



HAL
open science

Etude et développement de structures fibreuses non-tissées résistantes à la pénétration bactérienne

Etienne Dessauw

► **To cite this version:**

Etienne Dessauw. Etude et développement de structures fibreuses non-tissées résistantes à la pénétration bactérienne. Autre. Université Paris-Est, 2019. Français. NNT : 2019PESC0014 . tel-02316191

HAL Id: tel-02316191

<https://theses.hal.science/tel-02316191>

Submitted on 15 Oct 2019

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

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



UNIVERSITÉ
— PARIS-EST



Thèse de doctorat

Pour l'obtention du grade de docteur de l'Université Paris-Est

Ecole Doctorale : Sciences, Ingénierie et Environnement

Spécialité : Chimie et Science des Matériaux

Etude et développement de structures fibreuses non-tissées résistantes à la pénétration bactérienne

Présentée par :

Etienne Dessauw

Thèse soutenue le 16 Avril 2019, devant le jury composé de :

Christel Barbaud, Professeur à l'Université Paris Diderot

Rapporteur

Véronique Bennevault, Maître de conférences à Sorbonne Université

Rapporteur

Odile Fichet, Professeur à l'Université de Cergy-Pontoise

Examineur

Éric Lafontaine, Docteur, DGA/DS/MRIS

Examineur

Valérie Langlois, Professeur à l'Université de Paris-Est

Directeur de thèse

Estelle Renard, Professeur à l'Université de Paris-Est

Co-directeur

Remerciements

Les travaux de recherche présentés dans ce mémoire de thèse ont été réalisés au sein de l'équipe Systèmes Polymères Complexes (SPC) de l'Institut de Chimie et des Matériaux Paris-Est (ICMPE) et s'inscrit dans le cadre d'une thèse financée par la Direction Générale de l'Armement (DGA). Ainsi, je tiens à remercier Mr Latroche, directeur de l'ICMPE de m'avoir accueilli au sein de l'institut ainsi que la DGA pour le soutien financier.

Je tiens à remercier également le Professeur Christel Barbaud et le docteur Véronique Bennevault d'avoir accepté de rapporter ce travail, au Professeur Odile Fichet d'avoir bien voulu présider ce jury et enfin au Docteur Eric Lafontaine d'avoir suivi ce travail et accepté de faire partie de ce jury de thèse.

Je souhaite exprimer ma gratitude à mes directrices de thèse, Valérie Langlois (ICMPE) et Estelle Renard (ICMPE) notamment pour leur implication, leur enthousiasme, leur expertise ainsi que les précieux conseils durant ces 3 années.

Je voudrais remercier tous les membres du SPC qui ont participé de près ou de loin à la réalisation de ce travail. Un grand merci à Laurent pour son aide notamment sur la machine d'electrospinning et d'extrusion.

Mes remerciements vont également aux membres du Laboratoire Eau Environnement et Systèmes Urbains (LEESU) de Université Paris-Est et particulièrement au professeur Samir Abbad Andaloussi, pour sa patience et son aide concernant les travaux de biologie.

Je souhaiterais remercier mes collègues thésards ou plutôt amis, qui ont été une source de réconfort pendant cette thèse. Merci à Antoine, Sarra, Azad, Pauline, Viera, Nour, Thibaut, Caroline, Bao...pour tous ces bons moments.

Enfin je tiens à remercier mes parents pour le soutien indéfectible dont ils ont fait preuve toutes ces années ainsi que leurs encouragements constants pour donner le meilleur de moi-même.

A la mémoire de ma tante et de Thomas...

Sommaire

INTRODUCTION GENERALE	1
CHAPITRE I : ÉTUDE BIBLIOGRAPHIQUE	5
Introduction	6
I-1. Les médias filtrants	6
I-1-1. Les masques de protection respiratoire	6
I-1-1-1. Les filtres anti-aérosols	8
I-1-1-2. Les pièces faciales filtrantes anti-aérosols (FFP).....	9
I-1-2. Les mécanismes de filtration.....	10
I-2. Les médias fibreux non-tissés	11
I-2-1. Production des non-tissés	11
I-2-2. Les polymères utilisés dans la fabrication des non-tissés	12
I-2-3. Fabrication des non-tissés	13
I-2-4. Electrospinning.....	14
I-2-4-1. Dispositif et principe de la technique.....	14
I-2-4-2. Les paramètres intrinsèques de la solution	17
I-2-4-3. Les paramètres de l'appareillage	19
I-2-4-4. Les paramètres ambiants.....	20
I-2-5. Mats fibreux à partir de polyhydroxyalcanoates (PHAs).....	20
I-2-5-1. Présentation des PHAs	20
I-2-5-2. Electrospinning des PHAs	23
I-3. Les filtres non-tissés antibactériens	24
I-3-1. Les composés antibactériens	25
I-3-2. Les filtres antibactériens existants.....	26
I-3-3. Utilisation des huiles essentielles	31
I-3-3-1. Composition chimique	31
I-3-3-2. Modes d'action.....	33
I-3-3-3. Quantification de l'activité antibactérienne	34
I-3-4. Encapsulation des molécules issues des huiles essentielles	36
I-3-4-1. Généralités sur les cyclodextrines.....	36
I-3-4-2. Choix des molécules pour l'encapsulation	37
I-3-4-3. Caractéristiques physico-chimiques des complexes d'inclusion à base de cyclodextrine	39
I-3-4-4. Propriétés antibactériennes des complexes d'inclusion	41
Conclusion.....	43
Références	44
Introduction	57
II-1. Etude de l'activité antibactérienne.....	57
II-1-1. Tests de dilution en milieu liquide.....	57
II-1-2. Résultats	59

II-2. Electrospinning de nanofibres à base de PHA incorporant des complexes d'inclusion β-CD/Carvacrol aux propriétés antibactériennes	62
II-2-1. Introduction.....	62
II-2-2. Experimental part.....	64
II-2-3. Results and discussion	66
II-2-3-1. Preparation and characterization of the carv/CD-Inclusion Complexes, carv/CD-IC and polyCD/carv.....	66
II-2-3-2. Elaboration of electrospun materials	72
II-2-3-3. Radical Scavenging Activity and antibacterial activities	74
Conclusion.....	76
Acknowledgment	76
II-3. Références.....	77
CHAPITRE III : ASSEMBLAGE MULTICOUCHES ANTIBACTERIEN A BASE DE CHITOSANE ET DE POLYMERE DE CYCLODEXTRINE.....	83
Introduction	84
III-1. Partie expérimentale	87
III-2. Résultats et discussion.....	90
III-2-1. Dépôt d'une sous-couche d'adhésion de chitosane sur le PP	90
III-2-2. Assemblage couche par couche de chitosane/polymère de cyclodextrine à la surface du PP	96
III-2-3. Etude des activités antiradicalaires et antibactériennes des matériaux multicouches	102
Conclusion.....	104
Références	106
CHAPITRE IV : FONCTIONNALISATION DE SUPPORTS FILTRANT EN POLYPROPYLENE PAR DE L'ACIDE TANNIQUE	108
Introduction	109
IV-1. Greffage de l'acide tannique sur un support en PP par extrusion réactive.....	110
IV-2. Réticulation de l'acide tannique au travers du support médian	117
IV-2-1. Réticulation de l'acide tannique en milieu alcalin	117
IV-2-2. Réticulation d'un dérivé polyméthacrylaté de l'acide tannique	121
IV-3. Greffage de l'acide tannique sur le mat poreux en présence de benzophénone ..	125
Conclusion.....	127
IV-4. Partie expérimentale : matériel et méthodes.....	128
Références	131

CONCLUSION GENERALE 133
Annexes 138

Liste des figures

Figure 1. Appareils de protection respiratoire.....	7
Figure 2. Pièce Faciale Filtrante (a), de demi-masque (b) et de masque complet (c) ¹	8
Figure 3. Principaux mécanismes de filtration des particules : diffusion brownienne (a), interception directe (b), impaction inertielle (c) et attraction électrostatique (d).....	10
Figure 4. Les principaux marchés des non-tissés.....	12
Figure 5. Schéma de l'electrospinning.....	15
Figure 6. Influence de la tension sur la forme du jet de polymère.....	15
Figure 7. Comparaison de la gamme des diamètres de fibres réalisables par electrospinning avec d'autres structures biologiques et technologiques ¹²	16
Figure 8. Images obtenues par MEB de l'évolution de la morphologie de fibres obtenues par electrospinning en fonction de la concentration de la solution de polymère ⁷	17
Figure 9. Granules de PHB dans w. eutropha ⁴⁸ (image MET).....	21
Figure 10. Les différents types de PHA.....	22
Figure 11. Extraction des huiles essentielles par hydrodistillation ¹³⁹	31
Figure 12. Mode d'action des huiles essentielles sur une cellule bactérienne ^{145,172}	34
Figure 13. Les différents types de cyclodextrines.....	36
Figure 14. Microplaque de 96 trous.....	58
Figure 15. Croissance de <i>E. coli</i> (A) et <i>S. aureus</i> (B) pour différentes concentrations de carvacrol.....	59
Figure 16. Croissance bactérienne à 24h pour <i>E. coli</i> et <i>S. aureus</i> en fonction de la concentration de carvacrol.....	61
Figure 17. Chemical structures of carvacrol/CD-Inclusion complex and polyCD/carcvacrol.....	63
Figure 18. Schematic representations (a) electrospinning process (b) formation of PHBHV(carv/CD-IC) in one step (c) formation of 3-layered electrospun [PHBHV-(PolyCD/carv)-PHBHV].....	64
Figure 19. ¹ H NMR spectra (a) CD, (b) carvacrol, (c) carv/CD-IC.....	69
Figure 20. ¹ H NMR spectra of (a) polyCD, (b) polyCD/carv.....	70
Figure 21. XRD patterns of CD (a) and carv/CD-IC (b).....	71
Figure 22. TGA curves of native CD, carv and carv/CD-IC.....	72
Figure 23. XRD patterns of PHBHV nanofibers (a) PHBHV ₉₁ (carv/CD-IC) ₉ (b) and PHBHV ₈₃ (carv/CD-IC) ₁₇ (c).....	74
Figure 24. Absorption spectra at 517 nm in presence of DPPH (A), bacterial Inhibition for (a) PHBHV, (b) PHBHV ₉₁ (carv/CD-IC) ₉ , (c) [PHBHV-(PolyCD/carv)-PHBHV] (B).....	75
Figure 25. Picture of a Sup Air® FFP3 mask (a), the different layers of the mask (b).....	84
Figure 26. Layer by layer assembly based on ionic interactions.....	85
Figure 27. Pictures of the experimental setup (a) and the paint sprayer used (b).....	88
Figure 28. FTIR spectra of PP filter (a), chitosan (b), (PP/CS) _{7Sp} (c), P(CD) (d), [(PP/CS/P(CD))] ₅ (e).....	91
Figure 29. Evolution of the cumulated mass gain (■) and the peak ratio R ₁ (●) of (PP/CS) in function of the number of sprays.....	92
Figure 30. SEM images of a PP (a), (PP/CS) _{imp} (b) PP/CS _{2 spray} (c), and (PP/CS) _{7 spray} (d)....	93
Figure 31. EDX spectra of a PP (a) and (PP/CS) _{7S} (b).....	95
Figure 32. Strategy for functionalizing commercial protection masks with layer-by-layer method.....	96
Figure 33. Influence of final mass gain, R ₁ and R ₂ for the different layer of [PP/CS/P(CD)] _{LMM7.5}	97
Figure 34. MIP profiles of a PP, (PP/CS) _{7 spray} and [PP/CS/P(CD)] _{LMM7.5}	99

