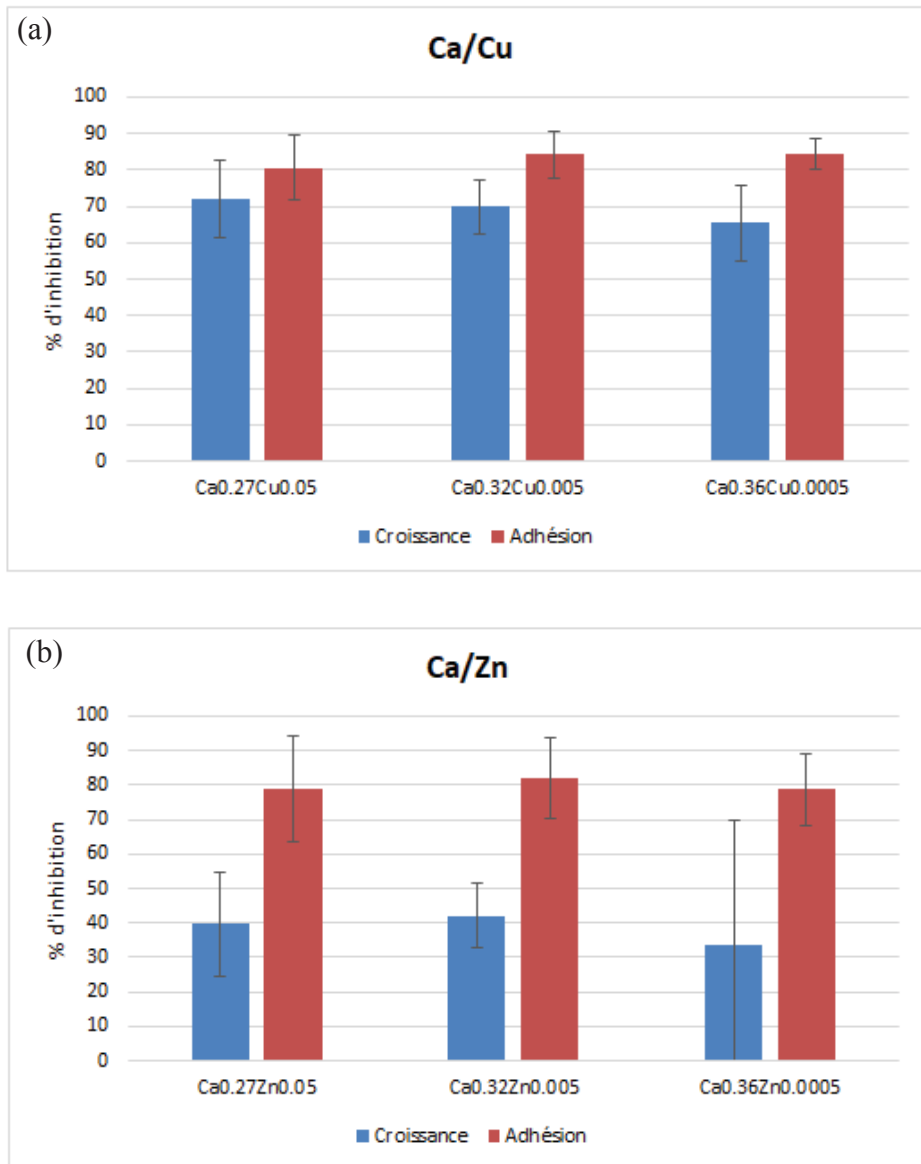


Figure IV.18 Pourcentage d'inhibition de croissance et d'adhésion en présence des matériaux Ca_{0.27}Cu_{0.05}, Ca_{0.32}Cu_{0.005}, Ca_{0.36}Cu_{0.0005}, Ca_{0.27}Zn_{0.05}, Ca_{0.32}Zn_{0.005} et Ca_{0.36}Zn_{0.0005} pour la souche de microalgues *Halamphora coffeaeformis*

La Figure IV.18(a), présente les résultats pour les hydrogels Ca_xCu_y alors que la Figure IV.18(b), présente les résultats pour les hydrogels Ca_xZn_y. Nous constatons que les pourcentages d'inhibition de croissance pour les séries d'hydrogels de cuivre et de zinc sont faiblement affectés par la diminution de la concentration en ions. Pour les hydrogels de cuivre, elle est de l'ordre de 67% alors qu'elle est de 37% avec les alginates de zinc. L'inhibition d'adhésion aux puits quant à elle reste forte (80%) pour tous les matériaux. D'après ces résultats, nous pouvons

conclure que pour des concentrations inférieures à 5.10^{-2} mol/L en ions de Cu^{2+} et Zn^{2+} , l'inhibition de croissance et d'adhésion des microalgues ne présente pas de différences significatives. De même, il est possible de supposer que les hydrogels Ca/Zn sont des matériaux antiadhésifs ne limitant pas la croissance contrairement aux hydrogels Ca/Cu qui eux inhibent la croissance affectant faiblement l'adhésion des microalgues.

Les résultats obtenus sur *Halamphora coffeaeformis* permettent de conclure que les matériaux calcium/cuivre restent toujours hors de la limite de la fenêtre thérapeutique même pour des concentrations très faibles de cuivre. Alors que pour des concentrations de zinc de 0,05 mol/L et moins, ces matériaux respectent la limite de la fenêtre thérapeutique. Les résultats obtenus sont très encourageants mais il est nécessaire d'effectuer des tests supplémentaires sur une autre souche de microalgues dans le but de voir un éventuel effet sur un biofilm.

Nous avons testé alors nos matériaux sur la souche de microalgues *Cylindrotheca closterium*. Cette souche a été choisie puisqu'elle est connue aussi pour son adhésion à différents supports immergés dans l'eau de mer. De même, cette espèce de microalgues est dominante dans le processus de déclenchement de la formation de biofilm [164]. Les résultats de ces tests sont présentés dans la figure ci-dessous : les différents matériaux calcium/cuivre sont présents dans la Figure IV.19(a) alors que les matériaux calcium/zinc sont présents dans la Figure IV.19(b).

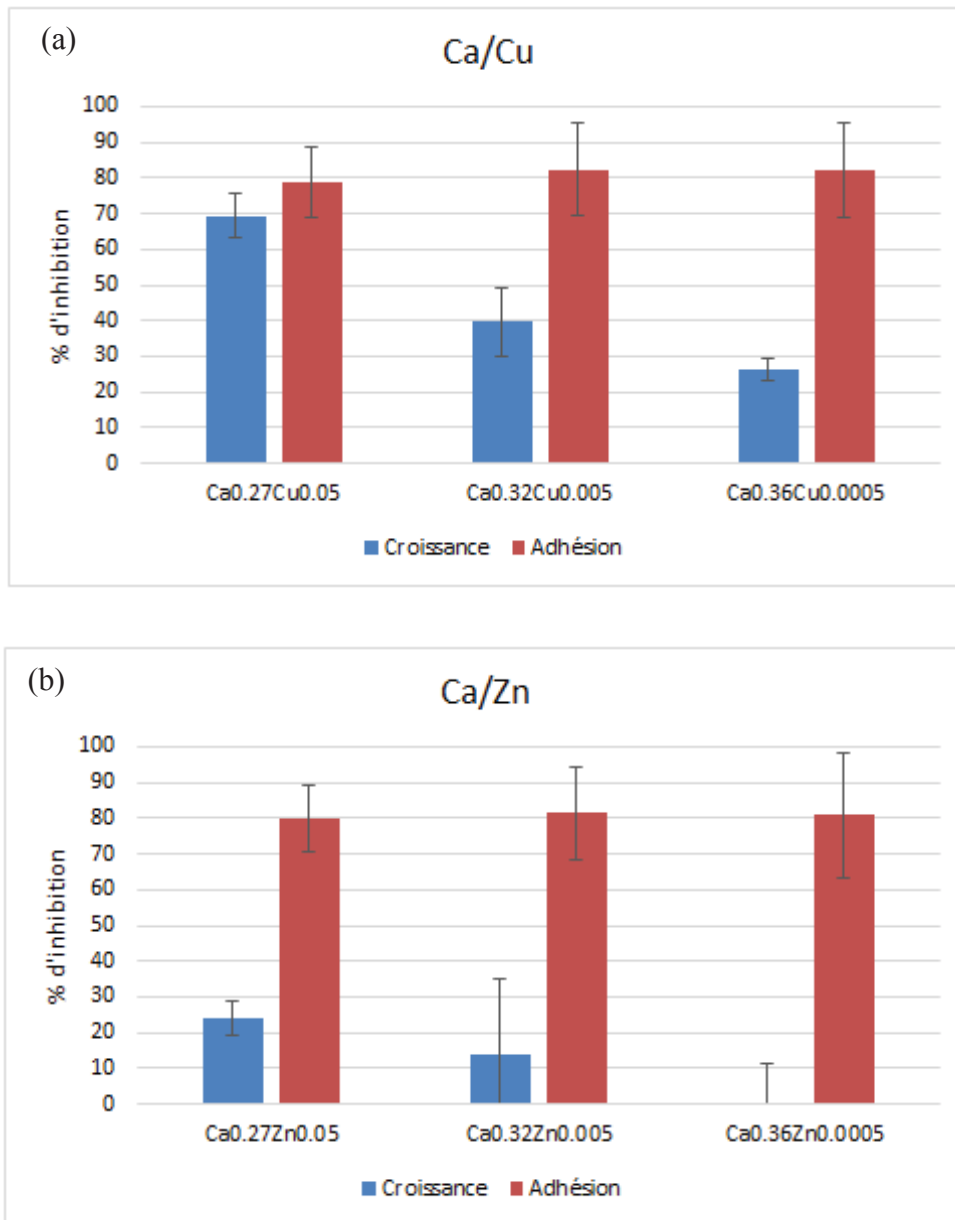


Figure IV.19 Pourcentage d'inhibition de croissance et d'adhésion en présence des matériaux $Ca_{0,27}Cu_{0,05}$, $Ca_{0,32}Cu_{0,005}$, $Ca_{0,36}Cu_{0,0005}$, $Ca_{0,27}Zn_{0,05}$, $Ca_{0,32}Zn_{0,005}$ et $Ca_{0,36}Zn_{0,0005}$ pour la souche de microalgues *Cylindrotheca closterium*

Pour cette deuxième souche de microalgues, nous remarquons que l'inhibition d'adhésion est indépendante de la concentration de cuivre ou de zinc (à 80%). Par contre, en diminuant la concentration de cuivre, le pourcentage d'inhibition de croissance diminue de 70% ($Ca_{0,27}Cu_{0,05}$) jusqu'à 25% ($Ca_{0,36}Cu_{0,0005}$). Alors que le pourcentage d'inhibition de croissance décroît avec la concentration de 22% pour $Ca_{0,27}Zn_{0,05}$ et devient quasiment nul pour $Ca_{0,36}Zn_{0,0005}$. A l'issue de

ces derniers tests présentés dans la Figure IV.19, nous pouvons conclure que l'inhibition de croissance pour cette souche de microalgue est affectée par la diminution de concentration pour les deux matériaux à base de cuivre ou de zinc. Par contre, l'inhibition d'adhésion aux puits reste importante et n'est pas affectée par la variation de concentration en ions. Les résultats obtenus pour la *Cylindrotheca closterium* permettent de conclure que de grandes concentrations en calcium permettent d'obtenir des résultats intéressants et positifs.

D'après les résultats présentés dans cette partie, nous avons élaboré des matériaux présentant des propriétés différentes suivant les microalgues. De plus, les résultats obtenus sur les deux souches de microalgues permettent de conclure que les hydrogels Ca/Zn sont des matériaux anti-adhésifs efficaces et affectant peu la croissance contrairement aux hydrogels Ca/Cu.

En ce qui concerne les alginates à base de cuivre, les formulations testées ne respectent pas la limite de la fenêtre thérapeutique pour *H.coffeaeformis* mais la respecte dans le cas de *C.closterium* à 5.10^{-3} et 5.10^{-4} mol/L. Par contre, pour l'alginate à base de zinc, les trois concentrations ioniques testées sont acceptables pour les deux souches de microalgues. Pour les deux souches, une relation évidente est observée entre la concentration ionique et l'inhibition de croissance/toxicité ; cependant, ceci n'est pas observé pour l'inhibition d'adhésion qui est toujours très élevée. Nous observons que la fenêtre thérapeutique diffère suivant la souche microalgale testée (dû à la variation de la sensibilité de chaque souche). Puisque chaque espèce a une sensibilité différente contre les métaux, il est possible éventuellement de cibler une microalgue par un dosage spécifique des métaux.

La toxicité de ces matériaux a été évaluée par rapport aux microalgues ; la formation du biofilm débutant par l'adhésion des bactéries, il est essentiel de tester ces différents hydrogels sur plusieurs souches de bactéries marines afin de vérifier que nos matériaux pourront être appliqués en milieu marin. Dans la partie qui suit, nous présentons les tests antibactériens effectués sur 4 souches de bactéries marines.

3.1.2. Bactéries marines

Le protocole expérimental utilisé pour déterminer le pourcentage d'inhibition de croissance et d'adhésion des bactéries a été présenté dans le chapitre 2 paragraphe 2.3. Les 4 souches de bactéries marines sont : *Halomonas aquamarina*, *Vibrio aesturianus*, *Vibrio harveyi* et *Pseudoalteromonas elyakovii*. Ces quatre souches de bactéries marines sont différentes au niveau physiologique et chacune d'elle affecte l'environnement marin de façon différente.

Initialement, les hydrogels $\text{Ca}_{0,36}$, $\text{Ca}_{0,27}\text{Cu}_{0,05}$ et $\text{Ca}_{0,27}\text{Zn}_{0,05}$ ont été testés pour les 4 souches de bactéries marines. Le $\text{Ca}_{0,36}$ et le $\text{Ca}_{0,27}\text{Zn}_{0,05}$ ont été choisis par rapport à leur efficacité sur les microalgues et puis comparé avec le $\text{Ca}_{0,27}\text{Cu}_{0,05}$. Les résultats de ces tests antibactériens sont présentés dans la Figure IV.20.

D'après la Figure IV.20, nous observons comme prévu un comportement différent pour le $\text{Ca}_{0,36}$ par rapport aux deux autres matériaux ; les pourcentages d'inhibition de croissance et d'adhésion sont très faibles et ne dépassent pas les 20% pour les 4 souches de bactéries. Ces valeurs peuvent être considérées négligeables. Nous considérons alors que l'alginate à base de calcium n'affecte ni la croissance ni l'adhésion des bactéries.