Figure 35. Influence of the molar mass of P(CD) solution on mass gain, R ₁ et R ₂ of the [PP/CS/P(CD) _{LMM7.5}] ₅ and [PP/CS/P(CD) _{HMM3}] ₅	100
Figure 36. SEM images and EDX analyses of [PP/CS/ P(CD) _{HMM3}] ₅ (a) and [PP/CS/ P(CD) _{LMM7.5}] ₅ (b)	101
Figure 37. Influence of the concentration of the P(CD)-carv solution and the molar mass on mass gain (MG), R ₁ and R ₂ of [PP/CS/ P(CD) _{HMM3-Carv}] ₅ and [PP/CS/ P(CD) _{LMM7.5-Carv}] ₅	102
Figure 38. Kinetic study of the Radical Scavenger Activity for [PP/CS/P(CD) _{LMM7.5}] ₅ , [PP/CS/ P(CD) _{HMM3-Carv}] ₅ and [PP/CS/ P(CD) _{LMM7.5-Carv}] ₅	103
Figure 39. Antibacterial test of PP, [PP/CS/P(CD) _{LMM7.5}] ₅ and [PP/CS/ P(CD) _{LMM7.5-Carv}] ₅	104
Figure 40. Stratégies d'immobilisation de l'acide tannique sur un mat poreux médian d'un masque commercial.....	110
Figure 41. DTG (A) et TGA curves (B) of thermo-oxidative degradation of AT, PP, PP ₉₀ AT ₁₀ et PP ₈₅ AT ₁₅ DCP ₅	112
Figure 42. Pourcentage d'acide tannique libéré (déterminé par spectroscopie UV-visible) (A) et perte de masse (déterminée par gravimétrie) au cours de l'immersion des échantillons dans le méthanol (B).....	113
Figure 43. Coloring of the solution according to the extraction time in methanol (PP ₈₅ AT ₁₀ DCP ₅ specimens).....	114
Figure 44. Courbe d'étalonnage de l'acide tannique dans le méthanol.....	114
Figure 45. Spectres FTIR de l'acide tannique (a), du PP (b), du PP ₉₀ AT ₁₀ (c) et du PP ₈₅ AT ₁₀ DCP ₅ (d).....	115
Figure 46. Evolution du rapport R3 en fonction du temps d'immersion dans le méthanol ..	116
Figure 47. Formule chimique du bis-tris méthane	118
Figure 48. FTIR spectra of PP (a), AT (b), PP after immersion 88h in bis-tris/tannic acid solution (c) and after 24h of washing in water (d)	119
Figure 49. FTIR spectra of PP (a), tannic acid (b), PP after immersion 88h in tannic acid solution (c) and after 24h of washing in water (d)	120
Figure 50. Synthèse de l'acide tannique polyméthacrylaté (AT-MA)	121
Figure 51. Spectres FTIR de l'acide tannique (a) et du dérivé AT-MA (b).....	122
Figure 52. Spectres RMN ¹ H dans le DMSO de l'acide tannique (a), du GMA (b) et d'un échantillon AT-MA (c) préparé avec 10 équivalents de GEMA par fonction phénol	123
Figure 53. Schéma du procédé de réticulation des dérivés d'acide tannique méthacrylatés (AT-MA) au travers du support médian.....	123
Figure 54. Spectres FTIR du mat en PP (a), du dérivé AT-MA (b) et de l'échantillon réticulé n°5 (c).....	124
Figure 55. Procédé de greffage des dérivés AT-MA en surface du filtre poreux médian.....	126
Figure 56. Spectres d'un mat fibreux natif (a) et du greffage de l'acide tannique en présence de benzophénone (N° 8 après 3 extractions) (b).....	127

Introduction Générale

Introduction générale

La santé et la sécurité sont des enjeux qui suscitent un intérêt grandissant pour l'ensemble de la population mondiale toujours soucieuse des risques de contamination environnementale, chimique, ou biologique auxquels elle pourrait-être soumise. Ces risques sont également au cœur des préoccupations de la santé publique française et mondiale au travers notamment de deux problématiques : les risques d'infections nosocomiales et ceux liés aux bioaérosols de nature infectieuse.

Selon l'organisation mondiale de la santé (OMS)¹, plus de 1,4 millions de personnes dans le monde souffrent d'infections nosocomiales. Plus précisément, dans les pays dits « développés », entre 5 et 10 % des patients admis dans des hôpitaux modernes y contractent une ou plusieurs infections, ce risque étant 2 à 20 fois plus élevé dans les pays dits « en voie de développement ».

Parallèlement aux risques d'infections nosocomiales, les risques d'exposition aux bioaérosols de nature infectieuse ont largement attiré l'attention en raison de leur omniprésence et de leurs impacts sur la santé des individus. En effet, les bioaérosols sont de petites particules en suspension dans l'air (de 0.001 à 100 μm) de nature biologique qui peuvent contenir des organismes vivants. Par conséquent, des microorganismes pathogènes (virus, bactéries, champignons, allergènes...) peuvent exister dans les bioaérosols. Ces derniers se déplacent facilement d'un environnement à un autre, causant des effets néfastes sur l'organisme : allergies, infections et maladies respiratoires. Entre 2000 et 2009, 21 725 cas de peste pneumonique ont été reportés dans le monde dont 1612 morts. En 2013, plus de 20 millions de cas de rougeole ont été détectés, causant la mort de 145 000 personnes². Chaque année selon l'OMS, *Streptococcus pneumoniae* tue environ 500 000 enfants dans le monde entier. En 2015, 1.8 millions de personnes sont mortes de la tuberculose et 480 000 personnes ont développé une tuberculose multi résistante². Ces récentes phases épidémiques encouragent le développement et l'intérêt de nouvelles technologies pour la prévention du risque infectieux aéroporté qui pourrait également être efficace face au risque latent du bioterrorisme.

Jusqu'à maintenant, les masques de protection respiratoires permettent de faire face à différents types de menaces pour l'organisme. Celles-ci peuvent prendre différentes formes : poussières, fibres, vapeurs, aérosols, brouillards, fumée. Cependant, ces protections ne sont pas toutes

efficaces en raison de leur porosité voisine du micromètre. Cette taille de pores est trop grande pour stopper certains virus ou bactéries dont la taille est comprise entre 10 et 100 nanomètres pour les virus et entre 100 nm et 10 µm pour les bactéries. Seuls certains types de masques (FFP2 et FFP3) sont suffisamment efficaces pour stopper les bactéries et les virus et sont actuellement utilisés pour la protection civile dans les cas de hauts risques de transmission.

Cependant, au fur et à mesure de leur utilisation, les masques vont perdre de leur efficacité. Leur durée de vie dépendra de certaines conditions tels que : leur capacité d'absorption ou de filtration, la concentration des contaminants, le rythme respiratoire, les paramètres ambiants (température, humidité). L'évolution de la performance de ces filtres va donc dans le sens d'une augmentation d'efficacité de filtration ainsi qu'une perméabilité suffisante pour laisser circuler le débit d'air voulu dans le but d'augmenter leur confort et leur durée de vie. D'autre part, il n'existe pas à l'heure actuelle de protection respiratoire possédant une protection active contre les bactéries et/ou virus. En effet, l'objectif de notre étude sera d'élaborer un support filtrant capable de limiter sa pénétration au travers du filtre mais également susceptible de pouvoir détruire l'agent pathogène ou empêcher son adhésion.

L'enjeu se retrouve finalement dans l'émergence de nouveaux filtres « fonctionnalisés » capables d'offrir une résistance optimale à la pénétration bactérienne, ainsi qu'une alternative efficace aux moyens déjà existants. Dans ce contexte, la nature chimique, la géométrie et la modification chimique des fibres seront des paramètres pertinents à évaluer pour améliorer les propriétés barrières des substrats fibreux.

Ainsi, cette étude va s'articuler autour de quatre chapitres. Le chapitre I présentera les différents concepts généraux et matériaux nécessaires à la compréhension et à la réalisation de ce travail notamment les différents types de médias filtrants existants et les généralités sur les médias filtrants non-tissés. Nous aborderons également la mise en œuvre des non-tissés, tout en faisant un focus sur la mise en œuvre par électrospinning. Enfin, une synthèse bibliographique des filtres non-tissés antibactériens de manière générale et des différents agents antibactériens existants nous permettra de positionner notre étude par rapport à la littérature existante.

Le chapitre II constitue un des deux axes majeurs de ce travail, à savoir la mise en œuvre de structures fibreuses non tissées antibactériennes par la technique d'électrospinning. Deux méthodes seront décrites afin de créer des structures fibreuses pouvant être, à terme, utilisées pour la filtration des aérosols infectieux. Cette étude sera complétée par la caractérisation

physicochimique des différents matériaux élaborés. Les propriétés anti-adhérentes contre deux souches de bactéries pathogènes seront également évaluées par une étude *in vitro*.

Les chapitres III et IV seront consacrés au deuxième axe d'étude de la thèse, la modification chimique de surface des supports fibreux commerciaux. L'objectif de ces deux chapitres est de proposer des méthodes de fonctionnalisation simples et peu coûteuses. Le chapitre III proposera une méthode de fonctionnalisation, appelée « Layer-by-Layer » à l'aide d'un polymère anionique portant des motifs cyclodextrine et d'un polymère cationique possédant des propriétés antibactériennes *i.e.* le chitosane. L'intérêt d'introduire des cyclodextrines repose sur les capacités de complexation de ces molécules. L'introduction de molécules bioactives dans les cyclodextrines devrait augmenter l'activité des matériaux filtrants.

Le chapitre IV décrira la fonctionnalisation physique et chimique de supports filtrants par un polyphénol végétal, l'acide tannique, dont les propriétés antimicrobiennes sont clairement établies.

- (1) OMS | Pourquoi un Défi mondial sur les infections nosocomiales <https://www.who.int/gpsc/background/fr/> (accessed Feb 28, 2019).
- (2) Kim, K.-H.; Kabir, E.; Jahan, S. A. Airborne Bioaerosols and Their Impact on Human Health. *J. Environ. Sci.* **2018**, *67*, 23–35. <https://doi.org/10.1016/j.jes.2017.08.027>.

Chapitre I : Étude bibliographique

Introduction

Les objectifs principaux de la thèse consistent à développer une structure fibreuse non-tissée résistante à la pénétration bactérienne et, dans un deuxième temps, de fonctionnaliser en surface un masque de protection respiratoire. Le premier chapitre se consacre donc à l'étude bibliographique en vue de réaliser ces deux objectifs. La première partie traite des bactéries et de leurs structures. La deuxième partie s'intéresse aux différents types de médias filtrants et particulièrement aux masques de protection respiratoire (type FFP2 et FFP3) ainsi qu'aux mécanismes de filtration. La troisième partie décrit le processus d'électrospinning, une technique permettant la fabrication de structures fibreuses non-tissées ainsi que les paramètres influençant la mise en œuvre de ces nanofibres. Dans une quatrième partie seront présentés les polymères utilisés pour réaliser les structures fibreuses. Nous nous sommes intéressés aux polyhydroxyalcanoates (PHAs) mais également aux polymères de cyclodextrine afin de pouvoir mettre à profit leurs propriétés de complexation. Enfin dans les parties 5 et 6 nous aborderons les différents composés antibactériens, leur encapsulation dans la cyclodextrine et les propriétés physico-chimiques de ces complexes d'inclusion.

I-1. Les médias filtrants

I-1-1. Les masques de protection respiratoire

Il existe principalement deux grandes familles de protection respiratoire : les appareils filtrants et les appareils isolants. Dans le cadre de cette thèse, nous nous intéresserons uniquement aux appareils filtrants. Un appareil peut être filtrant à l'encontre des poussières, des aérosols, mais également des gaz et vapeurs. Les appareils filtrants peuvent être divisés en deux sous catégories : les appareils « à ventilation libre » dont le passage de l'air est assuré uniquement par les échanges respiratoires du porteur de l'appareil, et les appareils « à ventilation assistée » au moyen d'un moteur (**Figure 1**).

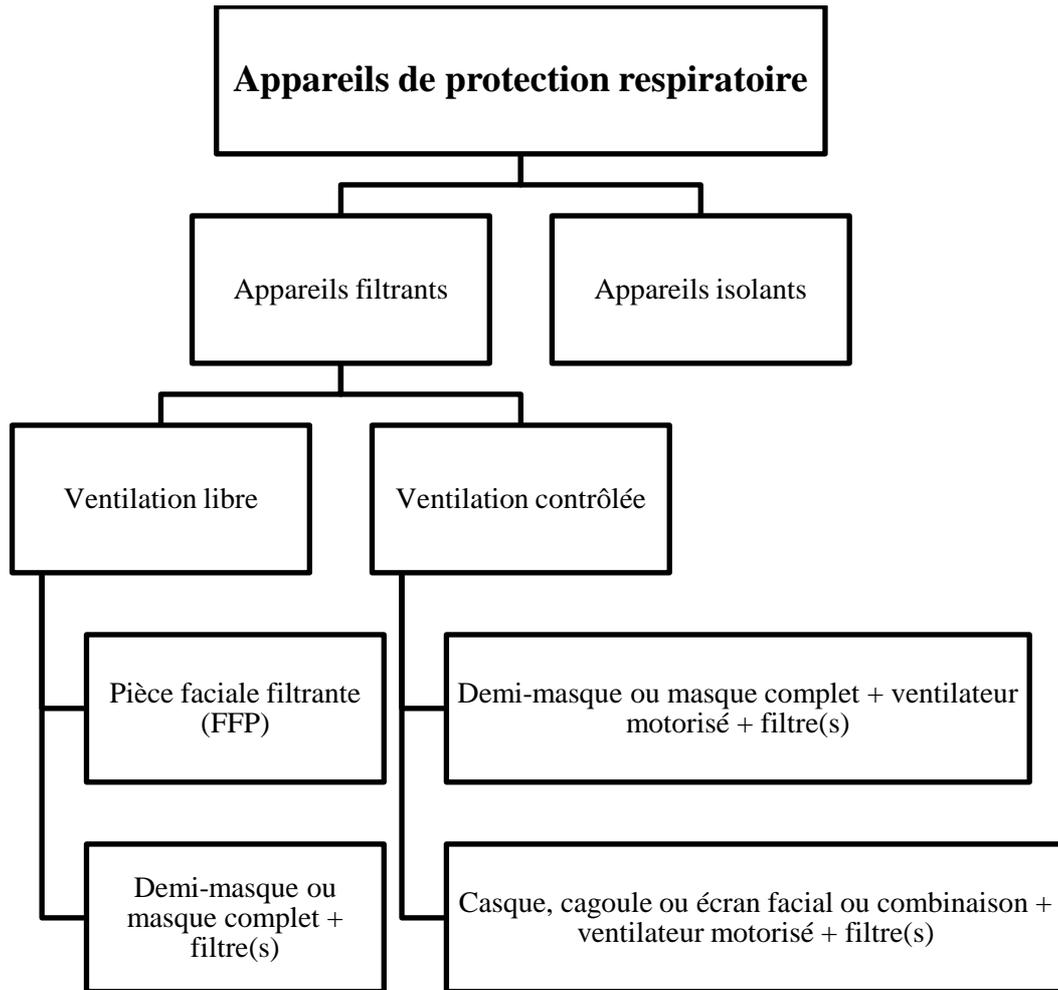


Figure 1. Appareils de protection respiratoire

Les appareils filtrants qui procèdent par épuration de l'air ambiant sont généralement constitués d'une pièce faciale enveloppant les voies respiratoires (nez et bouche). Il en existe de deux sortes : soit la pièce faciale est elle-même filtrante dans la plus grande majorité de sa surface, c'est une « Pièce Faciale Filtrante » (FFP) (**Figure 2a**), soit la pièce faciale est équipée d'un filtre adapté, il s'agit là d'un demi-masque ou d'un masque de protection respiratoire (**Figure 2 b**).

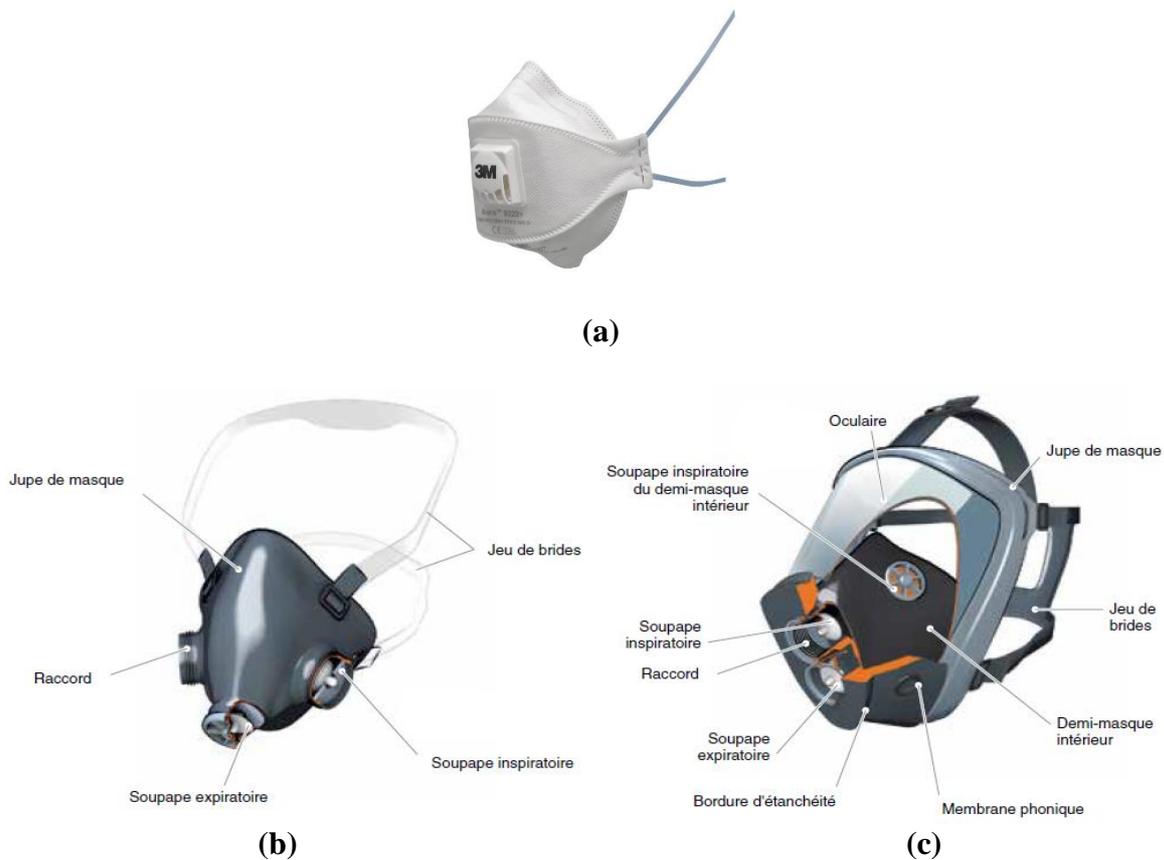


Figure 2. Pièce Faciale Filtrante (a), de demi-masque (b) et de masque complet (c)¹

Nous nous intéressons d'une part aux filtres anti-aérosols intégrés aux demi-masques (ou masques complets) et d'autre part aux pièces faciales filtrantes (FFP).

I-1-1-1. Les filtres anti-aérosols

Selon les normes NF EN 143 et NF EN 143/A1, trois différentes classes de filtres anti-aérosols sont répertoriées : les filtres P1, P2 et P3. Ces filtres correspondants sont différenciés en fonction de leur efficacité de filtration par rapport au chlorure de sodium composé de particules dont le diamètre est de $0.6 \mu\text{m}$ et un aérosol d'huile de paraffine dont le diamètre des particules est de $0.4 \mu\text{m}$. Le filtre P1 possède une efficacité de filtration dite faible de 80 %, le filtre P2 possède une efficacité moyenne de 94 % tandis que le filtre P3 possède une efficacité de filtration haute de 99.95 %. Autrement dit, les masques de protection P1, P2 et P3 ont une pénétration respectivement de 20, 6 et 0.05 %.

Selon les conditions dans lesquelles les masques sont utilisés, les filtres peuvent se colmater et ainsi opposer une résistance au passage de l'air, ce qui aura un impact négatif sur l'efficacité globale du filtre. Plus le colmatage est important plus la gêne respiratoire se fera ressentir et plus l'étanchéité du filtre sera compromise. L'étanchéité du masque est déterminée en mesurant le paramètre de fuite au visage. Ce paramètre, selon la norme, ne doit pas dépasser 2 % pour un demi-masque (NF EN 140) et 0.05 % pour un masque complet (NF EN 136). La relation entre la pénétration d'un aérosol et la fuite au visage permet d'établir un nouveau paramètre : la fuite totale vers l'intérieur correspondant à la pénétration totale des aérosols par le filtre et les joints faciaux.

$$\text{Fuite totale vers l'intérieur (\%)} = \frac{\text{Concentration du contaminant à l'intérieur de la pièce faciale}}{\text{Concentration du contaminant à l'extérieur de la pièce faciale}} \times 100$$

Les caractéristiques pour les différents masques sont reportées dans le **Tableau 1**. L'efficacité globale d'un masque dépend non seulement de l'efficacité du filtre mais également de la fuite au visage.

Tableau 1. Normalisation pour les appareils filtrants équipés de filtres P1, P2 et P3 selon la norme NF EN 140

	P1	P2	P3
Efficacité (%)	80	94	99.95
Fuite au visage (%)	22	8	2.05

I-1-1-2. Les pièces faciales filtrantes anti-aérosols (FFP)

Selon les normes NF EN 149/A1, les propriétés de filtration des demi-masques filtrants sont testées dans les mêmes conditions que les filtres anti-aérosols. Les masques de types FFP sont classés de la même manière selon leur efficacité et la fuite au visage.

Tableau 2. Normalisation pour les pièces faciales filtrantes FFP1, FFP2 et FFP3 selon la norme NF EN 149+A1

	FFP1	FFP2	FFP3
Efficacité (%)	80	94	99
Fuite au visage (%)	22	8	2

I-1-2. Les mécanismes de filtration

Lorsqu'une particule entre en contact avec le média fibreux, différents mécanismes peuvent intervenir afin de piéger les particules à la surface des fibres. Les quatre phénomènes physiques qui peuvent entrer en jeu lors du piégeage de ces particules sont les suivants : la diffusion brownienne, l'interception directe des particules, l'impaction inertielle et l'attraction électrostatique^{2,3} (**Figure 3**).

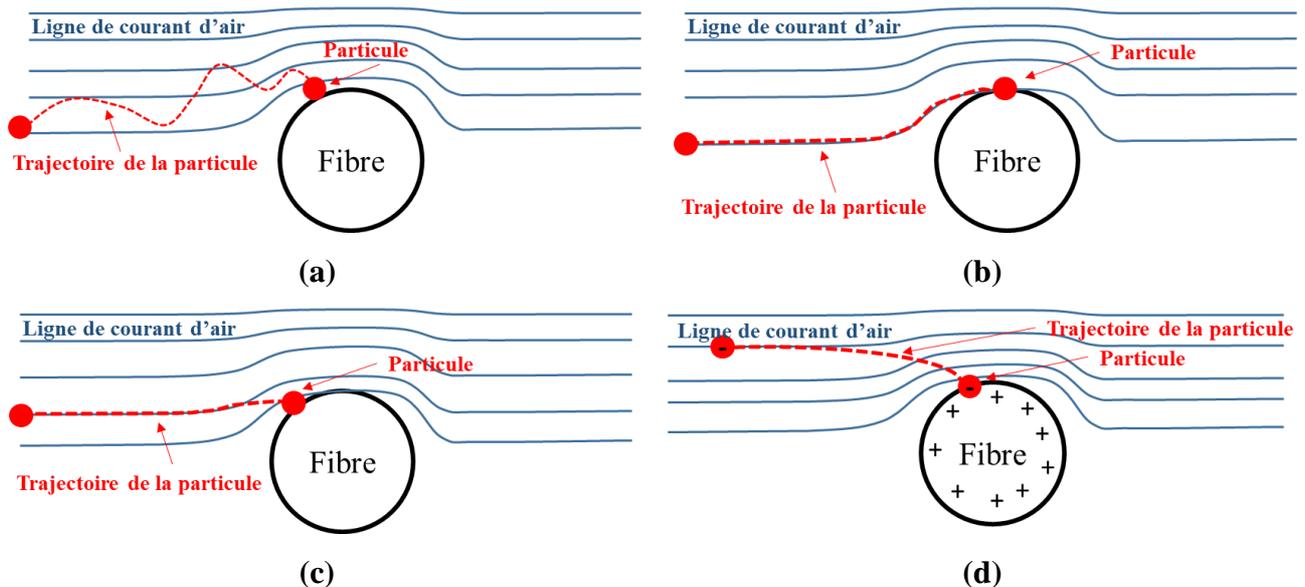


Figure 3. Principaux mécanismes de filtration des particules : diffusion brownienne (a), interception directe (b), impaction inertielle (c) et attraction électrostatique (d)

La diffusion brownienne est basée sur le phénomène de mouvements browniens. Les particules en suspension ne suivent pas les lignes de courant d'air mais rencontrent les molécules d'air et prennent une trajectoire désordonnée et aléatoire (**Figure 3a**). Ce mouvement vibratoire augmente la probabilité que les particules entrent en contact avec la fibre et y restent accrochées par interaction moléculaire faible de Van der Waals. Ce mécanisme permet de piéger des particules dont le diamètre est de l'ordre de $0.1 \mu\text{m}$.

Dans le cas de l'interception directe, les particules suivent les lignes de courant d'air, et lorsque ces particules se situent à une distance inférieure au rayon de la particule, elles sont interceptées directement par la fibre (**Figure 3b**). Ce mécanisme intervient pour des particules de diamètre supérieur à $0.1 \mu\text{m}$.

Le phénomène d'impaction inertielle est similaire à l'interception directe. Néanmoins, dans le cas présent, en raison d'une inertie plus élevée liée à une masse plus élevée, les particules quittent la trajectoire de la ligne de courant d'air et entrent en collision avec les fibres (**Figure 3c**). Ce phénomène concerne les particules d'un diamètre supérieur à 1 μm .

Ce mécanisme est basé sur les interactions électrostatiques qui peuvent exister entre la fibre et la particule. Selon l'état de charge de la fibre et de la particule, différentes interactions électrostatiques peuvent intervenir pour dévier la particule de sa trajectoire et l'attirer vers la fibre à laquelle elle pourra adhérer (**Figure 3d**).

I-2. Les médias fibreux non-tissés

I-2-1. Production des non-tissés

Un non-tissé est « une structure constituée de matières textiles, comme des fibres, des filaments continus ou des fils coupés, quels qu'en soient la nature ou l'origine, formés en voile par un moyen quelconque, et liés par tout moyen, excluant l'entrelacement de fils comme dans le tissage »⁴.