Matériaux à base d'alginate antimicrobiens dans le milieu marin

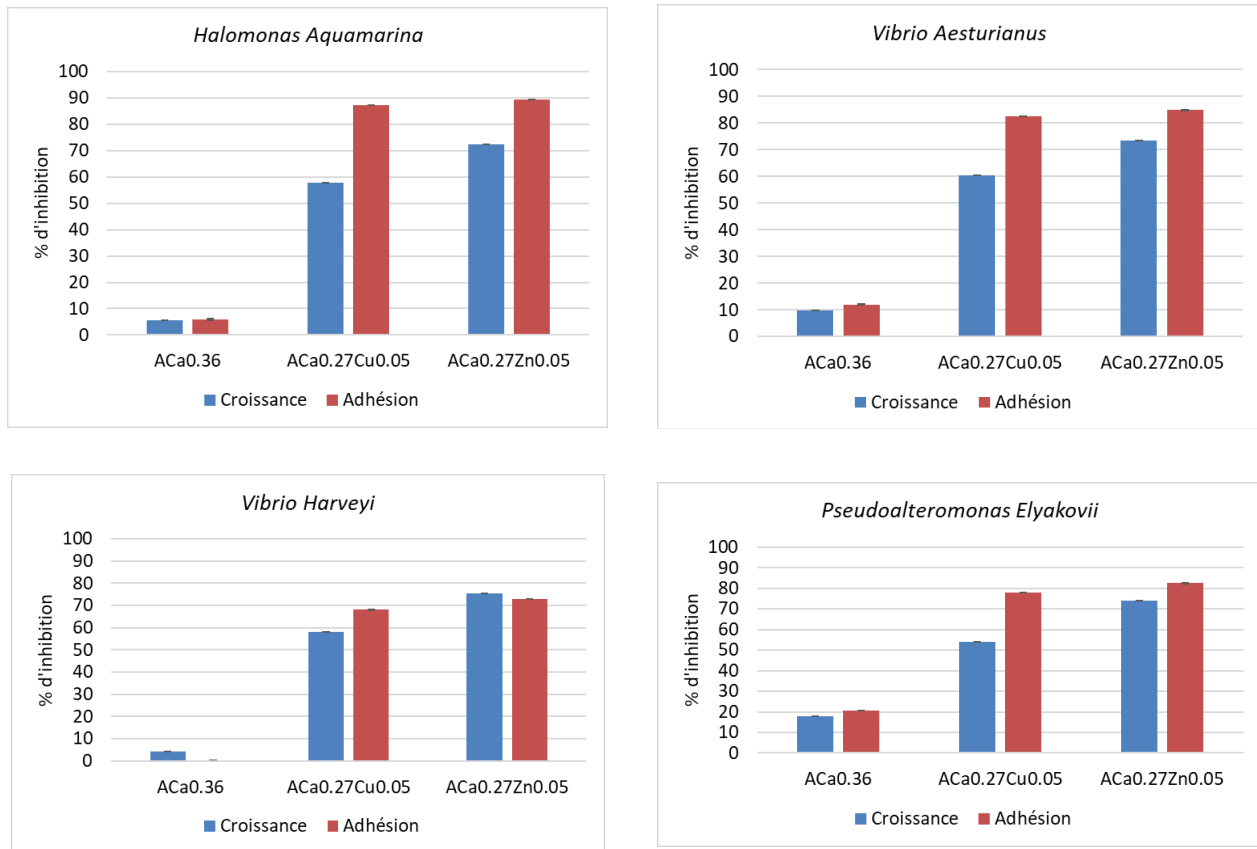


Figure IV.20 Pourcentages d'inhibition de croissance (bleu) et d'adhésion (rouge) contre les 4 souches de bactéries *Halomonas aquamarina* (HA), *Vibrio aesturianus* (VA), *Vibrio harveyi* (VH) et *Pseudoalteromonas elyakovii* (PE)

L'hydrogel $\text{Ca}_{0,27}\text{Cu}_{0,05}$ présente un pourcentage d'inhibition de croissance d'environ 60% et un pourcentage d'inhibition d'adhésion entre 70 et 80% pour les 4 souches de bactéries. Alors que l'hydrogel $\text{Ca}_{0,27}\text{Zn}_{0,05}$ a un pourcentage d'inhibition de croissance voisin des 70% et un pourcentage d'inhibition d'adhésion entre 70 et 90%. Le pourcentage d'inhibition d'adhésion maximum est obtenu pour la souche de bactérie *Halomonas aquamarina*. Nos résultats montrent que les hydrogels de cuivre et de zinc présentent un comportement similaire pour les 4 souches de bactéries. L'inhibition d'adhésion est supérieure à l'inhibition de croissance dans les 4 cas ce qui est en cohérence avec les résultats obtenus pour les microalgues.

Nous présentons dans la suite les résultats antibactériens en présence d'hydrogels de concentration ionique plus faible que ceux testés précédemment dans le but d'évaluer l'effet de concentration des ions et de réduire l'inhibition de croissance afin que les matériaux respectent les limites de la fenêtre thérapeutique.

Matériaux à base d'alginate antimicrobiens dans le milieu marin

La différence observée pour les pourcentages d'inhibition en présence des matériaux de concentration ionique de 0,05 mol/L entre la Figure IV.20 et les Figures IV.21 et IV.22 est due au fait que la première expérience est effectuée au mois de Mars alors que la suivante au mois de Septembre. Cette différence peut être alors attribuée à un changement de température.

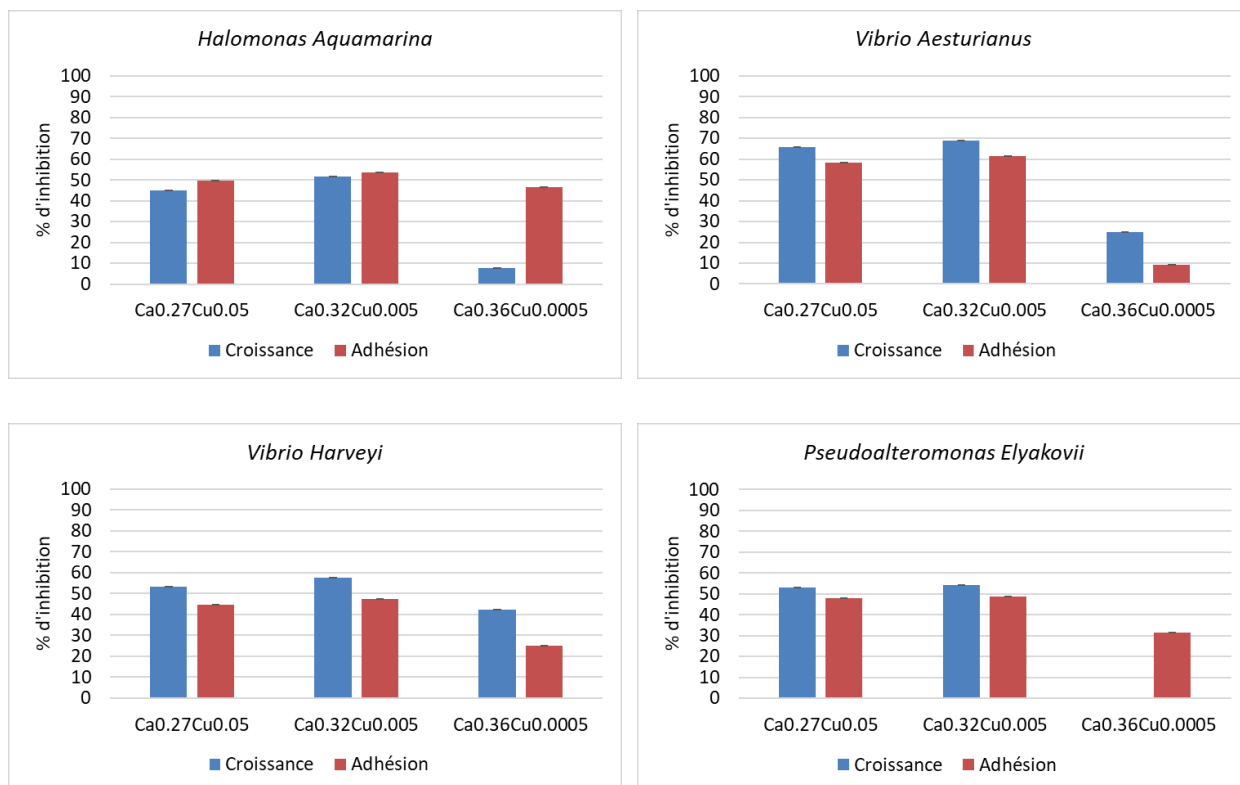


Figure IV.21 Pourcentages d'inhibition de croissance (bleu) et d'adhésion (rouge) pour les 4 souches de bactéries marines *Halomonas aquamarina*, *Vibrio aesturianus*, *Vibrio haveyi* et *Pseudoalteromonas elyakovii* en présence des matériaux à base de cuivre

Nous comparons sur la Figure IV.21, les matériaux de différentes concentrations d'ions cuivriques allant de $5 \cdot 10^{-2}$ à $5 \cdot 10^{-4}$ mol/L pour les quatre souches de bactéries. Concernant les bactéries *Halomonas aquamarina* et *Pseudoalteromonas elyakovii*, nous observons pour des concentrations d'ions cuivriques de 0,05 et 0,005 mol/L que les pourcentages d'inhibition de croissance et d'adhésion sont proches de 50%. Les résultats obtenus pour la souche de bactéries *Vibrio aesturianus* présentent des pourcentages d'inhibition de croissance et d'adhésion faiblement supérieurs aux ceux des deux souches précédentes d'environ 60%. La souche de bactéries *Vibrio*

Matériaux à base d'alginate antimicrobiens dans le milieu marin

harveyi présente un comportement totalement différent des trois autres bactéries pour lequel le pourcentage d'inhibition de croissance est de 50% alors que l'inhibition d'adhésion est presque nulle.

Pour le matériau $\text{Ca}_{0,36}\text{Cu}_{0,0005}$, les résultats sont différents. Dans le cas de la souche *Halomonas aquamarina*, nous observons un pourcentage d'inhibition de croissance inférieur à 10% et d'adhésion d'à peu près 50%. Alors que pour *Vibrio aesturianus*, le pourcentage d'inhibition de croissance est voisin de 30% et celui d'adhésion égale à 10%. Par contre, le matériau $\text{Ca}_{0,36}\text{Cu}_{0,0005}$ inhibe la croissance des bactéries *Vibrio harveyi* de 40% sans affecter leur adhésion contrairement au cas de la *Pseudoalteromonas elyakovii* où l'inhibition de croissance est nulle alors que l'inhibition d'adhésion atteint les 30%.

Ces différents résultats, montrent que le matériau $\text{Ca}_{0,36}\text{Cu}_{0,0005}$ est plus efficace sur les microalgues que sur les bactéries. Ce matériau inhibe fortement l'adhésion des microalgues mais n'affecte pas vraiment celle des bactéries. Alors que $\text{Ca}_{0,27}\text{Cu}_{0,05}$ et $\text{Ca}_{0,32}\text{Cu}_{0,005}$ sont efficaces similairement sur les microalgues ainsi que sur les bactéries. Par conséquent, le but est d'empêcher l'adhésion des microalgues, le matériau approprié pour cette application serait le $\text{Ca}_{0,36}\text{Cu}_{0,0005}$. Par contre, dans notre étude, l'objectif étant de lutter contre la formation de biofilms, il est alors important d'inhiber l'adhésion des bactéries et des microalgues. Il est alors judicieux d'utiliser le $\text{Ca}_{0,27}\text{Cu}_{0,05}$ ou même le $\text{Ca}_{0,32}\text{Cu}_{0,005}$.

Nous comparons dans la suite pour ces mêmes souches de bactéries marines, les résultats obtenus en présence des matériaux $\text{Ca}_{0,27}\text{Zn}_{0,05}$, $\text{Ca}_{0,32}\text{Zn}_{0,005}$ et $\text{Ca}_{0,36}\text{Zn}_{0,0005}$ (Figure IV.22).

Matériaux à base d'alginate antimicrobiens dans le milieu marin

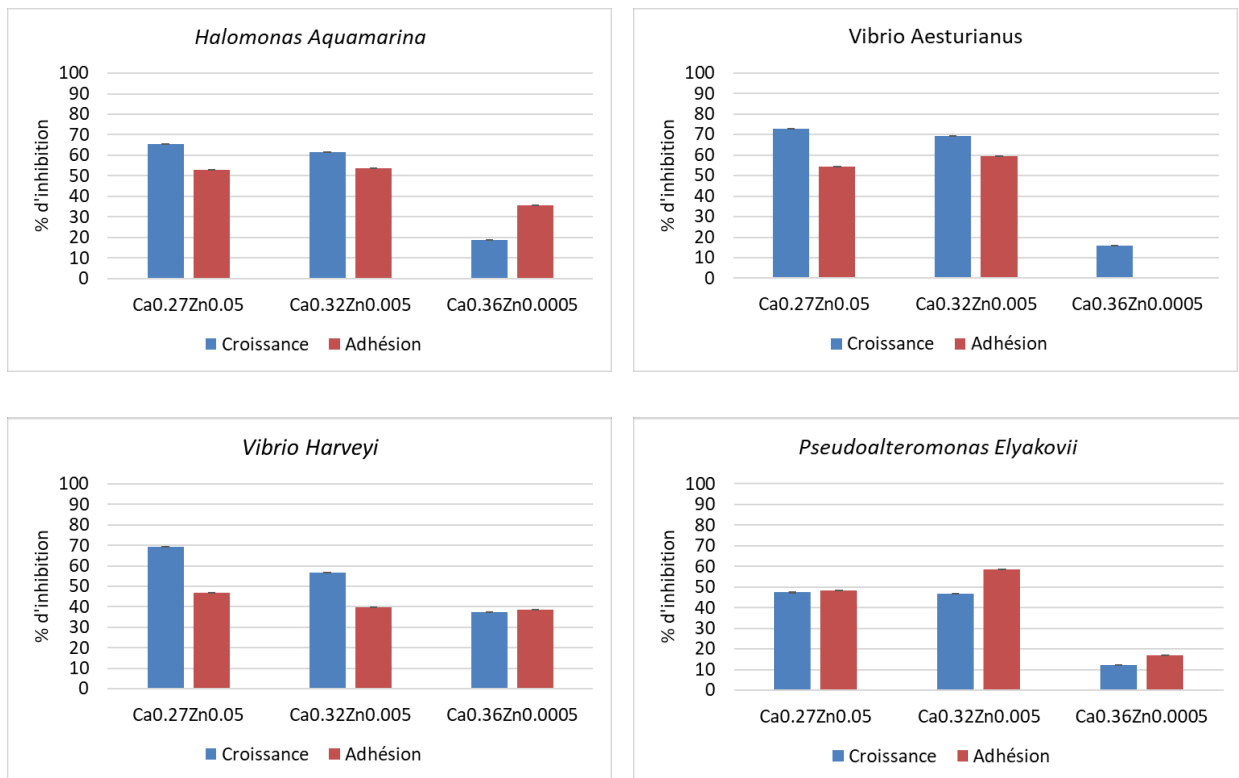


Figure IV.22 Pourcentages d'inhibition de croissance (bleu) et d'adhésion (rouge) pour les 4 souches de bactéries marines *Halomonas aquamarina*, *Vibrio aesturianus*, *Vibrio harveyi* et *Pseudoalteromonas elyakovii* en présence de matériaux à base de zinc

D'après les graphes ci-dessus (Figure IV.22), nous n'observons pas de modifications drastiques lors de la diminution des concentrations des ions de zinc de 0,05 à 0,005 mol/L au niveau des pourcentages d'inhibition de croissance et d'adhésion dans le cas des 4 souches de bactéries. Dans le cas de *Halomonas aquamarina* et *Vibrio aesturianus*, les pourcentages d'inhibition de croissance dépassent d'environ 10% ceux de l'adhésion. Pour la *Vibrio harveyi*, la croissance est inhibée de 20% de plus que l'adhésion. Alors que dans le cas de *Pseudoalteromonas elyakovii*, les pourcentages d'inhibition de croissance et d'adhésion sont égaux en présence de Ca_{0,27}Zn_{0,05} alors que le pourcentage d'inhibition d'adhésion dépasse de 10% celui de la croissance.

Par contre, en présence des matériaux Ca_{0,36}Zn_{0,0005}, chaque souche de bactéries présente un comportement différent. Dans le cas de la souche *Halomonas aquamarina*, le taux d'inhibition d'adhésion est deux fois celui de croissance de 40 et 20% respectivement. La *Vibrio aesturianus* et la *Pseudoalteromonas elyakovii* ne sont pratiquement pas affectées par ce matériau. Finalement,

dans le cas de la souche de bactérie marine *Vibrio harveyi*, la croissance et l'adhésion est inhibée identiquement d'environ 40%.

Nous trouvons alors d'après les différents résultats antibactériens présentés, une sensibilité différente entre les quatre souches de bactéries et les matériaux utilisés. Cette sensibilité est due à la physiologie et à la structure différente de chaque bactérie puisque nous utilisons des matériaux antibactériens non toxiques pour l'environnement contrairement à l'eau de Javel par exemple. De plus, les hydrogels $\text{Ca}_{0,36}\text{Cu}_{0,0005}$ et $\text{Ca}_{0,36}\text{Zn}_{0,0005}$ présentent des pourcentages d'inhibition de croissance et d'adhésion importants pour les deux souches de microalgues mais de faibles pourcentages d'inhibition de croissance et d'adhésion non significatifs pour les souches de bactéries marines.