La production des non-tissés a fortement augmenté en Europe ces 20 dernières années. Elle a augmenté de 3.3 % (en volume) pour atteindre 2 395 098 tonnes en 2016. Le chiffre d'affaires total de l'industrie européenne des non-tissés en rouleaux en 2016 est estimé à environ 7,583 milliards d'euros⁵. En 2016, les principaux marchés en termes de volume pour les produits non-tissés en rouleaux étaient les suivants (**Figure 4**) :

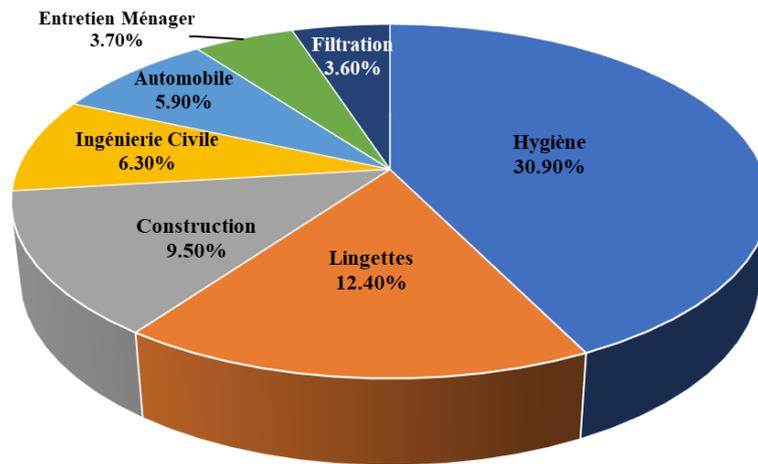


Figure 4. Les principaux marchés des non-tissés

I-2-2. Les polymères utilisés dans la fabrication des non-tissés

Les polymères sont les matières premières utilisées pour la fabrication de fibres pour les non-tissés mais également pour les résines et les additifs qui servent à lier, enduire ou bien à conférer de nouvelles propriétés aux structures fibreuses. La large gamme de polymères existants permet de trouver le bon compromis entre la processabilité, le prix ainsi que les propriétés que l'on veut donner au support (solidité, résistance mécanique, flexibilité, stabilité...) afin d'optimiser ses performances. Le **Tableau 3** liste les différents types de polymères intervenant dans la fabrication des non-tissés ainsi que le produit brut pour lesquels ils sont utilisés (fibres, résines, additifs...). Le choix du polymère utilisé pour concevoir les médias filtrants non tissés dépendra des propriétés que l'on souhaite conférer au média filtrant, de son procédé de production ainsi que son domaine d'application. Les polymères les plus utilisés dans le procédé de mise en œuvre des non-tissés sont le polypropylène, les polyesters et les polyamides.

Tableau 3. Les différents polymères utilisés dans la fabrication des non-tissés⁶

Polymères	Produit brut
Cellulose	Fibre
Polyamide	Fibre
Polyesters	Fibre
Polyéthylène	Fibre
Polypropylène	Fibre
Polyimide	Fibre
Polysulfure de phénylène	Fibre
Polyacrylonitrile	Fibre, latex, précurseur pour les fibres de carbone
Polyuréthane	Fibre par electrospinning, résine
Polytétrafluoroéthylène	Fibre, finition, membrane
Phénol-formaldéhyde	Résine
Polystyrène	Fibres, fibres par electrospinning, résine
Styrène acrylique	Résine latex
Styrène-butadiène	Liant pour latex, revêtement pour fibres de filtres à air
Silicone	Finition pour imperméabilisation
Composés polyvinyliques	Fibre et résine
Polyacétate de vinyle	Résine latex
Alcool polyvinylique	Thermo-assemblage, fibre, résine
Polychlorure de vinyle	Agent ignifugeant, résine latex
Polychlorure de vinylidène	Agent ignifugeant, résine

Selon le procédé de mise en œuvre des structures fibreuses non-tissées, les polymères sont utilisés soit sous forme brute ensuite transformés, ou bien directement utilisés sous forme de fibres. Il existe un grand nombre de techniques de mise en œuvre des structures fibreuses non-tissées à partir de ces polymères.

I-2-3. Fabrication des non-tissés

Les non-tissés présentent un intérêt économique et un cycle de fabrication réduit. Les procédés de mise en œuvre sont maintenant bien maîtrisés et sont largement utilisés dans l'industrie de la filtration. La fabrication des non-tissés est classée selon trois procédés : les procédés par voie humide, les procédés par voie sèche ainsi que les structures composites qui peuvent combiner plusieurs procédés de fabrication afin d'optimiser les caractéristiques des médias filtrants. Par

voie humide, les toiles se forment en milieu aqueux tandis que par voie sèche, les toiles se forment en milieu aérien.

L'électrospinning permet la fabrication de non-tissés. Pour parvenir à des niveaux de filtration élevés, la taille des pores des matériaux filtrants doit correspondre à la taille des particules ou des gouttelettes à capturer. Les nanofibres électrofilées, offrent de nombreuses qualités : une très grande surface spécifique, une bonne interconnectivité des nanofibres, une perméabilité élevée et une taille de pores contrôlable. Elles ont d'ailleurs largement été utilisées dans les applications de filtration d'air et de liquide⁷ (filtres de moteurs, de turbines, filtres à impulsion pour les systèmes de dépolluage, filtres pour aspirateurs⁶).

I-2-4. Electrospinning

L'électrospinning est un procédé de mise en œuvre des polymères qui permet, à partir d'une solution, de fabriquer des structures fibreuses non-tissées, dont la taille des fibres peut atteindre un diamètre variable de l'ordre du nanomètre. Le procédé d'électrospinning remonte au tout début du 20^{ème} siècle où la méthode a été brevetée par J. F. Cooley en 1900⁷. En 1934, Anton Formhals améliora la méthode et un second brevet fut déposé pour la fabrication de fibres textiles⁸. Puis en 1936, C. L. Norton décrit dans un nouveau brevet l'électrospinning à l'état fondu⁹. Cette technique a vu son intérêt scientifique exploser ces 20 dernières années en passant de 9 publications en 2000 à 2898 publications en 2017. Cet intérêt s'explique par le fait que la technique est à la fois simple, économique et reproductible. De plus, elle peut être appliquée aussi bien à la recherche académique qu'à la recherche industrielle dans des domaines variés tels que la filtration, l'ingénierie tissulaire, le biomédical, l'industrie pharmaceutique, agroalimentaire ou textile^{10,11}.

I-2-4-1. Dispositif et principe de la technique

Le dispositif d'électrospinning se décline sous de nombreuses versions, aussi bien artisanales qu'industrielles. Quel que soit le dispositif, il nécessite trois éléments indispensables : un générateur à haute tension, une seringue surmontée d'une aiguille métallique ainsi qu'un collecteur conducteur. Le schéma du dispositif est présenté en **Figure 5**.

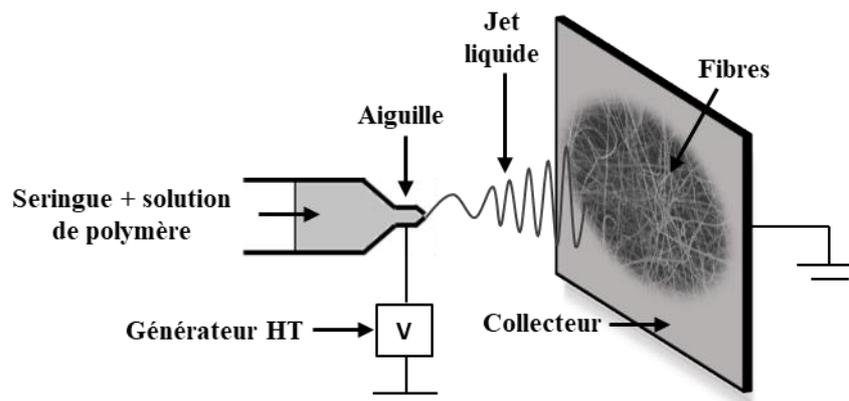


Figure 5. Schéma de l'électrospinning

Le principe consiste à appliquer une haute tension entre l'aiguille de la seringue contenant une solution concentrée en polymère et le collecteur. Ainsi, lorsque la solution de polymère est éjectée, elle sera soumise au champ électrique généré. L'application de charges électrostatiques permet de surmonter les forces de tension de surface des gouttes de polymère en sortie d'aiguille, ce qui conduit à la déformation de la solution, laquelle prend la forme d'un cône de Taylor (**Figure 6**).

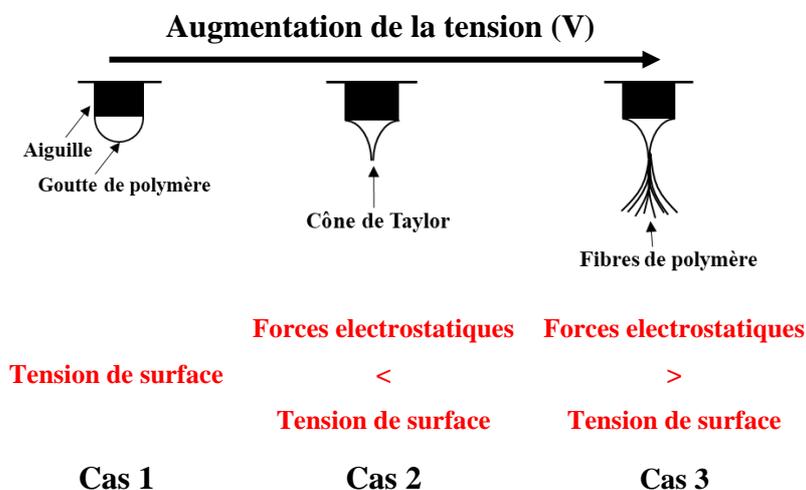


Figure 6. Influence de la tension sur la forme du jet de polymère

Lorsque le champ électrique est élevé (**Figure 6**, cas 3), un jet très fin de polymère est éjecté en sortie d'aiguille et la forte instabilité subie par le jet entraîne son étirement. Il en résulte une évaporation plus rapide du solvant, conduisant ainsi au dépôt d'un voile de nanofibres interconnectées sur le collecteur. Simultanément à l'élongation du jet et à l'évaporation du

solvant, le diamètre du jet de polymère se réduit considérablement de centaines de micromètres à, dans certains cas, quelques dizaines de nanomètres. Les fibres ainsi obtenues sont caractérisées également par une porosité élevée, de petites tailles de pores avec une structure interconnectée, et d'une grande surface spécifique par unité de volume. Cette technique est particulièrement flexible dans le choix des matériaux utilisés mais aussi dans le contrôle de la géométrie de la structure. La **Figure 7** expose la large gamme de diamètres qu'il est possible d'obtenir par la technique d'electrospinning en comparaison avec d'autres structures biologiques ou technologiques.

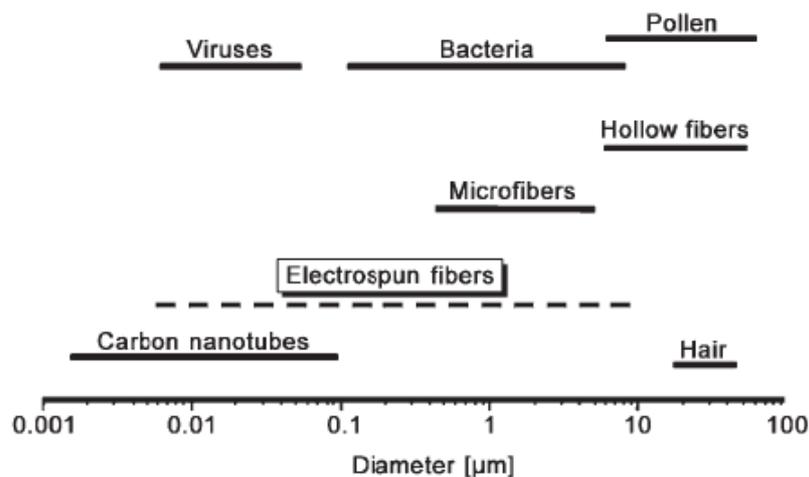


Figure 7. Comparaison de la gamme des diamètres de fibres réalisables par electrospinning avec d'autres structures biologiques et technologiques¹²

La formation de fibres par electrospinning est gouvernée par différents paramètres tels que : la viscosité de la solution, qui dépend de la concentration et de la masse molaire du polymère, la conductivité, la tension de surface et la volatilité du solvant. Les paramètres de l'appareil tels que la tension appliquée, le débit de la seringue, la distance entre l'aiguille et le collecteur, le type de collecteur sont également importants. Enfin, les paramètres ambiants tels que la température et l'humidité peuvent influencer le processus d'electrospinning. Tous ces paramètres ont une influence et la hiérarchisation de leur optimisation va influencer non seulement la formation des fibres mais également leur morphologie. Le diamètre des fibres représente le paramètre essentiel en relation directe avec l'application visée. En effet, plus le diamètre des fibres sera faible, plus les pores du support fibreux seront petits, et plus le mat sera capable de filtrer des particules de petite taille.

I-2-4-2. Les paramètres intrinsèques de la solution

Malgré l'apparente simplicité de ce principe et sa mise en œuvre, l'optimisation de ce procédé s'avère très complexe en raison du nombre de paramètres intervenant de manière synergique ou au contraire de manière antagoniste lors de la mise en œuvre. Il s'agit alors d'établir le meilleur compromis qui permet d'obtenir des fibres de polymère sans défaut.

La concentration de la solution de polymère est un paramètre primordial pour la fabrication de nanofibres. Il existe différentes morphologies possibles en fonction de la concentration de la solution de polymère^{7,13}. Lorsque la concentration est trop faible, la tension de surface est prédominante et produit, à la place des fibres, des micro voire nanoparticules de polymère nommées perles. L'augmentation de la concentration crée une cohésion macromoléculaire entre les chaînes de polymère entraînant l'augmentation de la viscosité et un allongement des perles. Dans ce cas, un mélange de fibres et de perles est obtenu, jusqu'à atteindre une concentration optimale permettant aux fibres de retrouver une bonne morphologie. À des concentrations trop élevées en polymère, la cohésion macromoléculaire entre les chaînes polymères génère une viscosité élevée créant des phénomènes d'instabilité à la pointe de l'aiguille. Du point de vue de la morphologie, les fibres ne sont plus à une échelle nanométrique et ressemblent à des « rubans » de forme hélicoïdale. La **Figure 8** montre l'évolution de la morphologie des fibres avec une augmentation croissante de la concentration de la solution de polymère.

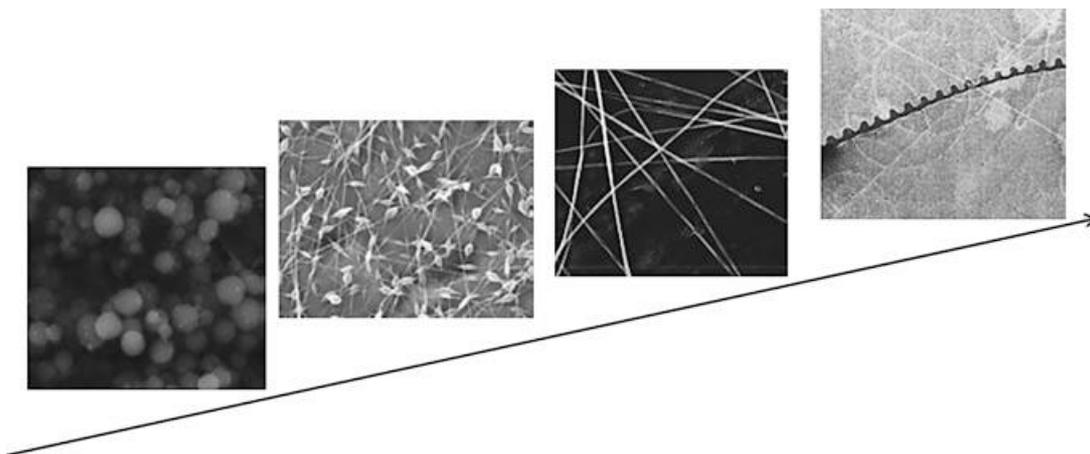


Figure 8. Images obtenues par MEB de l'évolution de la morphologie de fibres obtenues par electrospinning en fonction de la concentration de la solution de polymère⁷

Une augmentation de la concentration de la solution entraîne également une augmentation du diamètre des nanofibres¹³⁻¹⁵. La concentration est étroitement liée à la viscosité ainsi qu'à la masse molaire du polymère. Cette relation concentration/viscosité/masse molaire a été étudiée dans de nombreux cas et pour différents types de polymères¹⁶⁻²⁷. La viscosité permet de déterminer la plage de concentrations à partir de laquelle des fibres continues peuvent être obtenues. Pour chaque système étudié, il existe des valeurs de concentration et de viscosité optimales impactant le processus d'électrospinning et la mise en œuvre de nanofibres ayant la morphologie souhaitée. La masse molaire qui reflète l'enchevêtrement des chaînes de polymère en solution, à savoir la viscosité, a également un effet considérable sur la morphologie des fibres électrospinnées. À concentration fixe, un polymère de masse molaire faible aura tendance à former des perles plutôt que des fibres tandis qu'à masse molaire élevée, il favorisera la création de nanofibres bien définies. Une masse molaire trop importante, en revanche, aura pour effet la formation de fibres de type ruban.

La conductivité électrique de la solution dépend de la nature du solvant ainsi que du polymère. Une augmentation de la conductivité de la solution entraîne une diminution du diamètre des fibres alors qu'une faible conductivité de la solution entraîne une mauvaise élongation du jet de polymère empêchant la formation de fibres homogènes et la création de perles. Ainsi une haute conductivité de la solution est préférable pour favoriser l'électrospinning. Dans certains cas, l'ajout de sels dans la solution est envisageable et améliore également l'électrospinning²⁵.

L'influence de l'interaction entre la tension de surface et les charges électriques sur la modification de la forme d'un fluide viscoélastique joue également un rôle très important²⁸. Les charges électriques sont habituellement portées par les ions, qui peuvent se déplacer à travers le fluide plus rapidement, plus lentement ou proportionnellement avec le changement de la forme du fluide. Pour une quantité fixe de fluide, la répulsion coulombienne entre les ions favorise la création de formes telles qu'un jet, tandis que la tension de surface du fluide favorise la forme sphérique et une surface spécifique plus faible par unité de masse. Lorsque le champ électrique est suffisant, les forces électriques agissent en opposition puis surmontent la tension de surface, et un jet de polymère est formé. Ainsi, en réduisant la tension de surface il sera possible de mettre en œuvre des fibres sans perles. La tension de surface de la solution dépend principalement du type ou de la composition des solvants utilisés, dans le cas d'un mélange de

solvants, par exemple. Une tension de surface plus faible peut parfois permettre l'électrospinning de nanofibres à un champ électrique plus faible²⁹.

I-2-4-3. Les paramètres de l'appareillage

L'application d'une tension électrique est indispensable pour qu'un jet de polymère soit formé. Comme cela a été mentionné précédemment, il est nécessaire que les charges électriques surmontent la tension de surface. Il faut donc appliquer une tension électrique minimale appelée tension seuil pour mettre en route le processus d'électrospinning. Cependant, l'impact de la tension sur la morphologie des fibres reste discutable. L'augmentation de la tension engendre l'augmentation des forces de répulsion électrostatiques et donc la diminution du diamètre des fibres^{11,30-34}. En effet, une tension plus élevée augmente le champ électrique en raison des forces coulombiennes plus importantes dans la solution, ce qui provoque un plus grand étirement du jet. Ces effets entraînent ainsi une réduction du diamètre des fibres. Dans certains cas, l'augmentation de la tension peut faciliter la formation de fibres ayant un diamètre élevé^{15,22} tandis que certains auteurs ne constatent pas d'effet de l'augmentation de la tension³⁵. La majorité des études montre qu'une tension trop élevée favorise la formation de défauts sous forme de perles^{13,15,21,29,31,32,36-38}.

Le débit de la solution de polymère dans la seringue, contrôlé par la pompe, peut également influencer la morphologie des fibres obtenues par électrospinning. Un débit minimum est requis pour que la solution soit éjectée hors de la seringue. Le diamètre des fibres augmente lorsque le débit augmente, et ce jusqu'à une valeur critique de débit qui peut engendrer la formation de défauts sous forme de perles^{11,30,39,40}. En effet, plus le débit est élevé et moins le solvant aura de temps pour s'évaporer en arrivant sur le collecteur. Le débit peut également dans certains cas modifier la morphologie de la surface des fibres³⁹.

De la même manière, la distance entre l'aiguille de la seringue et le collecteur affecte la morphologie des fibres. Plus la distance sera grande (jusqu'à une distance maximale), plus le solvant contenu dans la solution de polymère aura le temps de s'évaporer et plus les fibres déposées sur le collecteur seront homogènes et de bonne morphologie. Une distance trop courte ou trop grande tendrait à induire une structure perlée^{21,26,30,41}.

I-2-4-4. Les paramètres ambiants

La température ou l'humidité sont des paramètres importants à contrôler lors de la mise en œuvre des fibres car la température peut impacter la viscosité de la solution ou l'évaporation du solvant. Une température plus élevée entraîne une diminution de la viscosité et donc du diamètre des fibres⁴². D'autre part, un taux d'humidité faible peut accélérer le processus d'évaporation tandis qu'un taux d'humidité élevé aura tendance à créer des pores à la surface des fibres⁴³. C'est pourquoi, pour éliminer une éventuelle influence des paramètres ambiants sur la morphologie des fibres, il convient de travailler dans une enceinte fermée à température et humidité constantes et contrôlées en permanence.

Le **Tableau 4** montre l'optimisation de quelques paramètres et leurs effets sur la morphologie des fibres.

Tableau 4. Influence des conditions d'électrospinning sur la morphologie des fibres⁴⁴

Paramètres		Effet sur la morphologie	
Voltage appliqué (entre 15 kV et 30 kV)	↑	Diamètre des fibres	↓
Débit (entre 0.5 et 3 mL.h ⁻¹)	↑	Diamètre des fibres	↑
Distance aiguille/collecteur (entre 15 et 25 cm)	↑	Diamètre des fibres	↓
Concentration en polymère	↑	Diamètre des fibres	↑
Conductivité de la solution	↑	Diamètre des fibres	↓
Volatilité du solvant	↑	Génération de pores en surface des fibres ³⁹	

I-2-5. Mats fibreux à partir de polyhydroxyalcanoates (PHAs)

Dans le contexte environnemental et économique actuel, les matériaux issus des ressources renouvelables sont de plus en plus attractifs. Ces matériaux représentent un substitut aux matériaux issus des ressources pétrolières. Les recherches portent sur le développement des polymères biosourcés selon deux voies : soit par la production directe de polymères par la biomasse ou bien par la production de monomères issus de la biomasse suivie de leur polymérisation ultérieure par voie chimique ou biotechnologique. Les polyhydroxyalcanoates (PHAs) font partie des biopolymères obtenus par biotechnologie.

I-2-5-1. Présentation des PHAs

Les poly(3-hydroxyalcanoates) (PHAs) sont une classe de polyesters naturels biodégradables, biocompatibles et non toxiques, obtenus à partir des bactéries lorsque celles-ci sont soumises à des carences énergétiques et nutritionnelles^{45,46} (**Figure 9**). Les PHAs, et plus particulièrement

le poly(3-hydroxybutyrate), a été découvert en 1926 par Maurice Lemoigne en tant que matériaux de stockage de carbone et d'énergie au sein des cellules bactériennes *Bacillus megatherium* et *Bacillus mesentericus vulgatis* ⁴⁷.

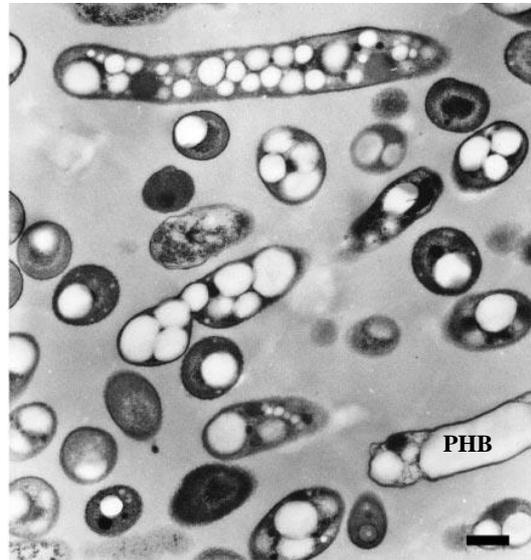


Figure 9. Granules de PHB dans *w. eutropha*⁴⁸ (image MET)

À partir de divers substrats, une grande variété de PHAs peut être synthétisée et ils se distinguent notamment par la longueur de leurs chaînes latérales⁴⁹. Il existe les PHAs à chaînes courtes (PHA « Short Chain Length » ou PHA_{SCL}), les PHAs à chaînes moyennes (PHA « Medium Chain Length » ou PHA_{MCL}) et les PHAs à chaînes longues PHA « Long Chain Length » ou PHA_{LCL} (**Figure 10**). Les différences structurelles des PHAs vont influencer les propriétés thermiques et mécaniques de ces polyesters.