En regroupant les différents tests anti-microbiens déjà effectués, nous en déduisons qu'il est préférable de retenir les hydrogels $\text{Ca}_{0,27}\text{Cu}_{0,05}$ et $\text{Ca}_{0,27}\text{Zn}_{0,05}$ efficaces sur les deux souches de microalgues et les quatre souches de bactéries marines et ayant les meilleures propriétés anti-adhésives.

Les résultats antimicrobiens présentés dans ce paragraphe sont prometteurs et permettent de conclure qu'avec les différents matériaux testés, il est possible d'ajuster la bioactivité en fonction de la sensibilité de la souche. Ceci est un facteur clé puisque les bactéries et microalgues diffèrent suivant les régions : il sera donc possible de concevoir des protections de surfaces spécifiques qui dépendent du milieu d'application.

3.2. Films déposés sur acier

3.2.1. Microalgues

Des films déposés sur acier par électrophorèse ont été testés sur les souches de microalgues *Halamphora coffeaeformis* et *Cylindrotheca closterium* par le même protocole expérimental utilisé précédemment. Le contrôle utilisé dans ces expériences est formé de la plaque d'acier non revêtu afin d'étudier l'effet antimicrobiens des dépôts sur acier par rapport à un acier non revêtu. Nous testons des films d'alginate de calcium $\text{Ca}_{0,36}$, de calcium/cuivre $\text{Ca}_{0,27}\text{Cu}_{0,1}$ et de calcium/zinc $\text{Ca}_{0,27}\text{Zn}_{0,1}$ revêtant de l'inox 316 L sur *Halamphora coffeaeformis* en premier (Figure IV.23).

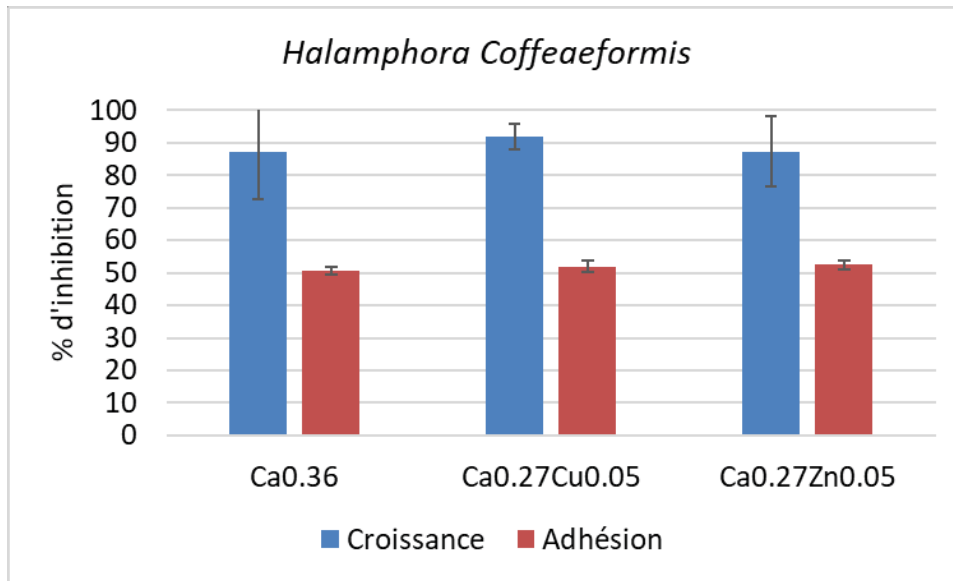


Figure IV.23 Pourcentage d'inhibition de croissance et d'adhésion de la souche de microalgues *Halamphora coffeaeformis* pour les dépôts sur acier de $Ca_{0,36}$, $Ca_{0,27}Cu_{0,05}$ et $Ca_{0,27}Zn_{0,05}$

Nous observons d'après la Figure IV.23, que les dépôts d'alginate de calcium présentent un pourcentage d'inhibition de croissance supérieur à 90% et un pourcentage d'inhibition d'adhésion de 50% pour cette souche de microalgues. Les résultats des dépôts d'alginate de calcium/cuivre et calcium/zinc montrent que ces matériaux inhibent la croissance et l'adhésion de *H.coffeaeformis* avec un pourcentage d'inhibition voisin des 90% pour la croissance et de 50% pour l'adhésion aux puits.

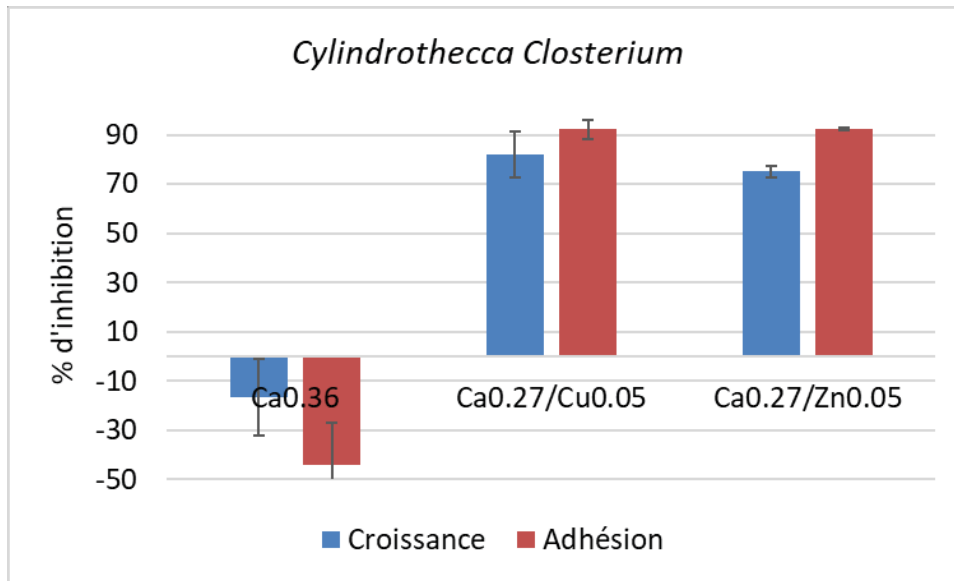


Figure IV.24 Pourcentage d'inhibition de croissance et d'adhésion de la souche de microalgues *Cylindrotheca closterium* pour les dépôts sur acier de $Ca_{0,36}$, $Ca_{0,27}Cu_{0,05}$ et $Ca_{0,27}Zn_{0,05}$

La Figure IV.24, montre que les dépôts d'alginate de calcium présentent un pourcentage d'inhibition de croissance de -10% et d'adhésion aux alentours de -50%. Des pourcentages d'inhibition de croissance et d'adhésion négatifs sont attribués à des valeurs de DO supérieures à celles du contrôle. Ceci veut dire que les films à base de calcium déposés sur acier améliorent la croissance et l'adhésion de la microalgue *C. closterium*. Nous considérons alors que le dépôt de calcium affecte différemment les deux souches de microalgues en inhibant la croissance et l'adhésion de l'une et encourageant la croissance et l'adhésion de l'autre. En comparant les films déposés sur acier et les hydrogels à base de calcium nous pouvons en conclure que l'utilisation de calcium dans le matériau a un effet inhibiteur sur certaines souches de microalgues et un effet stimulateur sur d'autres. Le but étant de lutter contre la formation de biofilms, nous nous intéressons alors aux matériaux $Ca_{0,27}Cu_{0,05}$ et $Ca_{0,27}Zn_{0,05}$ qui inhibent la croissance d'à peu près 80% et l'adhésion aux puits de 90%.

D'après ces résultats, nous pouvons en conclure que les revêtements de calcium/cuivre et calcium/zinc affectent la croissance et l'adhésion aux puits des deux souches de microalgues *H.coffeaeformis* et *C.closterium* responsables de la formation des biofilms. Ces matériaux présentent des taux d'inhibition de croissance et d'adhésion plus importants que ceux des

hydrogels. Ils respectent la limite de la fenêtre thérapeutique pour *H.coffeaeformis* mais la dépassent dans le cas de *C.closterium* et sont considérés toxiques pour cette dernière.

Après avoir évalué la toxicité de ces matériaux par rapport aux microalgues, nous nous penchons à étudier l'effet de ces matériaux sur la croissance et l'adhésion des quatre souches de bactéries marines précédemment testées.

3.2.2. Bactéries marines

Les résultats antibactériens des films d'alginate de calcium, calcium/cuivre et calcium/zinc déposés sur acier contre les quatre souches de bactéries marines sont présentés dans la Figure IV.25. Nous observons que les films de calcium déposés sur acier présentent des pourcentages d'inhibition de croissance et d'adhésion aux puits faibles pour les quatre souches de bactéries. L'effet de ces films déposés sur acier à base de calcium est semblable aux hydrogels à base de calcium. Nous en concluons alors que la croissance et l'adhésion des bactéries n'est pas affectée par les matériaux à base de calcium qu'ils soient sous forme d'hydrogels ou de films protégeant l'acier.

Matériaux à base d'alginate antimicrobiens dans le milieu marin

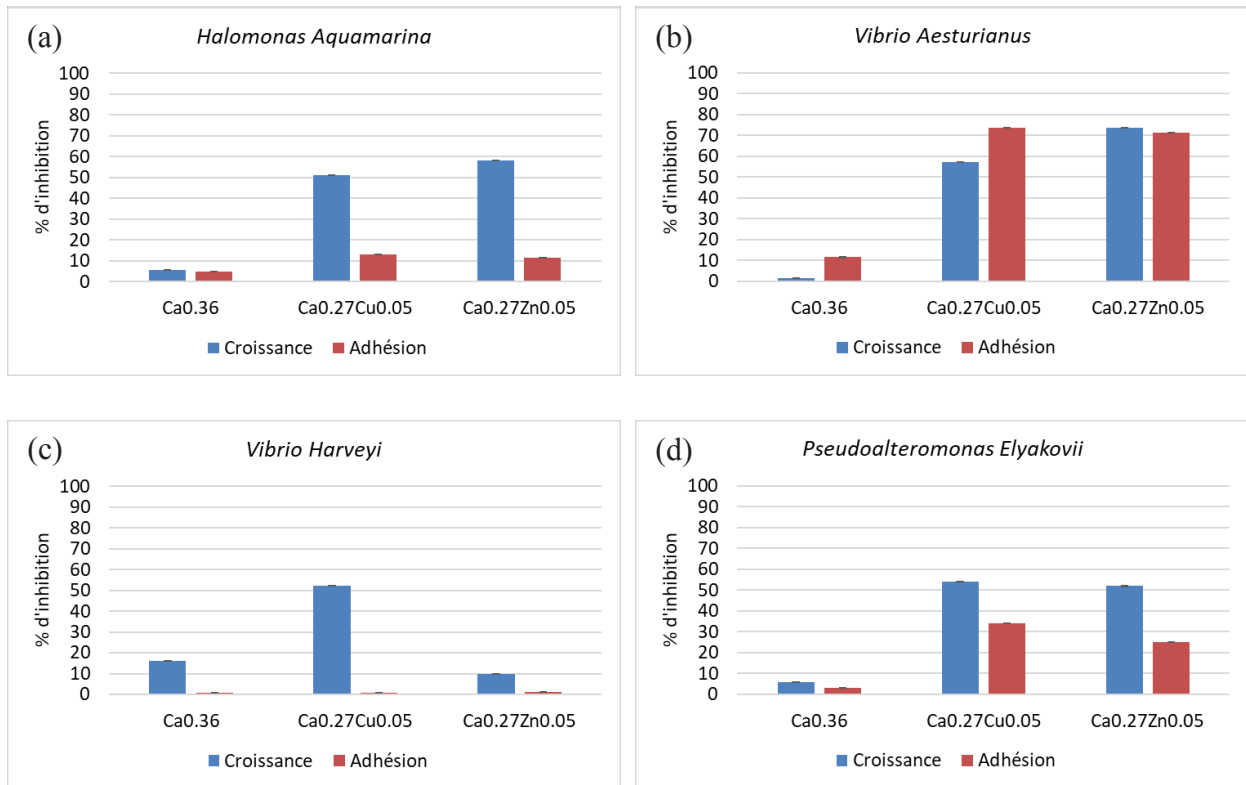


Figure IV.25 Evaluation de la croissance et de l'adhésion de 4 souches de bactéries marines *Halomonas aquamarina*, *Vibrio aesturianus*, *Vibrio harveyi* et *Pseudoalteromonas elyakovii* en présence des films déposés sur acier $Ca_{0,36}$, $Ca_{0,27}Cu_{0,05}$ et $Ca_{0,27}Zn_{0,05}$

Les films déposés de calcium/cuivre conduisent à une inhibition de croissance de 50% dans le cas de *Halomonas aquamarina* et *Vibrio harveyi* alors que l'inhibition d'adhésion est négligeable pour ces deux souches bactériennes. La souche de bactérie *Vibrio aesturianus* présente une inhibition de croissance de 60% et d'adhésion de 70%. Par contre, la souche de bactérie *Pseudoalteromonas elyakovii* présente une inhibition de croissance supérieure à celle d'adhésion de 55% et 35% respectivement.

Les films déposés à base de calcium/zinc affectent d'une façon différente la croissance et l'adhésion de chaque souche bactérienne. Nous observons un pourcentage d'inhibition de croissance de 60% et d'adhésion négligeable pour *Halomonas aquamarina*. La souche de bactérie *Vibrio aesturianus* présente une inhibition de croissance et d'adhésion importante de 70%. Par contre, la croissance et l'adhésion de la souche *Vibrio harveyi* ne sont pas affectées par la présence

des films revêtant l'acier à base de zinc. Finalement, un pourcentage d'inhibition de croissance de 50% est observé dans le cas de *Pseudoalteromonas elyakovii* et une inhibition d'adhésion de 25%.

Ces différents résultats confirment la sensibilité différente de chaque souche bactérienne aux ions présents dans chaque matériau testé. Les résultats antimicrobiens de tous les matériaux testés dans ce chapitre confirment la possibilité de concevoir une protection de surface innovante et écologique.

4. Application en système ouvert

Ces différents tests antimicrobiens ont été effectués en laboratoire sous des conditions expérimentales proches des conditions de l'environnement marin. Mais il est nécessaire de tester les hydrogels dans un système ouvert afin de les étudier en présence d'eau de mer naturelle contenant les différents nutriments, ions, bactéries, microalgues et macroalgues.

4.1. Etude du potentiel d'abandon

Cette expérience a été effectuée au mois de Décembre. Le montage expérimental utilisé dans cette partie a été mis au point à l'Institut de Corrosion et expliqué dans le chapitre 2. Le but de cette expérience est d'observer la formation du biofilm sur une électrode en acier (Inox 2205) par la méthode d'Open Circuit Potential (OCP).

L'eau de mer naturelle utilisée dans cette expérience est pompée en rade de Brest et filtrée pour éviter la présence de sable dans les bacs. La Figure IV.26 présentent les cubes d'hydrogels utilisés.



Figure IV.26 Cubes d'hydrogel $Zn_{0,1}$ et $Cu_{0,1}$ utilisés lors de la première expérience

Une première expérience utilisant des cubes d'hydrogel de cuivre $Cu_{0,1}$ et des cubes d'hydrogel de zinc $Zn_{0,1}$ a été effectuée. Le cuivre relargué des alginates a interagit avec l'acier inoxydable et a entraîné sa corrosion. Nous avons alors décidé d'effectuer une deuxième expérience en comparant l'effet des cubes d'hydrogels $Zn_{0,1}$ et $Ca_{0,27}Zn_{0,05}$.

Nous observons sur le graphe présenté sur la Figure IV.27 trois courbes lissées et distinctes : la courbe en rose présente la différence de potentiel en fonction du temps pour les électrodes présentes dans le bac témoin ne contenant aucun matériau, la courbe en bleu représente la différence de potentiel pour les électrodes présentes dans le bac contenant 4 cubes d'hydrogel $Zn_{0,1}$ et finalement la courbe en noire correspond à la différence de potentiel des électrodes présentes dans le bac contenant 4 cubes d'hydrogel $Ca_{0,27}Zn_{0,05}$. Les différents cubes d'hydrogel utilisés dans cette expérience sont d'à peu près 1 cm^3 . La différence de potentiel dans le bac témoin augmente intensivement les 6 premiers jours et continue à augmenter faiblement en fonction du temps et atteint son maximum de 0,3V au bout de 10 jours. Nous observons un anoblissement de l'acier inoxydable dans le bac témoin. Dans le bac contenant les cubes d'hydrogels $Zn_{0,1}$, la différence de potentiel atteint 0,3 V (courbe bleue) au bout de 14 jours. L'allure de la courbe bleue est similaire à celle de la courbe rose mais décalée dans le temps. Enfin, la courbe noire, augmente faiblement

le long des 30 jours sans atteindre le niveau des deux autres. La valeur 0,3V atteinte par les courbes rose et bleu est caractéristique de la *montée* du biofilm [53,167,168]. Elle montre que l'électrode d'Inox a été recouverte par un biofilm dans le cas du bac témoin et celui contenant les cubes d'hydrogel de zinc.

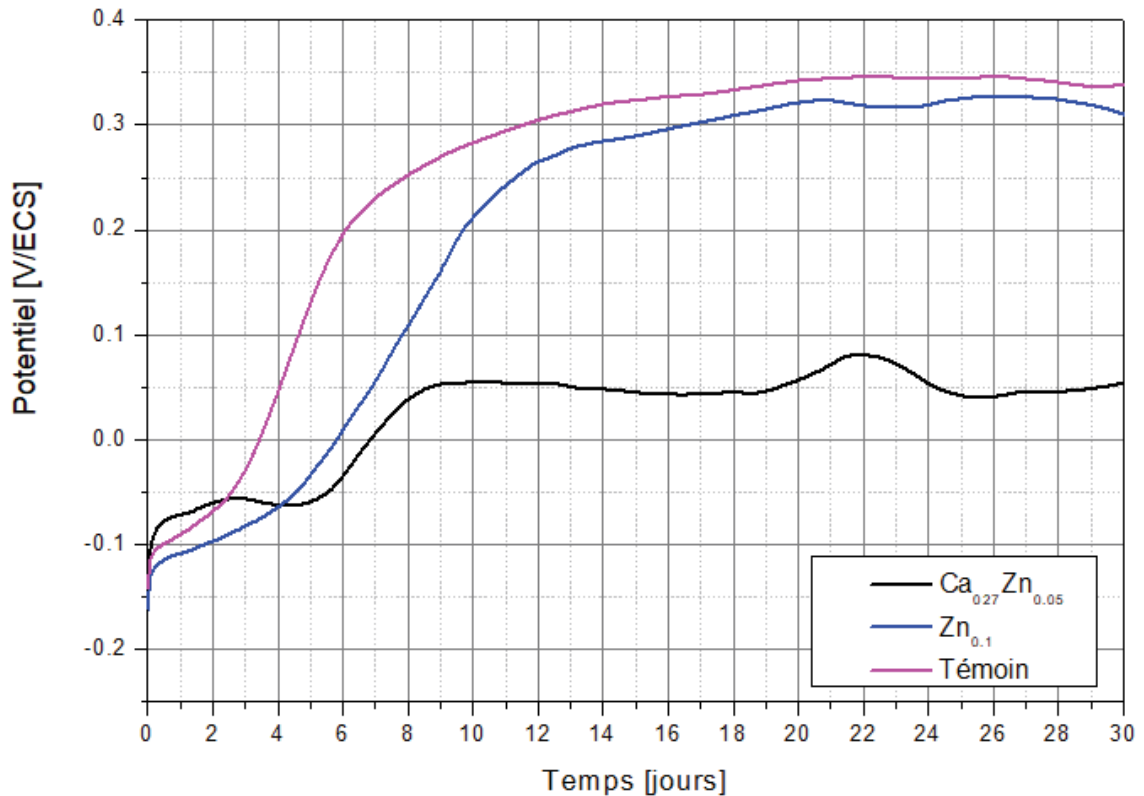


Figure IV.27 Différence de potentiel en fonction du temps pendant 30 jours comparant le bac de référence, le bac contenant le matériau Zn_{0,1} et celui contenant le Ca_{0,27}Zn_{0,05}

Les mécanismes d'anoblissement sont complexes et peuvent être regroupés en trois catégories : la thermodynamique, la cinétique et l'altération de la nature de la réaction de réduction elle-même. Les arguments de la thermodynamique suggèrent que le pH diminue à l'interface métal/biofilm ou la pression partielle de l'oxygène augmente localement ce qui augmente le potentiel réversible de l'électrode d'oxygène [167]. De même, la nature de la couche passive de l'acier inoxydable peut jouer un rôle sur l'anoblissement en altérant la vitesse de réduction de l'oxygène [49]. Des différences au niveau des propriétés semi-conductrice de la couche passive

peuvent aussi affecter la susceptibilité de l'alliage à l'anoblissement [168]. Il est aussi possible qu'une réduction de pH à la surface et qu'une production de H₂O₂ à de faibles concentrations d'oxygène soient des facteurs contributifs pour l'anoblissement.

Par exemple, Dickinson *et al.* en 1996 [169] ont observé une augmentation du potentiel d'abandon de +350 mV pour l'acier inoxydable 316L. Ce comportement est semblable à celui d'un acier partiellement recouvert d'un dépôt de MnO₂. Le potentiel obtenu lors de l'anoblissement est en accord total avec le potentiel de réduction d'un électron pour la conversion de MnO₂ en MnOOH [169]. Ces auteurs attribuent alors l'origine des dépôts riches en Mn à des bactéries qui oxydant du Mn qui ont colonisé la surface : biofouling par oxyde de manganèse.

4.2. Etude des matériaux récupérés par microscopie

Les hydrogels ainsi que les électrodes utilisés dans l'expérience précédente ont été récupérés après les 30 jours d'immersion. Les électrodes ont été étudiés en SEM dans le but de vérifier la présence de biofilms, alors que les hydrogels ont été récupérés dans le but d'étudier leur dégradation. La Figure IV.28 présente l'électrode d'Inox 2205 du bac témoin examiné en MEB à différents grossissements et différentes zones. La surface d'acier immergée dans le bac témoin présente une surface rugueuse (Figure IV.28(a)). La rugosité de l'électrode est due à la présence d'une structure organique et d'une cristallisation (cristaux NaCl) bien visibles dans les Figures IV.28(c) et (d). La structure organique provient des organismes marins formant le biofilm. De même, nous observons plusieurs espèces de diatomées présentes sur l'électrode.

Les diatomées observées sont encerclées en bleu alors que les bactéries en rouge. Le milieu marin contenant une infinité de diatomées [170], nous avons pu identifier que quelques-unes d'après la forme et la taille de chacune. La diatomée observée sur la Figure IV.30(b) s'appelle *Actinocyclus exiguus*. Elle appartient à la classe *Diatomophyceae* et la famille *Hemidiscaceae* [171]. La diatomée observée sur la Figure IV.30(e) est appelé *Rhizosoleniineae*. Elle appartient à la classe *Bacillariophyceae* et la famille *Rhizosoleniaceae* [172].

Matériaux à base d'alginate antimicrobiens dans le milieu marin

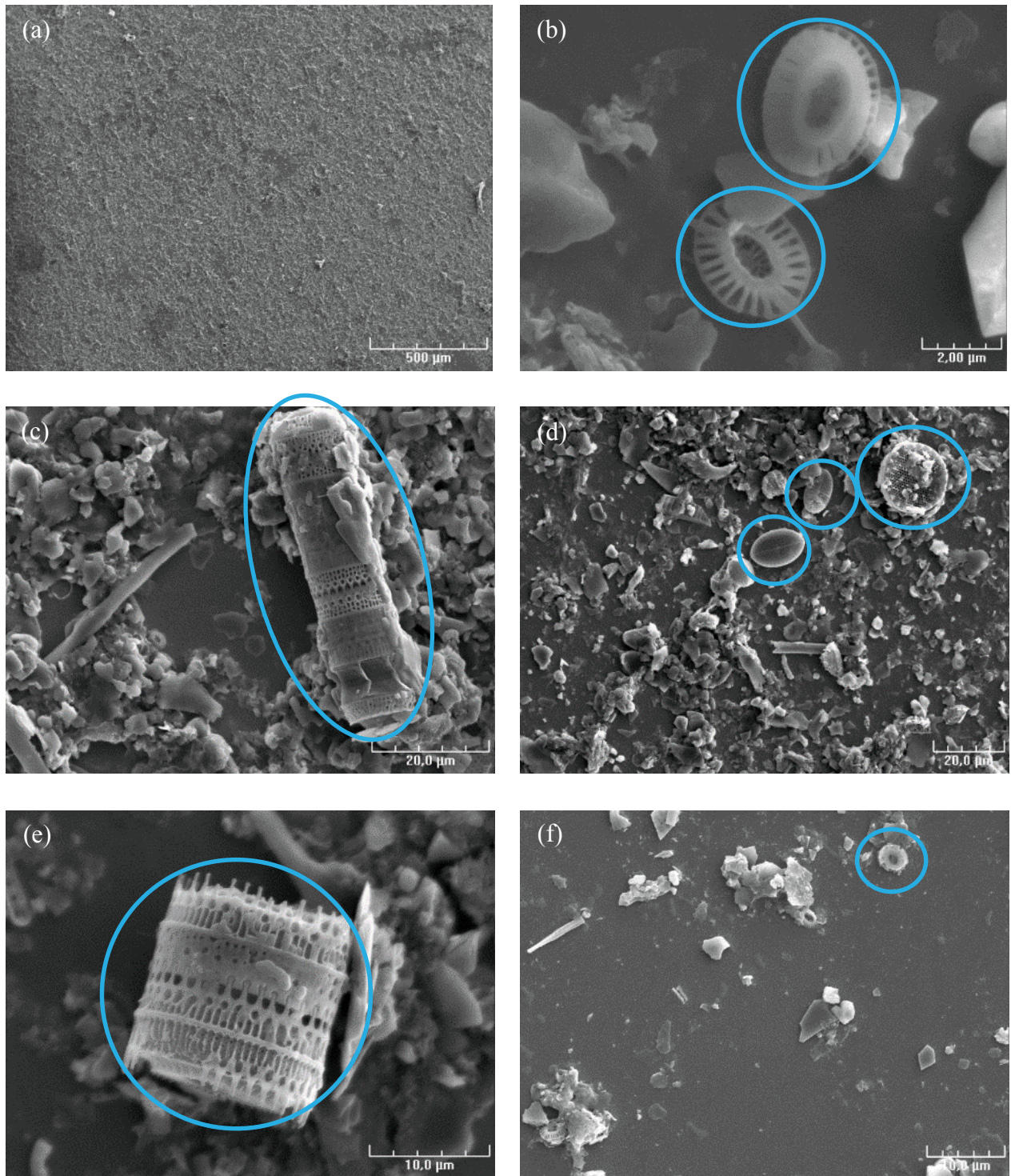


Figure IV.28 Clichés MEB de l'électrode d'Inox 2205 présente dans le bac témoin en absence de matériaux

Matériaux à base d'alginate antimicrobiens dans le milieu marin

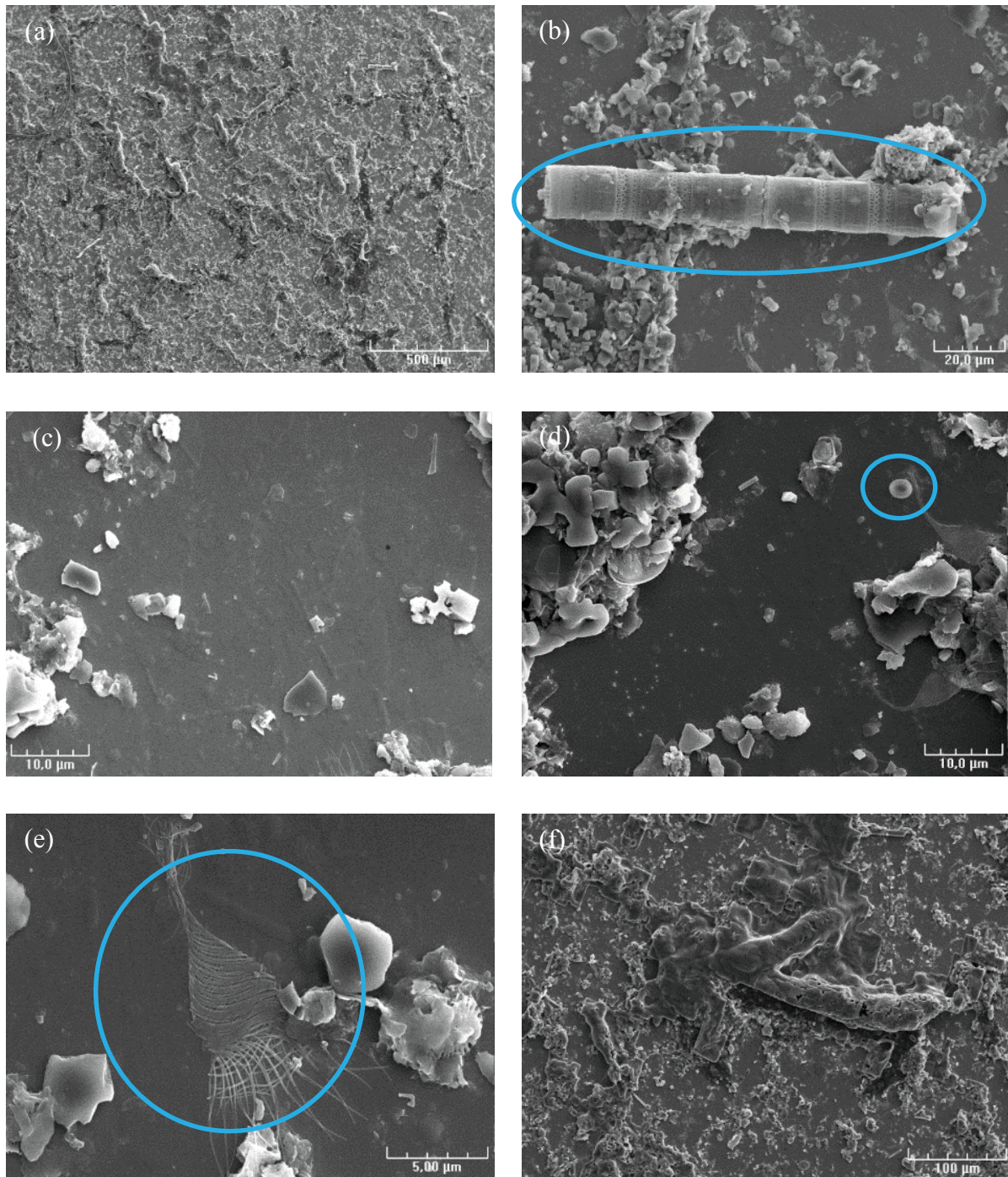


Figure IV.29 Clichés MEB de l'électrode d'Inox 2205 présente dans le bac contenant les hydrogels $Zn_{0,1}$

Matériaux à base d'alginate antimicrobiens dans le milieu marin

La Figure IV.29(a) montre que la surface d'acier du bac contenant les hydrogels $Zn_{0,1}$ est identique à celle du bac témoin. Une structure organique est visible surtout dans les Figures IV.29(d) et (f), elle recouvre dans la Figure IV.29(f) une diatomée. Plusieurs espèces de diatomées sont présentes sur plusieurs zones de l'électrode comme le montre les Figures IV.29 (b), (d) et (e). Ces clichés MEB sont semblables à ceux de la Figure IV.29, nous pouvons alors supposer que le biofilm formé est le même dans les deux bacs.