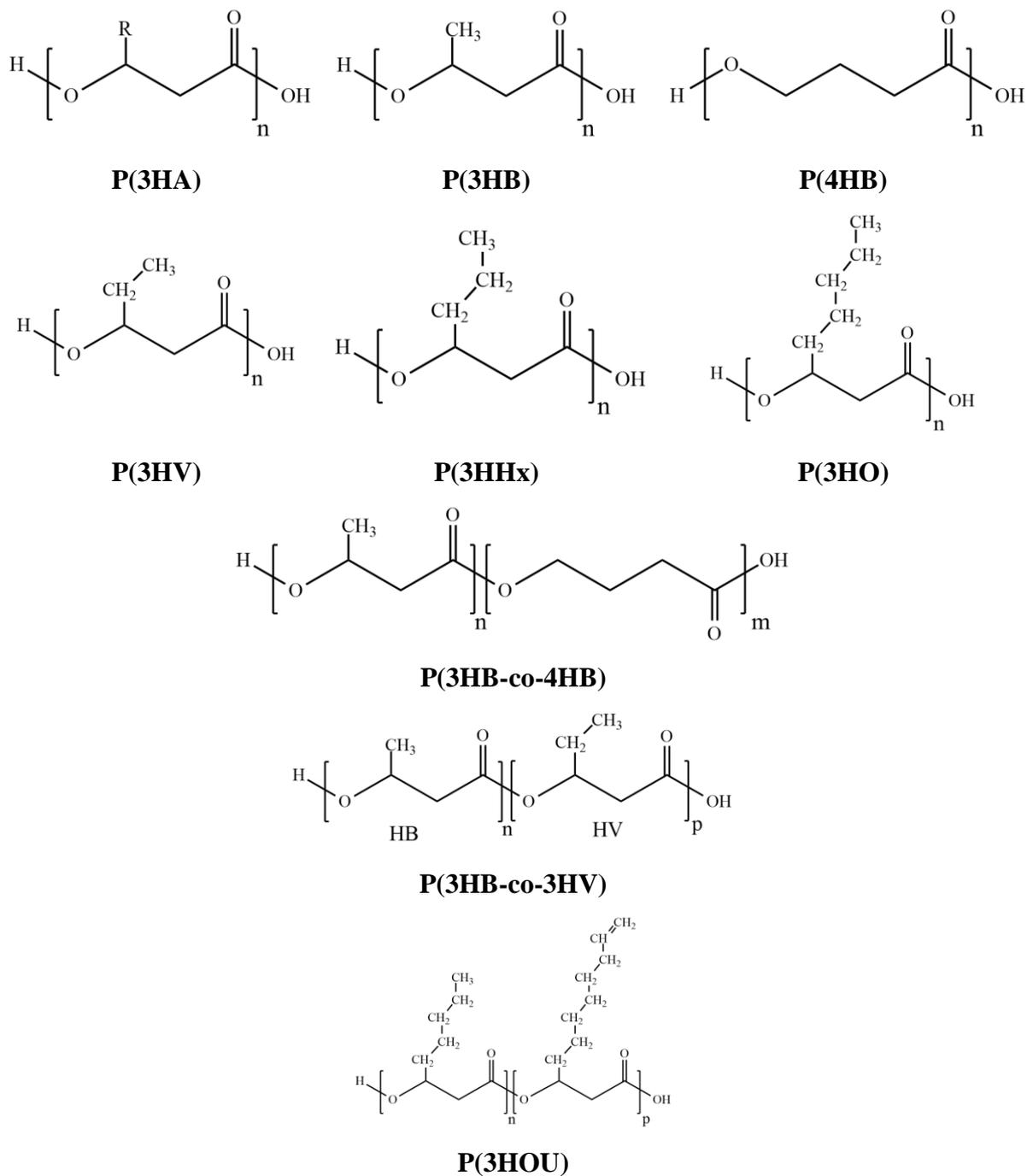


Figure 10. Les différents types de PHA

Les PHAs à chaînes courtes possèdent des chaînes latérales alkyles ayant 3 à 5 atomes de carbone. Dans la catégorie des PHA_{SCL} on retrouve principalement le poly(3-hydroxybutyrate) (PHB) et les copolymères poly (3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalérate) (PHBHV). Ce sont

des polymères cristallins, plutôt rigides et cassants ayant une température de fusion élevée (160-180 °C) et une température de transition vitreuse basse (entre -5 et 0 °C).

Les PHAs à chaînes moyennes (PHA_{MCL}) possèdent de 6 à 14 atomes de carbone sur leurs chaînes latérales. Les PHA_{MCL} sont quant à eux des élastomères thermoplastiques ayant une faible cristallinité ainsi qu'une faible résistance à la traction avec un allongement à la rupture élevé. Les PHAs à longues chaînes (PHA_{LCL}) sont composés de plus de 14 atomes de carbone sur leurs chaînes latérales.

I-2-5-2. Electrospinning des PHAs

Grâce à leur biocompatibilité et à leur biodégradabilité, les PHAs se sont avérés être d'excellents candidats pour des applications médicales, notamment dans les dispositifs biomédicaux, les systèmes de transport de médicaments ou les supports pour l'ingénierie tissulaire⁵⁰⁻⁵⁵. En effet dans le domaine de l'ingénierie tissulaire, les PHAs peuvent être utilisés pour la fabrication de supports de remplacement de la matrice extracellulaire naturelle. Lorsque les tissus sont dégradés, ces biomatériaux présentent un environnement idéal pour que les cellules-hôtes se réorganisent, se développent et resynthétisent une nouvelle matrice naturelle. Les biomatériaux, préparés par electrospinning, présentent une structure poreuse favorable à l'adhésion et la prolifération cellulaire.

Une liste non exhaustive de l'utilisation des PHAs pour la technique d'electrospinning est présentée dans le **Tableau 4**. Le PHB et le PHBHV sont largement utilisés pour l'electrospinning des PHA et particulièrement pour les applications telles que l'ingénierie tissulaire et l'emballage alimentaire. L'intérêt d'electrospinner des PHAs pour l'ingénierie tissulaire est de pouvoir obtenir des structures biocompatibles avec une porosité et une taille de pore variables. En effet, la régénération des tissus est dépendante de ces deux paramètres. Une grande surface favorisera l'attachement et la prolifération des cellules, alors qu'un grand volume poreux sera nécessaire pour accommoder et fournir une masse cellulaire suffisante, essentielle à la réparation des tissus. La porosité et l'interconnectivité sont également essentielles à la diffusion des nutriments et des gaz ainsi qu'à l'élimination des déchets métaboliques résultant de l'activité cellulaire⁵⁶. Le **Tableau 4** montre que peu de travaux récents sont consacrés à l'étude de l'electrospinning des PHAs pour des applications de filtration de manière générale^{57,58}. Dans notre cas, la technique d'electrospinning permettra la

création de supports fibreux filtrant qui intégreront des composés antibactériens destinés à la filtration des aérosols bactériens.

Tableau 5. Liste non exhaustive des différents PHAs mis en forme par electrospinning et leurs applications

Types de PHA	Applications
PHB/PHBHV	Filtration de l'eau ⁵⁷ , administration de médicaments ⁵⁹ , emballage alimentaire ⁶⁰⁻⁶⁴ , ingénierie tissulaire ⁶⁵⁻⁷⁴ , matériau fonctionnel ⁷⁵
P(3HB-co-4HB)	Mats fibreux composites ⁷⁶ , système d'administration de médicaments ⁷⁷ , applications biomédicales ⁷⁸
P(3HB)/P(3HB-4HB-3HV)	Ingénierie tissulaire ⁷⁹
PHHx	Pansements ⁸⁰
PHBHHx/PHOU	Ingénierie tissulaire ^{72-74,81}
Copolymère PHA à partir de glycérol et acide lévulinique	Applications biomédicales ⁸²
PHA	Membranes de filtration ⁵⁸

I-3. Les filtres non-tissés antibactériens

Les filtres ou les masques de protection ne sont pas naturellement antibactériens. Néanmoins, de part leur structure fibreuse aléatoire, interconnectée et poreuse, ils permettent le piégeage des bio-aérosols de type bactérien. Dans certains cas, il est possible d'ajouter des agents antibactériens afin de protéger le filtre en inhibant la croissance bactérienne ou d'empêcher leur migration dans le filtre. Le composé antibactérien peut être appliqué soit sur la fibre brute, soit incorporé au matériau final. Dans un premier temps, nous présenterons succinctement les différents types de composés antibactériens et ensuite nous discuterons de l'utilisation de certains ou de certaines catégories de composés, notamment les huiles essentielles, dans la modification des masques de protection existants.

I-3-1. Les composés antibactériens

Il existe un grand nombre de composés dont les propriétés antibactériennes sont avérées. De manière générale, les composés sont classés selon deux catégories : d'une part les composés organiques et de l'autre les composés inorganiques.

La catégorie des composés inorganiques regroupe les particules métalliques et les céramiques. Entrent dans cette catégorie, les particules d'argent, les oxydes de cuivre, de zinc, de magnésium, de titane et de fer ou encore les oxydes de calcium. Il faut y ajouter la montmorillonite et l'hydroxyapatite. Toutes ces particules présentent une aptitude importante à lutter contre une multitude de bactéries, de virus et de champignons⁸³. Cependant, certains de ces composés ne pourront pas être exploités dans le cadre de cette étude car ils ne sont pas adaptés à l'application envisagée. L'utilisation de nanoparticules métalliques présente un risque sanitaire important puisqu'elles sont susceptibles d'être inhalées.

Les composés organiques regroupent tous les produits issus de la synthèse chimique tels que les antibiotiques ou les polymères de synthèse, mais également les produits d'origine naturelle comme la plupart des antibiotiques, les peptides, les polymères biosourcés et les huiles essentielles.

Les peptides antimicrobiens regroupent un vaste ensemble de molécules, diverses et variées, isolées de divers organismes animaux et végétaux, qui sont produites par de nombreux types cellulaires. Ils constituent la première ligne de défense naturelle de tous les organismes contre les invasions pathogènes⁸⁴.

Les polymères bactéricides incluent notamment les polymères possédant des groupements ammoniums quaternaires, les polymères contenant de la guanidine, ceux mimant les peptides naturels, les polymères halogénés ainsi que les polymères contenant des dérivés phosphates et sulfates⁸⁵. Le chitosane, polymère biosourcé, possède également des propriétés antibactériennes avérées^{83,86,87}. Nous focaliserons notre étude sur les huiles essentielles.

I-3-2. Les filtres antibactériens existants

Bien que la littérature se soit largement intéressée aux filtres antibactériens de manière globale, relativement peu de travaux recensent les filtres antibactériens non-tissés et leur utilisation pour la filtration de l'air ou des aérosols. Il existe principalement deux méthodes pour créer ou rendre un filtre antibactérien : l'électrospinning sur un support fibreux non-tissé commercial et la modification chimique du support fibreux non tissé. Une liste non exhaustive des travaux recensés sur les filtres antibactériens est présentée dans le **Tableau 6**, ainsi que le type de polymère utilisé, le support utilisé s'il y a, l'agent antibactérien ainsi que la méthode d'incorporation et enfin les applications potentielles.

La méthode la plus répandue est l'électrospinning de nanofibres de polymères incorporant des nanoparticules à caractère antibactérien avec ou sans la présence de supports non-fibreux commerciaux. En effet, beaucoup de travaux décrivent les très bonnes propriétés antibactériennes de filtres à base de nanofibres de PVC⁸⁸, acétate de cellulose, polyacrylonitrile (PAN)⁸⁸⁻⁹², de poly(méthacrylate de méthyle)⁹³, polyuréthane⁹⁴⁻⁹⁶, PVA⁹² ou encore de polyamide⁹⁷⁻⁹⁹ incorporant des particules d'argent. On retrouve néanmoins très peu de travaux sur l'élaboration de filtres antibactériens à partir de PHA¹⁰⁰. L'autre méthode regroupe donc toute modification chimique (adsorption, imprégnation, pulvérisation, greffage, layer by layer, ...) qui intervient pendant ou après la mise en œuvre industrielle des filtres¹⁰¹⁻¹²².

Plusieurs brevets déposés décrivent la fabrication ou la modification de masques de protection respiratoire ayant une double action : filtrante et antibactérienne/antivirale. Pour y parvenir, de nombreuses techniques sont utilisées : soit l'ajout de certains composés comme la chlorhexidine, la chlorure ou bien un halogène antiseptique¹²³, soit l'imprégnation du masque dans de la cellulose greffée préalablement avec du styrène sulfonate¹²⁴, soit l'imprégnation dans des polymères de types ammonium¹²⁵⁻¹²⁷ soit encore le traitement de masque de type FFP2 à l'aide d'acides et de bases qui les rendent antibactériens^{128,129}.

D'autres auteurs font état de masques aux propriétés antibactériennes et/ou antivirales, grâce à l'usage de produits naturels issus des plantes et plus particulièrement issus de la graminée *Sasa*¹³⁰ ou du thé (polyphénol, catéchines et théaflavines)^{131,132}. Etant donné l'abondance de molécules issues des huiles essentielles, et connaissant leurs propriétés antibactériennes avérées, il serait intéressant de se tourner vers ce type de molécules pour l'amélioration des

masques de protection, plus précisément par l'encapsulation et l'incorporation dans les masques de protection ou par la fonctionnalisation de surface à l'aide de ces molécules.