Pour une même échelle de $500\mu m$, la surface d'Inox issue du bac contenant les hydrogels $Ca_{0,27}Zn_{0,05}$ semble de même rugosité que les précédentes. Nous retrouvons la structure organique ainsi que les différentes espèces de diatomées (Figure IV.30(b), (c) et (e)). La Figure IV.30(f) montre une présence bactérienne sur quelques zones de l'Inox. Les bactéries ne sont pas visibles sur les électrodes placées dans les deux autres bacs. Les clichés MEB permettent donc de montrer que le biofilm semble différent dans le bac contenant les cubes d'hydrogel $Ca_{0,27}Zn_{0,05}$.

Matériaux à base d'alginate antimicrobiens dans le milieu marin

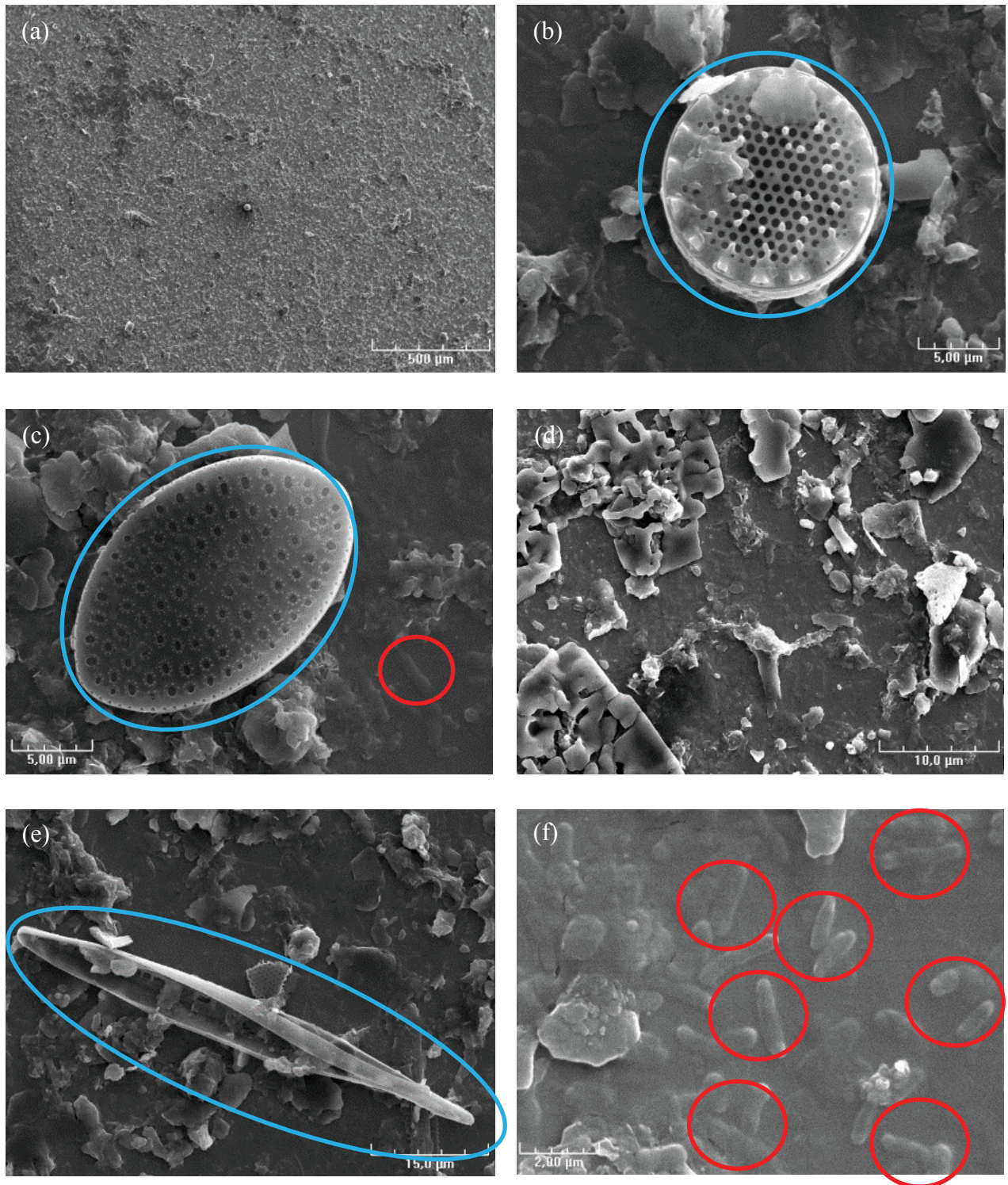


Figure IV.30 Clichés MEB de l'électrode d'Inox 2205 présente dans le bac contenant les 4 cubes d'hydrogel $Ca_{0,27}Zn_{0,05}$

Matériaux à base d'alginate antimicrobiens dans le milieu marin

Les cubes d'hydrogels utilisés dans cette expérience ont été étudiés. La Figure IV.31 compare les cubes d'hydrogels $Zn_{0,1}$ et $Ca_{0,27}Zn_{0,05}$ avant et après immersion de 30 jours dans l'eau de mer naturelle dans le but de déterminer si une expérience plus longue est possible.

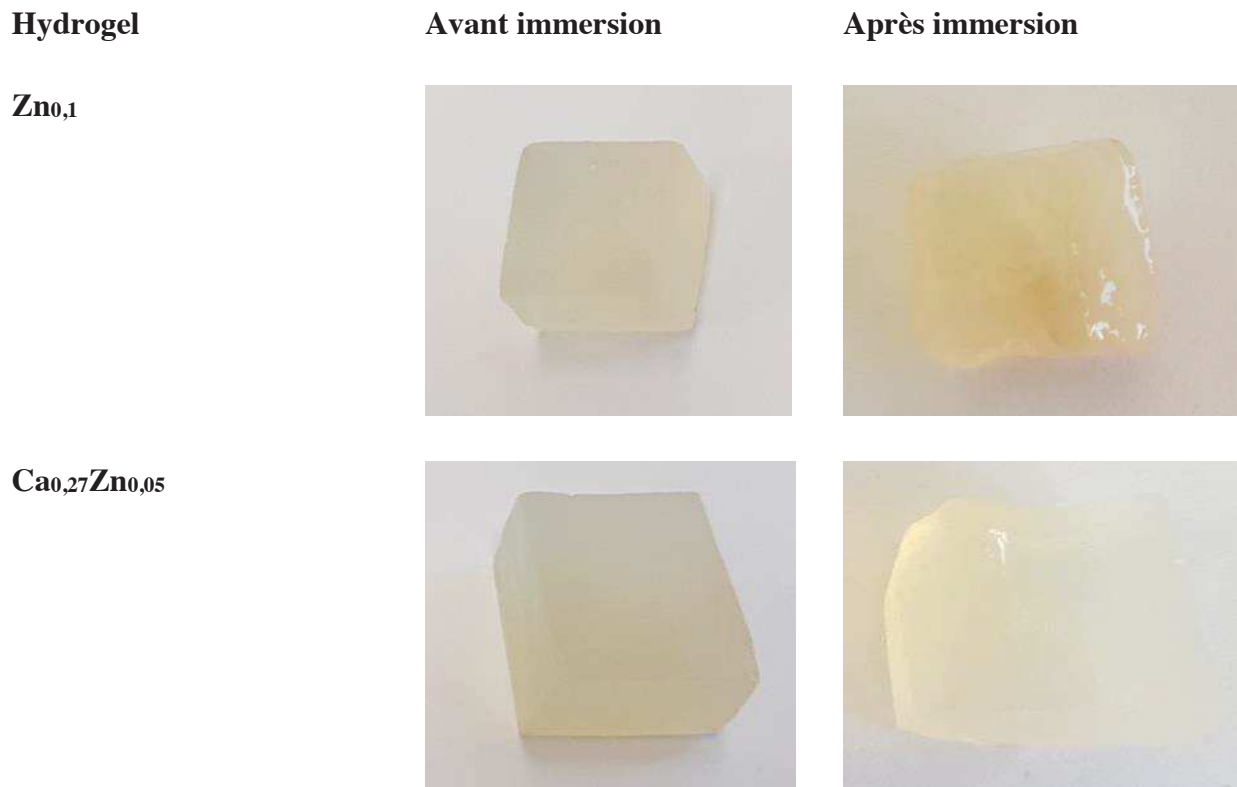


Figure IV.31 Cubes d'hydrogels $Zn_{0,1}$ et $Ca_{0,27}Zn_{0,05}$ avant et après immersion de 30 jours dans l'eau de mer naturelle

Nous observons à l'œil nu le changement d'état des matériaux durant leur immersion dans les bacs contenant l'eau de mer naturelle renouvelée, ils ont l'air émoussé mais toujours volumineux. Les hydrogels sont rincés rapidement à l'eau désionisée et sont pesés avant et après l'expérience (sans séchage) afin d'en déduire la perte de masse au bout de 30 jours d'immersion.

Matériaux à base d'alginate antimicrobiens dans le milieu marin

Tableau IV.12 Comparaison de la masse des hydrogels $Zn_{0,1}$ et $Ca_{0,27}Zn_{0,05}$ à t_0 et au bout de 30 jours d'immersion dans l'eau de mer naturelle ainsi que le taux de masse restant de chacun

Matériau	M_0 (g)	$M_{30 \text{ jours}}$ (g)	% M_{restant}
$Zn_{0,1}$	3,3	2,1	62
$Ca_{0,27}Zn_{0,05}$	3,6	3,5	96

Les hydrogels $Ca_{0,27}Zn_{0,05}$ perdent 4% de leur masse initiale au bout de 30 jours d'immersion alors que les hydrogels $Zn_{0,1}$ perdent 38%. La perte de masse du $Zn_{0,1}$ est beaucoup plus importante que celle observée dans la Figure IV.11 (4%). Ceci peut être expliqué par la différence entre une eau salée synthétisée et une eau de mer naturelle qui est renouvelée. La présence de microorganismes ainsi qu'un renouvellement d'ions continu dans le bac peuvent être la cause d'une perte de masse plus importante. Nous en déduisons que les hydrogels contenant du calcium sont plus stables et leur dégradation est plus faible en fonction du temps par rapport aux hydrogels ne contenant pas du calcium.

D'après l'expérience d'OCP effectuée, la perte de masse ainsi que l'analyse en microscopie, nous pouvons conclure que les cubes d'hydrogels $Zn_{0,1}$ ont perdu à peu près 40% de leur masse initiale et ont retardé la formation du biofilm sur l'inox de quatre jours avant de retrouver un biofilm similaire à celui obtenu en absence d'alginate. Cependant, les hydrogels $Ca_{0,27}Zn_{0,05}$ sont très stables ne perdant que 4% de leur masse initiale, relarguent les ions de zinc sur une durée plus longues que les hydrogels $Zn_{0,1}$ et finalement retardent la formation du biofilm sur la surface humide à protéger n'obtenant probablement un biofilm différent sur l'acier qui est peut-être de plus faible maturité que les deux autres obtenus. Cette hypothèse est émise d'après la valeur de différence de potentiel qui n'atteint que 70 mV et par les bactéries visibles en MEB.

5. Conclusion

Nous avons élaboré des hydrogels à base de calcium, cuivre, zinc et des mélanges calcium/cuivre et calcium/zinc de différentes concentrations ioniques. Nous avons démontré la présence du cuivre et du zinc sous leur forme ionique Cu^{2+} et Zn^{2+} . La stabilité de chacun des hydrogels a été étudiée dans de l'eau désionisée et dans de l'eau de mer synthétisée pour une température ambiante et à 37°C. Nous avons pu en conclure que l'augmentation de température diminue la stabilité des matériaux. Ces différents hydrogels ont été testés sur différentes souches de microalgues et de bactéries. Les différents pourcentages d'inhibition de croissance et d'adhésion montrent que les hydrogels élaborés affectent la croissance et l'adhésion d'une façon différente relevant ainsi la sensibilité différente de chaque souche aux matériaux élaborés ce qui est différent des produits toxiques présents dans le marché. Enfin, nous avons pu démontrer que les hydrogels de mélange calcium/zinc sont plus stables dans un système ouvert et peuvent en effet retarder la formation de biofilm sur des surfaces humides.

Conclusion générale et perspectives

La formation de biofilms dans les différents milieux affecte la vie quotidienne de l'homme d'un point de vue économique ainsi que sa santé. Les biocides les plus utilisés comme produits antifouling vont être interdits dans les prochaines années. D'autres produits antifouling à base de NPs ont été élaborés visant des applications dans le domaine médical. Cependant, l'utilisation des NPs est récente et leur potentiel effet toxique sur le monde marin reste à étudier. Afin d'éviter l'utilisation de produits toxiques pour le corps humain ainsi que pour l'environnement marin, nous avons décidé d'élaborer des matériaux à base de zinc. Ces matériaux ont été comparés avec des matériaux à base de cuivre, le cuivre étant connu et étudié extensivement pour son effet antibactérien. Les matériaux que nous avons élaborés ont pour but de limiter l'adhésion des organismes aux surfaces que nous souhaitons protéger et d'éviter de nuire aux organismes non ciblés.

Les travaux présentés dans ce manuscrit concernent l'élaboration de matériaux permettant de lutter contre la formation de biofilms que ce soit dans le milieu médical ou dans le milieu marin. Des films d'hydrogel d'épaisseur centimétrique ainsi que des films déposés sur acier d'épaisseur micrométrique ont été élaborés pour des applications dans le domaine médical. Les films d'hydrogels élaborés par la méthode de casting peuvent être utilisés pour la couverture de plaies par exemple. L'ajout de plastifiants a permis d'obtenir des films d'hydrogels poreux. Les propriétés physico-chimiques des films d'hydrogel ont été étudiées démontrant l'intégration du cuivre et du zinc sous leur forme ionique. Les films d'alginate revêtant de l'acier inoxydable élaborés par la méthode de déposition par électrophorèse peuvent être utilisés pour couvrir toute surface métallique et ainsi la protéger d'un éventuel biofilm.

Dans un second temps, nous avons élaboré des hydrogels en volume dans le but d'être utilisés dans le domaine marin. Des hydrogels de mélange calcium/cuivre et calcium/zinc ont été étudiés. Nous avons démontré l'homogénéité de ces hydrogels ainsi que leur faible dégradation dans des milieux aqueux. Il s'avère que l'ajout de calcium a rendu les hydrogels plus stables que ce soit pour une immersion en eau désionisée ou en eau salée, à une température ambiante ou de 37°C. L'ajout

Conclusion générale et perspectives

de calcium a aussi permis de réaliser la gélification de l'alginate en diminuant les concentrations de cuivre et de zinc toujours présents sous leurs formes ioniques.

Des tests antibactériens qualitatifs ont été effectués sur les souches de bactéries pathogènes *E.coli* (Gram-) et *S.aureus* (Gram+) en présence des différents films d'alginate élaborés. Les films d'alginate de cuivre et de zinc sous leurs différentes formes ont montré des effets inhibiteurs. Ces effets sont plus accentués pour la bactérie de Gram+ possédant une couche de peptidoglycane plus épaisse.

De même, des tests antimicrobiens quantitatifs ont été effectués sur quatre souches de bactéries marines (*Halomonas aquamarina*, *Vibrio aesturianus*, *Vibrio harveyi* et *Pseudoalteromonas Elyakovii*) et deux souches de microalgues (*Halophora coffeaeformis* et *Cylindrotheca closterium*). La croissance et l'adhésion de ces microorganismes ont été étudiées en présence des hydrogels en volume. Des hydrogels de mélange calcium/ cuivre et calcium/zinc à différentes concentrations ioniques ont présenté des inhibitions de croissance et d'adhésion en évitant la toxicité pour l'environnement.

Finalement, les hydrogels en volume $Zn_{0,1}$ et $Ca_{0,27}Zn_{0,05}$ ont été testés en milieu ouvert par la méthode de mesure du potentiel d'abandon. Cette méthode a permis de suivre en temps réel pendant une durée de 30 jours, le comportement des matériaux en situation réelle. L'hydrogel $Zn_{0,1}$ a pu retarder la formation du biofilm sur l'électrode de quelques jours avant d'atteindre son stade de maturité observé en absence de nos matériaux. Par contre, l'hydrogel $Ca_{0,27}Zn_{0,05}$ a retardé d'avantage la formation du biofilm sur l'inox et a conduit à un biofilm différent des autres. Ce matériau pourrait avoir une efficacité plus importante au niveau de son endurance et de la maturité du biofilm obtenu. La cinétique de relargage semble alors meilleure dans le cas de ce dernier matériau ceci pourrait être dû à la coque de calcium enveloppant un cœur riche en zinc observé en EDX.

Il serait intéressant par la suite d'essayer d'élaborer des matériaux de mélange calcium/cuivre/zinc puisque le mode d'action de chacun de ces ions est différent obtenant ainsi un matériau probablement considéré plus universel. De même, il est important d'étudier la cinétique de relargage des ions présents dans nos matériaux afin de comprendre le phénomène d'inhibition des microorganismes. Les tests antibactériens effectués sur les bactéries pathogènes restent

Conclusion générale et perspectives

incomplets, il serait alors nécessaire d'étudier quantitativement l'inhibition des bactéries pathogènes en présence de nos matériaux. De plus, l'étude du potentiel d'abandon a été effectuée durant le mois de décembre pendant une durée de 30 jours. Puisque ces résultats peuvent changer d'une saison à une autre, il est alors judicieux d'effectuer cette expérience lors d'une autre saison et en changeant les différents paramètres tels que la durée de l'expérience, le débit de renouvellement de l'eau filtrée et l'exposition à la lumière et d'étudier en microscopie les cubes d'hydrogel récupérés en fin d'expérience.

Enfin, dans le but de mieux comprendre le mode d'action inhibitrice des matériaux que nous avons élaborés, il serait alors important par la suite de les récupérer ainsi que le milieu microbien dans lequel ils ont été immergés dans le but d'identifier sous quelle forme le cuivre et le zinc y sont présents et de tenter de proposer une explication chimique au phénomène inhibiteur ou antiadhésif ainsi observé.

Références

- [1] L. Hall-Stoodley, J. W. Costerton, and P. Stoodley, "Bacterial biofilms: From the natural environment to infectious diseases," *Nat. Rev. Microbiol.*, vol. 2, no. 2, pp. 95–108, 2004.
- [2] I. Doghri, "Interactions moléculaires entre microorganismes au sein de biofilms en milieu marin : mise en évidence de biomolécules antibiofilm" Thèse Ibtissem Doghri To cite this version : HAL Id : tel-01708229," 2018.
- [3] T. Mikołajczyk and D. Wołowska-Czapnik, "Multifunctional alginate fibres with anti-bacterial properties," *Fibres Text. East. Eur.*, vol. 13, no. 3, pp. 35–40, 2005.
- [4] M. A. Raza, Z. Kanwal, A. Rauf, A. N. Sabri, S. Riaz, and S. Naseem, "Size- and Shape-Dependent Antibacterial Studies of Silver Nanoparticles Synthesized by Wet Chemical Routes.," *Nanomater. (Basel, Switzerland)*, vol. 6, no. 4, Apr. 2016.
- [5] A. Kumar and M. Jaiswal, "Design and in vitro investigation of nanocomposite hydrogel based in situ spray dressing for chronic wounds and synthesis of silver nanoparticles using green chemistry," *J. Appl. Polym. Sci.*, vol. 133, no. 14, pp. 1–14, 2016.
- [6] M. Torabfam and H. Jafarizadeh-Malmiri, "Microwave-enhanced silver nanoparticle synthesis using chitosan biopolymer: Optimization of the process conditions and evaluation of their characteristics," *Green Process. Synth.*, no. December, 2017.
- [7] A. Ali, I. U. Haq, J. Akhtar, M. Sher, N. Ahmed, and M. Zia, "Synthesis of Ag-NPs impregnated cellulose composite material: its possible role in wound healing and photocatalysis," *IET Nanobiotechnology*, vol. 11, no. 4, pp. 477–484, Jun. 2017.
- [8] L. Cordero-Arias *et al.*, "Electrophoretic deposition of ZnO/alginate and ZnO-bioactive glass/alginate composite coatings for antimicrobial applications," *Mater. Sci. Eng. C*, vol. 55, pp. 137–144, 2015.
- [9] M. Auffan, C. Santaella, W. Achouak, A. Thill, and M. Wiesner, *Encyclopedia of Nanotechnology*. 2016.
- [10] H. Ma, P. L. Williams, and S. A. Diamond, "Ecotoxicity of manufactured ZnO nanoparticles - A review," *Environ. Pollut.*, vol. 172, pp. 76–85, 2013.
- [11] T. J. Brunner *et al.*, "In Vitro Cytotoxicity of Oxide Nanoparticles : Comparison to Asbestos , Silica , and the Effect of Particle Solubility In Vitro Cytotoxicity of Oxide Nanoparticles : Comparison to Asbestos , Silica , and the Effect of Particle Solubility †," *Environ. Sci. Technol.*, vol. 40, no. 14, pp. 4374–4381, 2006.
- [12] J. Pandiarajan and M. Krishnan, "Properties, synthesis and toxicity of silver nanoparticles," *Environ. Chem. Lett.*, vol. 15, no. 3, pp. 387–397, 2017.
- [13] D. M. Yebra, S. Kiil, and K. Dam-Johansen, "Antifouling technology - Past, present and future steps towards efficient and environmentally friendly antifouling coatings," *Prog. Org. Coatings*, vol. 50, no. 2, pp. 75–104, 2004.
- [14] D. Daehne, C. Fürle, A. Thomsen, B. Watermann, and M. Feibicke, "Antifouling biocides in German marinas: Exposure assessment and calculation of national consumption and emission," *Integr. Environ. Assess. Manag.*, vol. 13, no. 5, pp. 892–905, 2017.
- [15] J. P. Maréchal and C. Hellio, "Challenges for the development of new non-toxic antifouling solutions," *Int. J. Mol. Sci.*, vol. 10, no. 11, pp. 4623–4637, 2009.
- [16] B. Antizar-Ladislao, "Environmental levels, toxicity and human exposure to tributyltin

Références

- (TBT)-contaminated marine environment. A review,” *Environ. Int.*, vol. 34, no. 2, pp. 292–308, 2008.
- [17] R. Trepos, “Innovative Approaches for the Development of New Non-Toxic Antifouling Solutions .,” Thesis University of Portsmouth, 2016.
- [18] M. Lehaitre and C. Compère, “BIOFOULING and UNDERWATER MEASUREMENTS,” *Real-Time Coast. Obs. Syst. Mar. Ecosyst. Dyn. Harmful Algal Bloom. Theory, Instrum. Model.*, pp. 463–493, 2008.
- [19] Y. H. An and R. J. Friedman, “Concise review of mechanisms of bacterial adhesion to biomaterial surfaces,” *J. Biomed. Mater. Res.*, vol. 43, no. 3, pp. 338–348, 1998.
- [20] J. D. Bryers, “Medical biofilms.,” *Biotechnol. Bioeng.*, vol. 100, no. 1, pp. 1–18, May 2008.
- [21] “Antifouling technology—past, present and future steps towards efficient and environmentally friendly antifouling coatings,” *Prog. Org. Coatings*, vol. 50, no. 2, pp. 75–104, Jul. 2004.
- [22] S. L. Percival and D. W. Williams, “Escherichia coli,” in *Microbiology of Waterborne Diseases*, Academic Press, 2014, pp. 89–117.
- [23] J. Y. Lim, J. Yoon, and C. J. Hovde, “A brief overview of Escherichia coli O157:H7 and its plasmid O157.,” *J. Microbiol. Biotechnol.*, vol. 20, no. 1, pp. 5–14, Jan. 2010.
- [24] L. M. Schlecht *et al.*, “Systemic Staphylococcus aureus infection mediated by Candida albicans hyphal invasion of mucosal tissue,” 2015.
- [25] M. Masalha, I. Borovok, R. Schreiber, Y. Aharonowitz, and G. Cohen, “Analysis of Transcription of the Staphylococcus aureus Aerobic Class Ib and Anaerobic Class III Ribonucleotide Reductase Genes in Response to Oxygen,” *J. Bacteriol.*, vol. 183, no. 24, pp. 7260–7272, 2001.
- [26] C. M. Nichols, J. P. Bowman, and J. Guezennec, “Effects of incubation temperature on growth and production of exopolysaccharides by an antarctic sea ice bacterium grown in batch culture.,” *Appl. Environ. Microbiol.*, vol. 71, no. 7, pp. 3519–23, Jul. 2005.
- [27] R. H. VREELAND, C. D. LITCHFIELD, E. L. MARTIN, and E. ELLIOT, “Halomonas elongata, a New Genus and Species of Extremely Salt-Tolerant Bacteria,” *Int. J. Syst. Bacteriol.*, vol. 30, no. 2, pp. 485–495, 1980.
- [28] D. L. Tison and R. J. Seidler, “Vibrio aestuarianus: a New Species from Estuarine Waters and Shellfish,” *Int. J. Syst. Bacteriol.*, vol. 33, no. 4, pp. 699–702, 1983.
- [29] M.-A. Travers *et al.*, “Several strains, one disease: experimental investigation of Vibrio aestuarianus infection parameters in the Pacific oyster, Crassostrea gigas,” *Vet. Res.*, vol. 48, p. 32, 2017.
- [30] Yannick LABREUCHE, “Caractérisation de la virulence d’une souche de Vibrio aestuarianus, pathogène de l’huître Crassostrea gigas,” Thèse UNIVERSITÉ DE BRETAGNE OCCIDENTALE - BREST, 2006.
- [31] B. Austin and X.-H. Zhang, “Vibrio harveyi: a significant pathogen of marine vertebrates and invertebrates,” *Lett. Appl. Microbiol.*, vol. 43, no. 2, pp. 119–124, Aug. 2006.
- [32] T. Sawabe *et al.*, “Assignment of Alteromonas elyakovii KMM 162T and five strains isolated from spot-wounded fronds of Laminaria japonica to Pseudoalteromonas elyakovii comb. nov. and the extended description of the species,” *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, vol. 50, no. 1, pp. 265–271, 2000.
- [33] J. Legrand, “Les microalgues : pour quoi faire ?,” 2015. [Online]. Available: www.gepea.fr. [Accessed: 18-Dec-2018].
- [34] “Définition et caractéristique d’une micro-algue.” [Online]. Available: <http://algue-production-energie.e-monsite.com/pages/la-production-d-energie/la-production-d->

Références

- energie.html. [Accessed: 13-Jul-2018].
- [35] M. Mejdandžić, S. Bosak, and Z. Ljubešić, “Blue Diatoms: Global Phenomenon of “Greening” in Shellfish and Record of Planktonic *Haslea* Species in the South Adriatic Sea,” *Nase More*, vol. 64, no. 1, pp. 38–44, 2017.
- [36] K. Batyrova, A. Gavrishcheva, E. Ivanova, J. Liu, and A. Tsygankov, “Sustainable hydrogen photoproduction by phosphorus-deprived marine green microalgae *Chlorella* sp.,” *Int. J. Mol. Sci.*, vol. 16, no. 2, pp. 2705–2716, 2015.
- [37] Nrel, “A look back at the U. S. Department of Energy’s aquatic species program: biodiesel from algae,” *Report*, vol. 328, p. 291 p, 1998.
- [38] W. Daniels, *Aquaculture Production Systems*, edited by J. H. Tidwell, vol. June. 2013.
- [39] A. L. Manuell, J. Quispe, and S. P. Mayfield, “Structure of the Chloroplast Ribosome: Novel Domains for Translation Regulation,” *PLoS Biol.*, vol. 5, no. 8, p. e209, Aug. 2007.
- [40] G. D. Bixler and B. Bhushan, “Review article: Biofouling: Lessons from nature,” *Philos. Trans. R. Soc. A Math. Phys. Eng. Sci.*, vol. 370, no. 1967, pp. 2381–2417, 2012.
- [41] K. LoVetri, P. V. Gawande, N. Yakandawala, and S. Madhyastha, “Biofouling and Anti-Fouling of Medical Devices,” *Biofouling: Types, Impact and Anti-Fouling*, no. October, pp. 105–127, 2010.
- [42] J. Chan and S. Wong, *Biofouling : types, impact, and anti-fouling*. Nova Science Publishers, 2010.
- [43] M. S. Smeltzer, C. L. Nelson, and R. P. Evans, “Biofilms and Aseptic Loosening,” in *The Role of Biofilms in Device-Related Infections*, Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, 2008, pp. 57–74.
- [44] J. Ntienoue, “Étude , caractérisation et suivi électrochimique de la surface de l’acier inoxydable 254 SMO en milieux aqueux naturels amazoniens,” Thèse Université des Antilles et de la Guyane, 2013.
- [45] N. Le Bozec, “Réaction de réduction de l’oxygène sur les aciers inoxydables en eau de mer naturelle. Influence du biofilm sur les processus de corrosion,” Université de Bretagne Occidentale, 2000.
- [46] Jessem LANDOULSI, “Influence des réactions enzymatiques sur le comportement électrochimique de l’acier inoxydable EN X2CrNiMo17-11-2 (AISI 316L) en biocorrosion: Rôle des processus interfaciaux sur la modification du film passif,” 2015.
- [47] J. Liao, H. Fukui, T. Urakami, and H. Morisaki, “Effect of biofilm on ennoblement and localized corrosion of stainless steel in fresh dam-water,” *Corros. Sci.*, vol. 52, no. 4, pp. 1393–1403, 2010.
- [48] K. M. Ismail, A. Jayaraman, T. K. Wood, and J. C. Earthman, “The influence of bacteria on the passive film stability of 304 stainless steel,” *Electrochim. Acta*, vol. 44, no. 26, pp. 4685–4692, 1999.
- [49] N. Le Bozec, C. Compère, M. L’Her, A. Laouenan, D. Costa, and P. Marcus, “Influence of stainless steel surface treatment on the oxygen reduction reaction in seawater,” *Corros. Sci.*, vol. 43, no. 4, pp. 765–786, 2001.
- [50] C. Compère, P. Jaffre, and D. Festy, “Aging of type 316L stainless steel in seawater: Relationship between open-circuit potential, exposure time, and fitting potential,” *Corrosion*, vol. 52, no. 7, pp. 496–501, 1996.
- [51] B. Little, J. Lee, and R. Ray, “MICROBIOLOGICALLY INFLUENCED CORROSION: GLOBAL PHENOMENA, LOCAL MECHANISMS,” 2011.
- [52] D. Thierry, N. Larché, C. Leballeur, S. L. Wijesinghe, and T. Zixi, “Corrosion potential and cathodic reduction efficiency of stainless steel in natural seawater,” *Mater. Corros.*, vol. 66,