Tableau 6. Liste non exhaustive des différents types de filtres antibactériens

Polymère(s)	Agent antibactérien	Méthode	Incorporation	Applications
Acétate de Cellulose PAN PVC PA 6 PU PMMA	Nanoparticules d'argent	Electrospinning	Dispersion ou génération <i>in-situ</i> des nanoparticules	Filtre antibactérien ⁸⁸ , filtration des aérosols ^{90,99} , filtre à air/eau ⁹⁶⁻⁹⁸ , protection respiratoire ⁹¹ , biomédical ^{93,97} , antifouling ⁹⁶
PVA PAN	Particules d'argent + chitosan ou amidoxime	Electrospinning	Dispersion ou fonctionnalisation	Filtre à air/eau ^{89,92}
PU	Nanoparticules d'argent + cendres ou charbon actif	Electrospinning	Dispersion	Épuration de l'eau ⁹⁵ , filtre à air ⁹⁴
PET Polyester	Nanoparticules Ag/Cu ou AgO/CuO Encapsulation de nanoparticules d'argent avec des polyélectrolytes anioniques	Non-tissé	Greffage de dendrimères Imprégnation Méthode « layer by layer »	Épuration de l'eau ^{101,114} Filtre à air ¹¹⁵
PP/PLA PP PP/PE PHA PLA	Silicate de cuivre	Non-tissé	Dispersion	Matériaux filtrants bioactifs, équipements sanitaires ¹¹²
PAN	Hypochlorite de calcium	Electrospinning	Dispersion	Filtre à eau ¹³³

PLA	Nanoparticules de TiO ₂	Electrospinning	Dispersion	Filtre à air, protection respiratoire ¹³⁴
PVP	Extrait de plantes	Electrospinning, filtre ou non tissé	Dispersion	Filtre à air ^{104,118,135} , Filtration des aérosols ^{102,117} , protection respiratoire ¹⁰⁸
PET			Nébulisation/pulvérisation/ electrospraying sur support	
PP			Imprégnation	
PU	Extrait de plantes et nanoparticules ZnO/TiO ₂			Filtre à air ¹⁰⁷
PP/PET	Triclosan	Non-tissé	Imprégnation/pulvérisation microsphères de PLA contenant le triclosan	Filtre à air, protection respiratoire ¹⁰³
PP	1-chloro-2,2,5,5-tetramethyl-4- imidazolidinone	Non-tissé	Imprégnation	Protection respiratoire, vêtements de protection et filtre à air ¹⁰⁹
PVA	Chitosan	Membrane	Séparation de phases	Filtre à air ¹²¹
PP	Liquide ionique	Non-tissé	Photogreffage en surface	Épuration de l'eau ¹⁰⁵
PLA/PHB	Liquide ionique	Electrospinning	Dispersion	Filtration des aérosols ¹⁰⁰
PP	Polyélectrolytes anionique et cationique de N-halamine	Non-tissé	Layer by layer	Filtres à air, protection respiratoire, produits hygiéniques et emballage alimentaire ¹¹⁰

PP	Alkylammonium	Non-tissé	Support poreux en bioperlite contenant le biocide	Protection respiratoire ¹¹¹
PP	Tensioactifs Gémini	Non-tissé	Lors de la mise en œuvre des non-tissés	Protection respiratoire ¹⁰⁶
PLA	Homopolymère d'Acétate de N-halamine ou N-halamine	Non-tissé	Imprégnation	Filtres, emballage alimentaire, produits hygiéniques, lingettes et textile médical ¹¹⁶ , filtration des aérosols ¹²²
PVA	Argile/Séricine	Electrospinning	Dispersion	Protection respiratoire ¹³⁶
Cellulose	Chlorhexidine digluconate	Papier, bandage à usage médical	Fonctionnalisation de surface	Applications médicales ¹¹⁹
PP PP/PAN PP/fibres acryliques Polyesters	Biocides industriels et nanoparticules d'argent	Non-tissé	Non renseigné	Protection respiratoire ¹¹³
Filtre à sable de quartz	Chlorure de chitosan et oxyde de graphène	Filtre	Imprégnation	Épuration de l'eau ¹²⁰

I-3-3. Utilisation des huiles essentielles

Les huiles essentielles (HE) constituent un réservoir extrêmement riche de molécules antimicrobiennes. Si l'activité bactéricide de ces huiles est connue depuis l'antiquité, leur étude s'est intensifiée depuis une vingtaine d'années. Le nombre de publications consacrées à leurs compositions, leurs propriétés biologiques et la diversité de leurs composés ne cessent également de croître depuis plusieurs années.

La commission de la pharmacopée européenne définit l'huile essentielle comme étant « un produit odorant, généralement de composition complexe obtenue à partir d'une matière première végétale botaniquement définie, soit par entraînement à la vapeur d'eau, soit par distillation sèche (**Figure 11**), soit par un procédé mécanique propre, sans chauffage. L'huile essentielle est le plus souvent séparée de la phase aqueuse par un procédé physique n'entraînant pas de changement significatif dans sa composition »¹³⁷. Cette définition est proche de celle de la norme ISO 9235:2013¹³⁸.

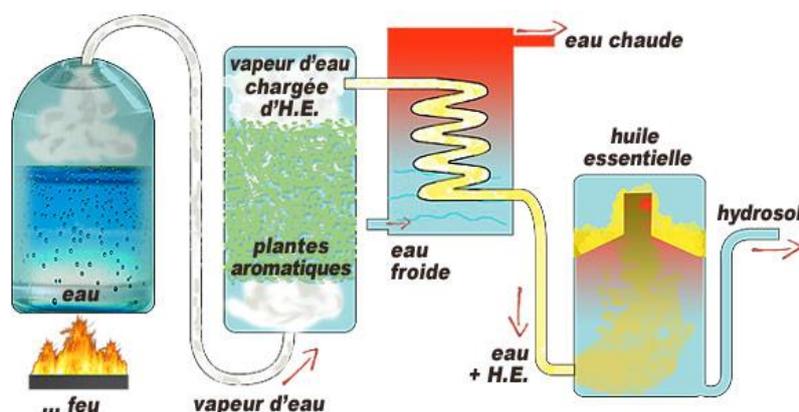


Figure 11. Extraction des huiles essentielles par hydrodistillation¹³⁹

I-3-3-1. Composition chimique

La composition chimique est complexe et varie d'une huile essentielle à une autre. Elle dépend notamment du lieu, de la période de récolte, du stade de développement des plantes et des organes prélevés (fleurs, bourgeons, graines, feuilles, brindilles, écorces, bois, fruits, racines). Malgré cette extrême diversité, les composants actifs sont les terpènes et les composés phénoliques présents en grande quantité dans les extraits végétaux et dans les HE¹⁴⁰⁻¹⁴⁴, mais il est également possible d'y retrouver une variété d'esters, d'aldéhydes, de cétones, d'acides et d'alcools. Les huiles essentielles les plus étudiées ainsi que leurs compositions respectives sont présentées dans le **Tableau 7**.

Tableau 7. Différentes huiles essentielles et leurs constituants principaux

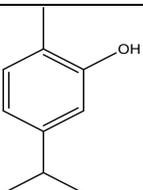
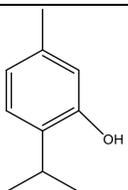
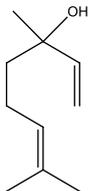
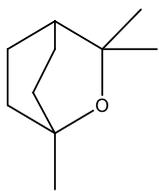
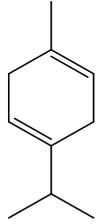
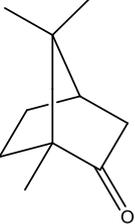
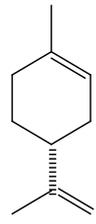
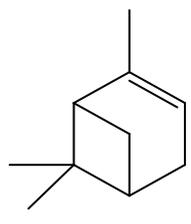
Plantes	Constituants principaux	Références
Cannelle	Cinnamaldéhyde (65 à 76 %) Coumarine (10.6 %) Alcool Cinnamique (3 %)	84,141,145,146
Citronnelle	Citral A (37.8 à 45.7 %) Citral B (33.2 %) Myrcène (3.9 %)	141,147
Thym	Thymol (10 à 64 %) Carvacrol (2 à 11 %) γ -terpinène (2 à 31 %) p-Cymène (17 %)	84,141,146,147 148 149,150 151,152
Menthe poivrée	p-menthone (19.5 %) Menthol (63.5 %)	141
Arbre à thé	γ -terpinène (17.7 %) Terpinen-4-ol (42.5 %)	141
Coriandre (graines)	Linalol (73.2 %)	84,141,145,153
Coriandre (Feuilles immatures)	Linalol (26 %) (E)-2 -décanal (20 %)	84,141,145,153
Lavande (aspic)	1,8-cinéole (23.7 %) Linalol (46.3 %) Camphre (17.1 %)	141
Lavande (officinale)	Linalol (30.1 %) Acétate de linalyle (36.6 %)	141
Romarin	α -pinène (2 à 25 %) 1,8-cinéole (23.5 %) Camphre (2 à 20 %) Acétate de bornyle (0 à 17 %)	84,141,151,154,155
Eucalyptus	1,8-cinéole (74.3%) α -terpinéole (10.3%)	141
Citron	Limonène (83.1 %)	141
Origan	Carvacrol (1 à 80%) Thymol (1 à 64 %) γ -terpinène (2 à 52 %) p-cymène (traces à 52 %)	84,145,156,157 158,159 160,161 151,162,163
Sauge	Camphre (6 à 15 %) α -pinène (4 à 5 %) β -pinène (2 à 10 %) 1,8-cinéole (6 à 14 %) α -thujone (20 à 42 %)	84,163
Clou de girofle	Eugénol (64 à 85 %) Acétate d'eugényle (8 à 17 %) Caryophyllène (14.5 %)	84,147,164

Dans ce tableau non exhaustif, les constituants que l'on retrouve le plus fréquemment dans les huiles essentielles sont : le linalol, le 1-8 cinéole (ou eucalyptol), le γ -terpinène, le camphre, le carvacrol, le limonène, le thymol et l' α -pinène. Les valeurs consignées dans le **Tableau 7** illustrent la diversité de composition des différentes HE. En effet, si les molécules sont

communes, les proportions massiques diffèrent d'une plante à une autre ce qui complexifie l'utilisation de ces mélanges.

Ces constituants sont, d'après les études, ceux qui confèrent aux huiles essentielles leur pouvoir antibactérien. Il est possible de classer ces composés selon deux catégories (**Tableau 8**) : les composés phénoliques et les composés terpéniques. Ils peuvent être utilisés sous leur forme pure dans de nombreux domaines comme l'industrie alimentaire, la cosmétique, la parfumerie ou la médecine. De nombreux travaux ont notamment été menés sur les propriétés antibactériennes, antifongiques, antivirales et antioxydantes^{140-144,165-171}.

Tableau 8. Les constituants principaux des huiles essentielles

Composés phénoliques					
					
<i>carvacrol</i>					<i>thymol</i>
Composés Terpéniques					
					
<i>linalol</i>	<i>1-8 cinéole</i>	<i>γ-terpinène</i>	<i>camphre</i>	<i>limonène</i>	<i>α-pinène</i>

I-3-3-2. Modes d'action

Le mode d'action des HE et/ou de leurs constituants est complexe et varie notamment selon le type de bactérie ciblée (Gram + ou Gram -). De manière générale, le mode d'action des agents antibactériens sur les bactéries intervient en plusieurs étapes : la dégradation de la paroi cellulaire, la coagulation du cytoplasme, la détérioration de la membrane cytoplasmique et des protéines membranaires ces dernières créant l'augmentation de la perméabilité de la membrane menant à la fuite du contenu des cellules, la réduction de la force motrice des protons, un changement intracellulaire du « groupement » Adenosine triphosphate (ATP) *via* une synthèse réduite, et l'augmentation de l'hydrolyse de l'ATP, ce qui accroît la perméabilité membranaire et réduit grandement le potentiel de la membrane ou mène éventuellement à la mort cellulaire⁸⁴ (**Figure 12**).

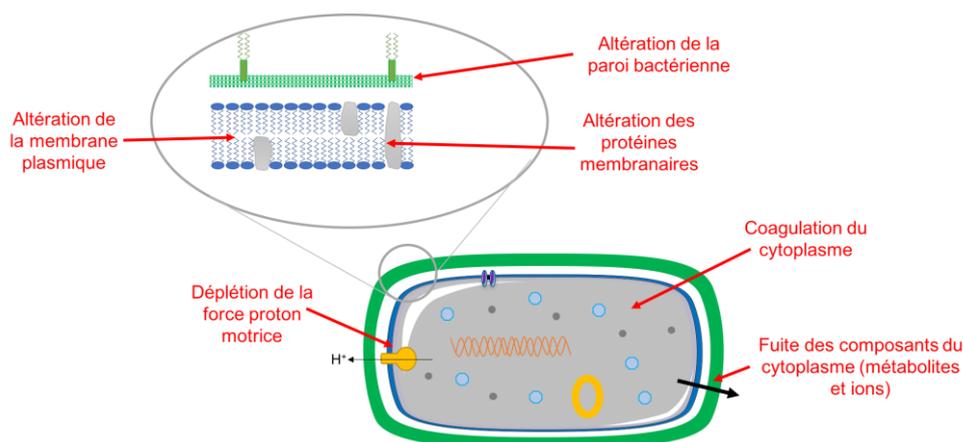


Figure 12. Mode d'action des huiles essentielles sur une cellule bactérienne^{145,172}

Les mécanismes d'action des huiles essentielles diffèrent selon leur composition chimique et celle de leurs constituants. Par exemple, le thymol et le carvacrol, isomères de position, ont tous les deux des propriétés antibactériennes¹⁷³. Mais malgré leurs structures très proches, ils présentent des mécanismes d'action différents contre les Gram + et Gram -. Les phénols et terpènes font partie des molécules ayant les meilleures propriétés antibactériennes. Ces molécules à large spectre sont utiles pour lutter contre de nombreuses infections bactériennes¹⁷¹.

I-3-3-3. Quantification de l'activité antibactérienne

L'activité antibactérienne des huiles essentielles et de leurs constituants est évaluée par le calcul de la Concentration Minimale Inhibitrice (MIC) et la Concentration Minimale Bactéricide (MBC). La MIC est définie comme la concentration la plus basse d'un antimicrobien permettant d'inhiber la croissance d'un microorganisme après une nuit d'incubation¹⁷⁴. Tandis que la MBC est la concentration la plus faible qui permet de tuer 99.9 % des bactéries en 24h¹⁴⁷. Le calcul de la MIC est plus fréquemment rapporté dans la littérature. Cependant, il est important de signaler que ces valeurs peuvent varier et sont difficiles à comparer en raison de la différence de méthodologie dans le calcul des concentrations ou des tests antibactériens. Il existe d'autres tests comme les tests antibactériens par dilution, par diffusion ou par étude bioautographique^{145,175}. De plus, on peut supposer que les différences observées peuvent être inhérentes à une hétérogénéité de composition de l'HE étudiée, comme cela a été mentionné précédemment. Les valeurs des MIC pour une bactérie Gram - (*E. coli*) et Gram + (*S. aureus*) pour plusieurs HE regroupées dans le **Tableau 9** illustrent ces divergences.