Références

- no. 5, pp. 453–458, May 2015.
- [53] F. Xu, J. Duan, C. Lin, and B. Hou, “Influence of Marine Aerobic Biofilms on Corrosion of 316L Stainless Steel,” *J. Iron Steel Res. Int.*, vol. 22, no. 8, pp. 715–720, Aug. 2015.
- [54] E. Huttunen-Saarivirta, P. Rajala, M. Marja-aho, J. Maukonen, E. Sohlberg, and L. Carpén, “Ennoblement, corrosion, and biofouling in brackish seawater: Comparison between six stainless steel grades,” *Bioelectrochemistry*, vol. 120, pp. 27–42, 2018.
- [55] N. G. Reed, “The history of ultraviolet germicidal irradiation for air disinfection.,” *Public Health Rep.*, vol. 125, no. 1, pp. 15–27, 2010.
- [56] Lenntech, “UV Systems - Lenntech hydroponic.” [Online]. Available: https://www.lenntech.com/systems/uv/swimming-pools/uv_pools.htm. [Accessed: 18-Jul-2018].
- [57] Gom'air, “SYSTÈME D'ULTRASONS POUR LE NETTOYAGE.” [Online]. Available: <http://gomair.fr/systeme-ultrasons-pour-le-nettoyage/>. [Accessed: 19-Jul-2018].
- [58] C. M. Cooney, “Triclosan comes under scrutiny.,” *Environ. Health Perspect.*, vol. 118, no. 6, p. A242, Jun. 2010.
- [59] R. L. Calderon, “The epidemiology of chemical contaminants of drinking water,” *Food Chem. Toxicol.*, vol. 38, pp. S13–S20, Apr. 2000.
- [60] R.G. Kleijnen, “The Chlorine Dilemma Final Report,” 2011. [Online]. Available: https://www.sswm.info/sites/default/files/reference_attachments/TUE_2011_The_Chlorine_Dilemma.pdf. [Accessed: 18-Jul-2018].
- [61] “Guidelines for Drinking-water Quality THIRD EDITION INCORPORATING THE FIRST AND SECOND ADDENDA Volume 1 Recommendations Geneva 2008 WHO Library Cataloguing-in-Publication Data,” 2008.
- [62] S. Venkatnarayanan, P. Sriyutha Murthy, R. Kirubakaran, and V. P. Venugopalan, “Chlorine dioxide as an alternative antifouling biocide for cooling water systems: Toxicity to larval barnacle *Amphibalanus reticulatus* (Utinomi),” *Mar. Pollut. Bull.*, vol. 124, no. 2, pp. 803–810, Nov. 2017.
- [63] D. Boudjellaba, “La mesure des sous-produits de chloration dans les eaux du golfe de Fos,” Thèse Université de Perpignan Via Domitia, 2014.
- [64] M. Barthomeuf *et al.*, “Bactericidal efficiency of UVA-active titanium dioxide thin layers on bacteria from food industry environments,” *Mater. Technol.*, vol. 32, no. 13, pp. 782–791, 2017.
- [65] P. C. Maness, S. Smolinski, D. M. Blake, Z. Huang, E. J. Wolfrum, and W. A. Jacoby, “Bactericidal activity of photocatalytic TiO₂ reaction: toward an understanding of its killing mechanism.,” *Appl. Environ. Microbiol.*, vol. 65, no. 9, pp. 4094–8, Sep. 1999.
- [66] S. DALHATOU, “Application des techniques d'oxydation avancée pour la dépollution des effluents organiques dans les eaux de rejets industriels : Cas des savonneries,” 2014.
- [67] “Les produits biocides | Anses - Agence nationale de sécurité sanitaire de l'alimentation, de l'environnement et du travail.”
- [68] S. Rouillon, S. Ourdanabia, S. Jamart, C. Hernandez, and O. Meunier, “Étude de l'efficacité d'un produit détergent désinfectant pour sols et surfaces sur les souches bactériennes isolées à partir de l'environnement hospitalier,” *Pathol. Biol.*, vol. 54, no. 6, pp. 325–330, Jul. 2006.
- [69] R. J. Ross and F. P. L. USDA Forest Service., “Wood handbook : wood as an engineering material,” 2010.
- [70] S. Palanti and E. Feci, “A Wood Preservative Based on Commercial Silica Nanodispersions and Boric Acid against Fungal Decay through Laboratory and Field Tests,” *Open J. For.*, vol. 03, no. 02, pp. 57–61, 2013.

Références

- [71] A. Fonchy, “Comment mieux contrôler avec moins de Biocides?,” 2016. [Online]. Available: <http://www.ensystex-solution-pro.com/media/wysiwyg/documents/ensystex-3e-2016.pdf>.
- [72] Essilor International, “CAHIERS D’OPTIQUE OCULAIRE.pdf,” 1997. [Online]. Available: <http://www.essiloracademy.eu/sites/default/files/10.Materiaux.pdf>.
- [73] “ANTIBIOTIQUES,” 2007. [Online]. Available: <http://andre.ar.free.fr/antibiotiques.pdf>. [Accessed: 18-Dec-2018].
- [74] L. Drago, L. Cappelletti, E. De Vecchi, L. Pignataro, S. Torretta, and R. Mattina, “Antiadhesive and antibiofilm activity of hyaluronic acid against bacteria responsible for respiratory tract infections.,” *APMIS*, vol. 122, no. 10, pp. 1013–1019, 2014.
- [75] W. K. Jung, H. C. Koo, K. W. Kim, S. Shin, S. H. Kim, and Y. H. Park, “Antibacterial Activity and Mechanism of Action of the Silver Ion in Staphylococcus aureus and Escherichia coli,” *Appl. Environ. Microbiol.*, vol. 74, no. 7, pp. 2171–2178, Apr. 2008.
- [76] M. C. Straccia, G. G. D’Ayala, I. Romano, and P. Laurienzo, “Novel zinc alginate hydrogels prepared by internal setting method with intrinsic antibacterial activity,” *Carbohydr. Polym.*, vol. 125, pp. 103–112, 2015.
- [77] I. Malagurski, S. Levic, M. Mitric, V. Pavlovic, and S. Dimitrijevic-Brankovic, “Bimetallic alginate nanocomposites: New antimicrobial biomaterials for biomedical application,” *Mater. Lett.*, vol. 212, pp. 32–36, 2018.
- [78] R. Y. Pelgrift and A. J. Friedman, “Nanotechnology as a therapeutic tool to combat microbial resistance,” *Adv. Drug Deliv. Rev.*, vol. 65, no. 13–14, pp. 1803–1815, 2013.
- [79] I. Capek, “Preparation of metal nanoparticles in water-in-oil (w/o) microemulsions,” *Adv. Colloid Interface Sci.*, vol. 110, no. 1–2, pp. 49–74, 2004.
- [80] M. Kong, X. G. Chen, K. Xing, and H. J. Park, “Antimicrobial properties of chitosan and mode of action: A state of the art review,” *Int. J. Food Microbiol.*, vol. 144, no. 1, pp. 51–63, 2010.
- [81] L. Zhang, Y. Jiang, Y. Ding, M. Povey, and D. York, “Investigation into the antibacterial behaviour of suspensions of ZnO nanoparticles (ZnO nanofluids),” *J. Nanoparticle Res.*, vol. 9, no. 3, pp. 479–489, 2007.
- [82] P. K. Stoimenov, R. L. Klinger, G. L. Marchin, and K. J. Klabunde, “Metal Oxide Nanoparticles as Bactericidal Agents,” *Langmuir*, vol. 18, no. 17, pp. 6679–6686, Aug. 2002.
- [83] Q. L. Feng, J. Wu, G. Q. Chen, F. Z. Cui, T. N. Kim, and J. O. Kim, “A mechanistic study of the antibacterial effect of silver ions on Escherichia coli and Staphylococcus aureus,” *J. Biomed. Mater. Res.*, vol. 52, no. 4, pp. 662–668, 2000.
- [84] S. Pal, Y. K. Tak, and J. M. Song, “Does the antibacterial activity of silver nanoparticles depend on the shape of the nanoparticle? A study of the Gram-negative bacterium Escherichia coli.,” *Appl. Environ. Microbiol.*, vol. 73, no. 6, pp. 1712–20, Mar. 2007.
- [85] D. Klemm, B. Heublein, H.-P. Fink, and A. Bohn, “Cellulose: Fascinating Biopolymer and Sustainable Raw Material,” *Angew. Chemie Int. Ed.*, vol. 44, no. 22, pp. 3358–3393, May 2005.
- [86] “Zeoform: The eco-friendly building material of the future?” [Online]. Available: <https://newatlas.com/zeoform-cellulose-water/28796/>. [Accessed: 20-Jul-2018].
- [87] M. Constantin, I. Asmarandei, V. Harabagiu, L. Ghimici, P. Ascenzi, and G. Fundeanu, “Removal of anionic dyes from aqueous solutions by an ion-exchanger based on pullulan microspheres,” *Carbohydr. Polym.*, vol. 91, no. 1, pp. 74–84, Jan. 2013.
- [88] R. J. B. Pinto, M. C., C. Pascoal, and T. Trindade, “Composites of Cellulose and Metal

Références

- Nanoparticles,” *Nanocomposites - New Trends Dev.*, 2012.
- [89] P. Serp, M. Corrias, and P. Kalck, “Carbon nanotubes and nanofibers in catalysis,” *Appl. Catal. A Gen.*, vol. 253, no. 2, pp. 337–358, Oct. 2003.
- [90] N. S. V. Capanema *et al.*, “Physicochemical properties and antimicrobial activity of biocompatible carboxymethylcellulose-silver nanoparticle hybrids for wound dressing and epidermal repair,” *J. Appl. Polym. Sci.*, vol. 135, no. 6, p. 45812, Feb. 2018.
- [91] E. M. de A. Braz *et al.*, “Modified chitosan-based bioactive material for antimicrobial application: Synthesis and characterization,” *Int. J. Biol. Macromol.*, vol. 117, pp. 640–647, 2018.
- [92] Z. Li, W. Hu, Y. Zhao, L. Ren, and X. Yuan, “Integrated antibacterial and antifouling surfaces via cross-linking chitosan-g-eugenol/zwitterionic copolymer on electrospun membranes,” *Colloids Surfaces B Biointerfaces*, vol. 169, pp. 151–159, Sep. 2018.
- [93] H. Kyoon No, N. Y. Park, S. H. Lee, and S. P. Meyers, “Antibacterial activity of chitosans and chitosan oligomers with different molecular weights.”
- [94] G.-J. Tsai, M.-T. Tsai, J.-M. Lee, and M.-Z. Zhong, “Effects of Chitosan and a Low-Molecular-Weight Chitosan on *Bacillus cereus* and Application in the Preservation of Cooked Rice,” 2006.
- [95] N. Liu *et al.*, “Effect of MW and concentration of chitosan on antibacterial activity of *Escherichia coli*,” 2006.
- [96] G. Georges, “Matériaux hybrides à base de nanoparticules magnétiques et d’alginate Application en tant que bioadsorbant spécifique d’ions métalliques,” Thèse Université saint joseph faculté des sciences, 2018.
- [97] J. Minghou, W. Yujun, X. Zuhong, G. Yucai, I. It, and T.- Methods, “Studies on the M :G ratios in alginate,” *Hydrobiologia*, pp. 4–6, 1955.
- [98] D. E. Clark, H. C. Green, and C. Kelco, “Alginic acid and process of making same,” 1936.
- [99] M. Dumont, “Élaboration et caractérisation de fibres mixtes Alginate / Chitosane,” Dec. 2016.
- [100] K. Niemelä and E. Sjöström, “Alkaline degradation of alginates to carboxylic acids,” *Carbohydr. Res.*, vol. 144, no. 2, pp. 241–249, Dec. 1985.
- [101] A. Haug and O. Smidsrød, “Selectivity of Some Anionic Polymers for Divalent Metal Ions,” *Acta Chem. Scand*, vol. 24, pp. 843–854, 1970.
- [102] K. Y. Lee and D. J. Mooney, “Alginate: Properties and biomedical applications,” *Prog. Polym. Sci.*, vol. 37, no. 1, pp. 106–126, 2012.
- [103] A. Parveen, T. Ali, M. Wahid, and S. Rao, “Facile biological approach for immobilization, physicochemical characterization and antibacterial activity of noble metals nanocomposites,” *Mater. Lett.*, vol. 148, pp. 86–90, 2015.
- [104] S. Shankar, L. F. Wang, and J. W. Rhim, “Preparations and characterization of alginate/silver composite films: Effect of types of silver particles,” *Carbohydr. Polym.*, vol. 146, pp. 208–216, 2016.
- [105] N. Eghbalifam, M. Frounchi, and S. Dadbin, “Antibacterial silver nanoparticles in polyvinyl alcohol/sodium alginate blend produced by gamma irradiation,” *Int. J. Biol. Macromol.*, vol. 80, pp. 170–176, 2015.
- [106] Y. Zhang, Q. Ma, F. Critzer, P. M. Davidson, and Q. Zhong, “Physical and antibacterial properties of alginate films containing cinnamon bark oil and soybean oil,” *LWT - Food Sci. Technol.*, vol. 64, no. 1, pp. 423–430, Nov. 2015.
- [107] C. Acharya, C. R. Panda, P. K. Bhaskara, A. Sasmal, S. Shekhar, and A. K. Sen, “Physicochemical and antimicrobial properties of sodium alginate/gelatin-based silver

Références

- nanoformulations,” *Polym. Bull.*, vol. 74, no. 3, pp. 689–706, 2017.
- [108] E. Diler, “Étude de la corrosion atmosphérique du zinc et zinc-magnésium , en milieu marin” Thèse Université de Bretagne Occidentale, 2014.
- [109] G. Binnig and C. F. Quate, “Atomic Force Microscope,” *Phys. Rev. Lett.*, vol. 56, no. 9, pp. 930–933, 1986.
- [110] F. Détrez, “Nanomécanismes de Déformation des Polymères Semi-Cristallins : Etude In Situ par Microscopie à Force Atomique et Modélisation,” Thèse Université des Sciences et Technologies de Lille, 2008.
- [111] T. J. Moravec and T. W. Orent, “Electron spectroscopy of ion beam and hydrocarbon plasma generated diamondlike carbon films,” *J. Vac. Sci. Technol.*, vol. 18, no. 2, pp. 226–228, Mar. 1981.
- [112] R. Trepos *et al.*, “Antifouling compounds from the sub-arctic ascidian synoicum pulmonaria: Synoxazolidinones A and C, pulmonarins A and B, and synthetic analogues,” *J. Nat. Prod.*, vol. 77, no. 9, pp. 2105–2113, 2014.
- [113] J. F. Briand *et al.*, “Pioneer marine biofilms on artificial surfaces including antifouling coatings immersed in two contrasting French Mediterranean coast sites,” *Biofouling*, vol. 28, no. 5, pp. 453–463, 2012.
- [114] L. D. Chambers *et al.*, “Investigation of *Chondrus crispus* as a potential source of new antifouling agents,” *Int. Biodeterior. Biodegrad.*, vol. 65, no. 7, pp. 939–946, 2011.
- [115] L. Jiao *et al.*, “Preparation, characterization, antimicrobial and cytotoxicity studies of copper/zinc-loaded montmorillonite,” 2017.
- [116] “Surface chemistry changes of weathered HDPE/wood-flour composites studied by XPS and FTIR spectroscopy,” *Polym. Degrad. Stab.*, vol. 86, no. 1, pp. 1–9, Oct. 2004.
- [117] R. S. Vieira, M. L. M. Oliveira, E. Guibal, E. Rodríguez-Castellón, and M. M. Beppu, “Copper, mercury and chromium adsorption on natural and crosslinked chitosan films: An XPS investigation of mechanism,” *Colloids Surfaces A Physicochem. Eng. Asp.*, vol. 374, no. 1–3, pp. 108–114, 2011.
- [118] Y. C. G. Kwan, G. M. Ng, and C. H. A. Huan, “Identification of functional groups and determination of carboxyl formation temperature in graphene oxide using the XPS O 1s spectrum,” *Thin Solid Films*, vol. 590, pp. 40–48, 2015.
- [119] M. Deschatre, B. Lescop, C. S. Colin, F. Ghillebaert, J. Guezennec, and S. Rioual, “Characterization of exopolysaccharides after sorption of silver ions in aqueous solution,” *J. Environ. Chem. Eng.*, vol. 3, no. 1, pp. 210–216, 2015.
- [120] X. Yu *et al.*, “Adsorption of heavy metal ions from aqueous solution by carboxylated cellulose nanocrystals,” *J. Environ. Sci. (China)*, vol. 25, no. 5, pp. 933–943, 2013.
- [121] G. Ertl, R. Hierl, H. Knözinger, N. Thiele, and H. P. Urbach, “XPS study of copper aluminate catalysts,” *Appl. Surf. Sci.*, vol. 5, no. 1, pp. 49–64, 1980.
- [122] E. Cano, C. L. Torres, and J. M. Bastidas, “An XPS study of copper corrosion originated by formic acid vapour at 40% and 80% relative humidity,” *Mater. Corros.*, vol. 52, no. 9, pp. 667–676, Sep. 2001.
- [123] X. F. Sun, C. Liu, Y. Ma, S. G. Wang, B. Y. Gao, and X. M. Li, “Enhanced Cu(II) and Cr(VI) biosorption capacity on poly(ethylenimine) grafted aerobic granular sludge,” *Colloids Surfaces B Biointerfaces*, vol. 82, no. 2, pp. 456–462, 2011.
- [124] M. C. Biesinger, L. W. M. Lau, A. R. Gerson, and R. S. C. Smart, “Resolving surface chemical states in XPS analysis of first row transition metals, oxides and hydroxides: Sc, Ti, V, Cu and Zn,” *Appl. Surf. Sci.*, vol. 257, no. 3, pp. 887–898, 2010.
- [125] K. T. Shalumon, K. H. Anulekha, S. V. Nair, S. V. Nair, K. P. Chennazhi, and R. Jayakumar,

Références

- “Sodium alginate/poly(vinyl alcohol)/nano ZnO composite nanofibers for antibacterial wound dressings,” *Int. J. Biol. Macromol.*, vol. 49, pp. 247–254, 2011.
- [126] W. Wu *et al.*, “Rheological and antibacterial performance of sodium alginate/zinc oxide composite coating for cellulosic paper,” *Colloids Surfaces B Biointerfaces*, vol. 167, pp. 538–543, 2018.
- [127] L. V Trandafilović A, D. K. Božanić, S. Dimitrijević C-Branković, A. S. Luyt, and V. Djoković C, “Fabrication and antibacterial properties of ZnO-alginate nanocomposites,” *Carbohydr. Polym.*, vol. 88, pp. 263–269, 2011.
- [128] R. Jayakumar, P. Sudheesh Kumar, A. Mohandas, V.-K. Lakshmanan, and R. Biswas, “Exploration of alginate hydrogel/nano zinc oxide composite bandages for infected wounds,” *Int. J. Nanomedicine*, vol. 10, no. Supplement 1 Challenges in biomaterials research, p. 53, Oct. 2015.
- [129] H. R. Oxley, P. H. Corkhill, J. H. Fitton, and B. J. Tighe, “Macroporous hydrogels for biomedical applications: methodology and morphology,” vol. 14, no. 14, p. 9, 1993.
- [130] D. Zhitomirsky, J. A. Roether, A. R. Boccaccini, and I. Zhitomirsky, “Electrophoretic deposition of bioactive glass/polymer composite coatings with and without HA nanoparticle inclusions for biomedical applications,” *J. Mater. Process. Technol.*, vol. 209, no. 4, pp. 1853–1860, 2009.
- [131] S. Seuss, M. Lehmann, and A. R. Boccaccini, “Alternating Current Electrophoretic Deposition of Antibacterial Bioactive Glass-Chitosan Composite Coatings,” pp. 12231–12242, 2014.
- [132] J. Karbowniczek *et al.*, “Electrophoretic deposition of organic / inorganic composite coatings containing ZnO nanoparticles exhibiting antibacterial properties,” vol. 77, pp. 780–789, 2017.
- [133] M. Szklarska, G. Dercz, W. Simka, K. Dudek, and O. Starczewska, “Alginate Biopolymer Coatings Obtained by Electrophoretic Deposition on Ti15Mo Alloy,” vol. 125, no. 4, pp. 919–923, 2014.
- [134] I. Santacruz, C. A. Gutiérrez, M. I. Nieto, and R. Moreno, “Application of alginate gelation to aqueous tape casting technology,” *Mater. Res. Bull.*, vol. 37, no. 4, pp. 671–682, 2002.
- [135] F. Yokoyama, T. Fujino, K. Kimura, Y. Yamashita, K. Nagata, and H. Mihashi, “Formation of optically anisotropic alginic acid gels under dc electric fields,” 1998.
- [136] J. García-Torres, C. Gispert, E. Gómez, and E. Vallés, “Alginate electrodeposition onto three-dimensional porous Co-Ni films as drug delivery platforms,” *Phys. Chem. Chem. Phys.*, vol. 17, no. 3, pp. 1630–1636, 2015.
- [137] Q. Chen, L. Cordero-Arias, J. A. Roether, S. Cabanas-Polo, S. Virtanen, and A. R. Boccaccini, “Alginate/Bioglass® composite coatings on stainless steel deposited by direct current and alternating current electrophoretic deposition,” *Surf. Coat. Technol.*, vol. 233, pp. 49–56, 2013.
- [138] A. P. Grosvenor, B. A. Kobe, M. C. Biesinger, and N. S. McIntyre, “Investigation of multiplet splitting of Fe 2p XPS spectra and bonding in iron compounds,” *Surf. Interface Anal.*, vol. 36, pp. 1564–1574, 2004.
- [139] M. Salou, B. Lescop, S. Rioual, A. Lebon, J. Ben Youssef, and B. Rouvellou, “Initial oxidation of polycrystalline Permalloy surface,” *Surf. Sci.*, vol. 602, no. 17, pp. 2901–2906, 2008.
- [140] N. M. Stark and L. M. Matuana, “Surface chemistry changes of weathered HDPE/wood-flour composites studied by XPS and FTIR spectroscopy,” *Polym. Degrad. Stab.*, vol. 86, no. 1, pp. 1–9, 2004.

Références

- [141] P. X. Sheng, Y. P. Ting, J. P. Chen, and L. Hong, "Sorption of lead, copper, cadmium, zinc, and nickel by marine algal biomass: Characterization of biosorptive capacity and investigation of mechanisms," *J. Colloid Interface Sci.*, vol. 275, no. 1, pp. 131–141, 2004.
- [142] D. C. Dominguez, "Calcium signalling in bacteria," *Mol. Microbiol.*, vol. 54, no. 2, pp. 291–297, 2004.
- [143] T. Onoda, J. Enokizono, H. Kaya, A. Oshima, P. Freestone, and V. Norris, "Effects of calcium and calcium chelators on growth and morphology of *Escherichia coli* L-form NC-7," *J. Bacteriol.*, vol. 182, no. 5, pp. 1419–1422, 2000.
- [144] S. Ghayempour, M. Montazer, and M. Mahmoudi Rad, "Tragacanth gum biopolymer as reducing and stabilizing agent in biosynthesis of urchin-like ZnO nanorod arrays: A low cytotoxic photocatalyst with antibacterial and antifungal properties," *Carbohydr. Polym.*, vol. 136, pp. 232–241, 2016.
- [145] M. Safaei and M. Taran, "Optimized synthesis, characterization, and antibacterial activity of an alginate-cupric oxide bionanocomposite," *J. Appl. Polym. Sci.*, vol. 135, no. 2, p. 45682, Jan. 2018.
- [146] J. Díaz-Visurraga, C. Daza, C. Pozo, A. Becerra, C. von Plessing, and A. García, "Study on antibacterial alginate-stabilized copper nanoparticles by FT-IR and 2D-IR correlation spectroscopy," *Int. J. Nanomedicine*, vol. 7, pp. 3597–612, 2012.
- [147] U. Zanzen, L. Bovenkamp-Langlois, W. Klysubun, · Josef Hormes, and · Alexander Prange, "The interaction of copper ions with *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, and *Escherichia coli*: an X-ray absorption near-edge structure (XANES) spectroscopy study," vol. 200, pp. 401–412, 2018.
- [148] M. Rosenberg, H. Vija, A. Kahru, C. W. Keevil, and A. Ivask, "Rapid in situ assessment of Cu-ion mediated effects and antibacterial efficacy of copper surfaces," *Sci. Rep.*, vol. 8, no. 1, p. 8172, Dec. 2018.
- [149] R. C. Selahattin Atmaca, Kadriil Gul, "The effect of zinc on microbial growth," *J. iMedical Sci.*, vol. 28, pp. 595–597, 1998.
- [150] U. Siemann, "Solvent cast technology – a versatile tool for thin film production," *Prog. colloid Polym. Sci.*, vol. 130, pp. 1–14, 2005.
- [151] G. Germanos, S. Youssef, M. Abboud, W. Farah, B. Lescop, and S. Rioual, "Diffusion and agglomeration of iron oxide nanoparticles in magnetic calcium alginate beads initiated by copper sorption," *J. Environ. Chem. Eng.*, vol. 5, no. 4, pp. 3727–3733, 2017.
- [152] M. Matyash, F. Despang, C. Ikonomidou, and M. Gelinsky, "Swelling and Mechanical Properties of Alginate Hydrogels with Respect to Promotion of Neural Growth," *Tissue Eng. Part C Methods*, vol. 20, no. 5, pp. 401–411, 2014.
- [153] A. Mcallister, "Continuous Extrusion of Homogeneous and Heterogeneous Hydrogel Tubes," no. October 2013, pp. 799–801, 2014.
- [154] I. Marinho and C. Bjørge, "Degradation of Calcium Gels of Alginate and Periodate Oxidised Alginate," no. May, 2016.
- [155] L. Benning *et al.*, "Assessment of hydrogels for bioprinting of endothelial cells," *J. Biomed. Mater. Res. Part A*, vol. 106, no. 4, pp. 935–947, Apr. 2018.
- [156] N. Golafshan, R. Rezasani, M. Tarkesh Esfahani, M. Kharaziha, and S. N. Khorasani, "Nanohybrid hydrogels of laponite: PVA-Alginate as a potential wound healing material," *Carbohydr. Polym.*, vol. 176, pp. 392–401, Nov. 2017.
- [157] T. Le Norcy, "Étude et valorisation de composés naturels ou d'analogues de synthèse contrôlant l'adhésion de salissures marines Déplier/Plier.," Thèse.
- [158] M. P. Schultz, J. A. Finlay, M. E. Callow, and J. A. Callow, "A turbulent channel flow

Références

- apparatus for the determination of the adhesion strength of microfouling organisms,” *Biofouling*, vol. 15, no. 4, pp. 243–251, 2000.
- [159] K. Zecher *et al.*, “A multi-step approach for testing non-toxic amphiphilic antifouling coatings against marine microfouling at different levels of biological complexity,” *J. Microbiol. Methods*, vol. 146, pp. 104–114, Mar. 2018.
- [160] G. Borkow and J. Gabbay, “Copper as a Biocidal Tool,” *Curr. Med. Chem.*, vol. 12, p. 2163, 2005.
- [161] E. Pinto, T. C. S. Sigaud-kutner, M. A. S. Leitao, O. K. Okamoto, D. Morse, and P. Colepicolo, “Heavy metal-induced oxidative stress in algae,” *J. Phycol.*, vol. 39, no. 6, pp. 1008–1018, Dec. 2003.
- [162] Daniel Amsterdam, “Susceptibility testing of antimicrobials in liquid media.,” *Antibiot. Lab. Med.*, no. 2014, pp. 52–111, 1996.
- [163] S. Gagneux-Moreaux, “Les métaux (Cd , Cu , Pb et Zn) dans la production des microalgues sur différents milieux de culture : biodisponibilité , bioaccumulation et impact physiologique,” Thèse, 2006.
- [164] F. Fay, G. Horel, I. Linossier, and K. Vallée-Réhel, “Effect of biocidal coatings on microfouling: In vitro and in situ results,” *Prog. Org. Coatings*, vol. 114, pp. 162–172, Jan. 2018.
- [165] W. Wang, X. Li, J. Wang, H. Xu, and J. Wu, “Influence of biofilms growth on corrosion potential of metals immersed in seawater,” *Mater. Corros.*, vol. 55, no. 1, pp. 30–35.
- [166] E. Bardal, J. M. Drugli, and O. Gartland, “The behaviour of corrosion-resistant steels in seawater : a review,” 1993.
- [167] B. J. Little, J. S. Lee, and R. I. Ray, “The influence of marine biofilms on corrosion: A concise review,” *Electrochim. Acta*, vol. 54, no. 1, pp. 2–7, 2008.
- [168] F. J. Martin, S. C. Dexter, M. Strom, and E. J. Lemieux, “Relations Between Seawater Ennoblement Selectivity and Passive Film Semiconductivity on Ni-Cr-Mo Alloys,” *Corros. 2007*, no. 07255, p. Paper 07255, 2007.
- [169] W. H. Dickinson and F. Caccavo, “The Ennoblement of Stainless Steel By Manganic Oxide Biofouling,” *Corros. Sci.*, vol. 38, no. 8, pp. 1407–1422, 1996.
- [170] A. McGaraghan, “Phytoplankton Identification,” 2016. [Online]. Available: <http://oceandatacenter.ucsc.edu/PhytoGallery/sources.html>. [Accessed: 18-Dec-2018].
- [171] “Factsheet -Actinocyclus exiguus.” [Online]. Available: [https://taxonomic.aad.gov.au/keys/diatoms/key/Antarctic Diatoms/Media/Html/Actinocyclus_exiguus.htm](https://taxonomic.aad.gov.au/keys/diatoms/key/Antarctic%20Diatoms/Media/Html/Actinocyclus_exiguus.htm). [Accessed: 09-Nov-2018].
- [172] “Sustain.no: Suborder: Rhizosoleniineae.” [Online]. Available: https://www.miljolare.no/en/artstre/?or_id=1696. [Accessed: 09-Nov-2018].

Titre : Elaboration et caractérisation de biomatériaux antimicrobiens pour des applications dans les domaines médicaux et marins

Mots clés : Alginate, cuivre, zinc, antibactérien, biocompatible, biofilm

Résumé : Le phénomène de biofouling affecte toute surface immergée dans un milieu aqueux, le recouvrant par un biofilm que ce soit dans le milieu médical ou marin. Afin de lutter contre ce phénomène, lors de ce travail, des matériaux biosourcés à base d'alginate ont été élaborés. Pour des applications dans le milieu médical, des films d'hydrogel de surface lisse ou poreuse et des films déposés sur acier par électrophorèse ont été élaborés. La présence de cuivre et zinc sous leur forme ionique Cu^{2+} et Zn^{2+} a été démontrée. Tous les films à base de cuivre et de zinc ont montré des propriétés antibactériennes contre des souches de bactéries pathogènes.

Des volumes d'hydrogel d'alginate à base de calcium, cuivre et zinc ont été aussi élaborés pour des applications dans le monde marin. La stabilité des différents matériaux a été étudiée dans différents milieux et à différentes températures. La propriété antimicrobienne de ces hydrogels a été démontrée sur deux souches de microalgues ainsi que sur quatre souches de bactéries marines sans toxicité. Finalement, le retardement de la formation de biofilms sur la surface d'acier inoxydable a été étudié par la méthode d'OCP en présence de matériaux à base de zinc.

Title : Elaboration and characterization of alginate based biomaterials for applications in the medical and marine fields

Mots clés : Alginate, copper, zinc, antibacterial, biocompatible, biofilm

Abstract : Biofouling is a phenomenon that affects every surface that is immersed in an aquatic medium covering it by a biofilm either in the medical or marine field. In order to prevent this phenomenon, in this work, biosourced alginate materials were elaborated. For applications in the medical field, hydrogel films of smooth or porous surface and films coating stainless steel by electrophoresis were elaborated. The presence of copper and zinc in their ionic form Cu^{2+} and Zn^{2+} was demonstrated. All the copper and zinc based films showed antibacterial properties on pathogenic bacterial strains.

Alginate hydrogels in bulk based on calcium, copper and zinc were also elaborated for applications in the marine field. Stability of the different materials was studied in different mediums and at different temperatures. The antimicrobial property of these hydrogels based on copper and zinc was demonstrated on two microalgae stains as well as on four marine bacteria strains with no sign of toxicity. Finally, the delay in the formation of biofilms on stainless steel surfaces was studied by the OCP method in the presence of zinc based materials.