Tableau 9. Valeurs des MIC de plusieurs huiles essentielles

HE	MIC (<i>E. coli</i>)	MIC (<i>S. aureus</i>)	Unités	Références
Cannelle	>1.6	3.2	g.L ⁻¹	147
Citronnelle	0.06	0.06	% v/v	145,165
	0.12	0.25	% v/v	165
Thym	0.045-0.125	0.02-0.25	% v/v	145
	0.001	0.0005	g.L ⁻¹	176
	0.5	1	% v/v	165
Menthe poivrée	0.0025	0.002	g.L ⁻¹	176
	0.25	0.5	% v/v	165
Arbre à thé	0.25->8	0.06-4	% v/v	145
Coriandre	0.23	0.4	% v/v	153
	0.5-0.25	1	% v/v	165
Lavande	0.006	0.005	g.L ⁻¹	176
	>6.4	>12.8	g.L ⁻¹	147
Romarin	1	1	% v/v	165
	0.45->1	0.04-1	% v/v	145
Eucalyptus	0.27	0.23	% v/v	153
	>6.4	>12.8	g.L ⁻¹	147
Citron	0.0075	0.006	g.L ⁻¹	176
	>2	>2	% v/v	165
	>12.8	>12.8	g.L ⁻¹	147
	0.05-0.12	0.05-0.12	% v/v	145
Origan	0.12	0.12	% v/v	165
	0.575	1.648	g.L ⁻¹	177
	0.0005	0.00025	g.L ⁻¹	176
	0.5	1	% v/v	165
Sauge	0.35-0.5	0.075-1	% v/v	145
	0.007	0.006	g.L ⁻¹	176
	>1.6	>6.4	g.L ⁻¹	147
Clou de girofle	0.25	0.25	% v/v	165
	0.04-0.25	0.04-0.25	% v/v	145

Les HE sont bactéricides pour des concentrations relativement faibles ce qui en font des molécules particulièrement intéressantes. De plus, les différences observées nous conduisent à envisager dans le cadre de notre travail l'utilisation de molécules simples extraites des HE et non pas le mélange complexe que constitue l'HE. Au demeurant, ces molécules présentent néanmoins certains désavantages comme leur mauvaise solubilité en phase aqueuse ou leur volatilité. L'utilisation de ce type de molécules dans notre application nécessite de développer un procédé d'immobilisation pour leur apporter une certaine protection physique et chimique tout en permettant leur libération contrôlée au cours du temps. Il est donc nécessaire de les encapsuler afin de former des complexes d'inclusion « hôte/invité ». La cyclodextrine sera utilisée pour cette raison.

I-3-4. Encapsulation des molécules issues des huiles essentielles

I-3-4-1. Généralités sur les cyclodextrines

Les cyclodextrines (CD) font partie de la famille des oligosaccharides cycliques et sont constituées de 6 (α -cyclodextrine), 7 (β -cyclodextrine) ou 8 (γ -cyclodextrine) sous-unités glucopyranose selon le type de cyclodextrine, reliées entre elles par des liaisons α -(1,4) (**Figure 13**). Ce sont des molécules-cages naturelles issues de la dégradation enzymatique de l'amidon qui présentent une forme de cône tronqué. Les CD possèdent une cavité hydrophobe et une enveloppe hydrophile. Le **Tableau 10** présente les caractéristiques physico-chimiques des différentes CD.

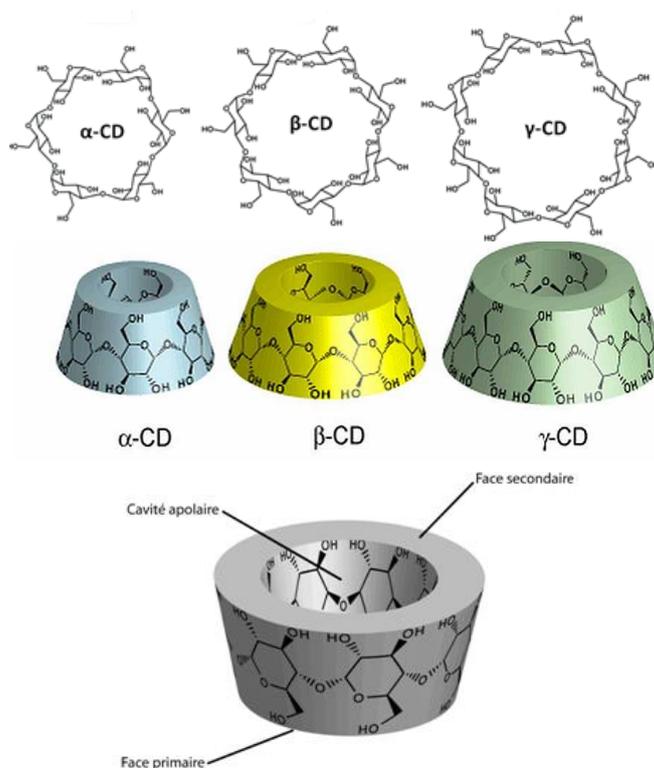


Figure 13. Les différents types de cyclodextrines

Tableau 10. Caractéristiques des principales CD : α , β , γ ¹⁷⁸

Cyclodextrine	α -CD	β -CD	γ -CD
Masse molaire (g.mol ⁻¹)	972	1135	1297
Solubilité dans l'eau (g/100 mL)	14.5	1.85	23.2
Hauteur de la cavité (Å)	7.9	7.9	7.9
Diamètre interne (Å)	4.7-5.3	6.0-6.5	7.5-8.3
Diamètre externe (Å)	14.6	15.4	17.5

Ces molécules sont utilisées pour améliorer la biodisponibilité en augmentant la solubilisation et/ou la dissolution via l'inclusion de composés insolubles dans l'eau, au sein de leurs cavités

hydrophobes, grâce à la création de complexes d'inclusion « hôte/invité ». L'encapsulation améliore la stabilité des composés hydrophobes et diminue la toxicité en créant un composé efficace à faible dose¹⁷⁹. De plus, ces composés restent stables face à l'oxydation, la lumière visible, les UV ainsi qu'à la chaleur¹⁸⁰. Il existe également des dérivés de la β -cyclodextrine obtenus par modification d'une ou plusieurs fonctions hydroxyle (**Tableau 11**). Par exemple, la 2-hydroxypropyle- β -cyclodextrine (HP- β -CD), est une β -CD qui présente une hydrosolubilité élevée (500 g.L^{-1})¹⁸¹. Comparée à la β -CD, l'HP- β -CD possède une faible toxicité et une capacité d'inclusion intéressante. Les dérivés méthyles de β -cyclodextrine (M- β -CD) possède une solubilité encore plus élevée de 700 g.L^{-1} ¹⁸¹.

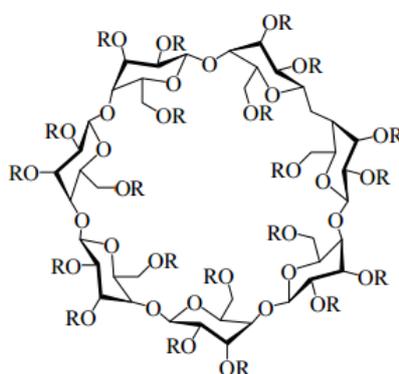


Tableau 11. Structure chimique de la β -CD et de ses dérivés

Cyclodextrine	R
β -CD	H
HP- β -CD	H, $\text{CH}_2\text{CHOHCH}_3$
M- β -CD	H, CH_3

La modification chimique de la CD permet de modifier sa solubilité qui est un frein dans l'utilisation des CD natives. Selon la modification chimique, le degré de substitution varie, ce qui modifie également les capacités d'encapsulation. La création de complexes « hôte/invité » va permettre dans notre cas, l'encapsulation des molécules naturelles antibactériennes.

I-3-4-2. Choix des molécules pour l'encapsulation

L'une des stratégies envisagées consiste à encapsuler les molécules bioactives antibactériennes dans la CD. La sélection s'est orientée vers les constituants principaux extraits des huiles essentielles, notamment les terpènes et les composés phénoliques, en raison de l'application visée. En effet, les molécules vont être utilisées dans la conception de structures fibreuses

filtrantes pour les masques de protection respiratoire. Ces molécules doivent donc respecter certains critères comme par exemple :

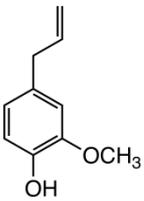
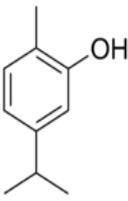
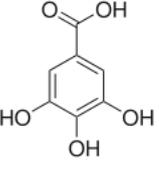
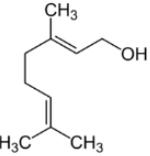
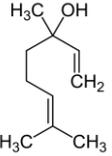
- Le caractère antibactérien
- La non-toxicité pour respecter les exigences sanitaires
- L'adéquation entre la taille de la cavité de la CD et celle de la molécule à encapsuler pour assurer l'encapsulation de la molécule dans la cyclodextrine

La première étape a été de sélectionner les différents composés en fonction de leurs propriétés antibactériennes avérées mais également en fonction de leur structure chimique (terpènes oxygénés ou phénols). Ces deux premiers critères nous amènent à sélectionner dans un premier temps 15 composés : l'acide gallique, l'acide tannique, le β -pinène, le carvacrol, la catéchine, le curcumin, l'eugénol, le géraniol, le limonène, le linalol, le nérol et le thymol. À titre de comparaison, nous avons élargi notre recherche bibliographique à trois autres composants : le triclosan (un biocide), le lysozyme (une enzyme), et la nisine (un peptide), qui possèdent tous des propriétés antibactériennes intéressantes. Le triclosan a rapidement été éliminé en raison d'une toxicité reconnue¹⁸².

La deuxième étape de sélection des composants intéressants pour la suite de notre étude a été de réaliser l'état de l'art, afin de recenser le nombre d'articles se rapportant à l'encapsulation des molécules sélectionnées dans la cyclodextrine. Le nérol, non répertorié dans la littérature a donc été éliminé de la sélection. Tandis que l'acide tannique, le lysozyme et la nisine ont été éliminés en raison de leur taille non adaptée avec la cage de cyclodextrine. L'acide tannique possède cependant des propriétés intéressantes et reste une molécule d'intérêt. Elle sera utilisée dans le chapitre 4 et plus particulièrement dans la fonctionnalisation des structures fibreuses commerciales en PP. Cette étape de sélection nous a donc permis de ne retenir que 10 composés.

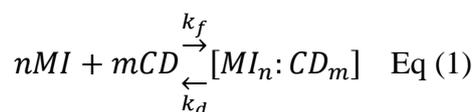
Parmi ces 10 composés nous avons choisi 5 composés : l'acide gallique, le carvacrol, l'eugénol, le géraniol et le linalol. Les formules chimiques de ces composés sont présentées dans le **Tableau 12**. Les propriétés antibactériennes *in vitro* de ces molécules seront quantifiées dans le chapitre 2.

Tableau 12. Structures chimiques des composés retenus pour notre étude

Composés phénoliques		
		
Eugénol	Carvacrol	Acide gallique
Composés terpéniques		
		
Géranol	Linalol	

I-3-4-3. Caractéristiques physico-chimiques des complexes d'inclusion à base de cyclodextrine

L'inclusion d'une molécule invitée dans une cavité de CD consiste principalement à substituer des molécules d'eau présentes dans la cavité de la CD par des molécules invitées moins polaires. Le processus est énergiquement favorisé par les interactions entre la molécule et la cavité hydrophobe solvatée de l'hôte. Les forces de Van der Waals, les interactions hydrophobes et les liaisons hydrogène permettent de maintenir la molécule invitée dans la molécule hôte. Toutefois, les complexes peuvent facilement se dissocier en solution aqueuse et les molécules hôtes libres rester en équilibre avec les molécules invitées au sein de la cavité de la CD. En solution aqueuse, la formation du complexe d'inclusion est un processus d'équilibre dynamique qui peut être décrit par l'équation (1). Pour un complexe de stœchiométrie 1:1, la constante d'équilibre K_{MI} pour la formation du complexe d'inclusion est donnée par l'équation (2).



$$K_{MI} = \frac{[MI_n:CD_m]}{[MI]^n[CD]^m} \quad \text{Eq (2)}$$

Avec :

- m et n les coefficients stœchiométriques
- MI la molécule invitée
- $[MI_n : CD_m]$ la concentration en complexe d'inclusion
- k_f : constante de formation
- k_d : constante de dissociation

Diverses méthodes d'analyses sont décrites dans la littérature pour déterminer les constantes d'association et la stœchiométrie des complexes. Elles reposent souvent sur la variation de certains paramètres physico-chimiques des molécules invitées, libres et complexées. Les modifications spectrales (UV-visible^{178,181,183}, déplacements chimiques en RMN 1H ¹⁸⁴⁻¹⁸⁶, spectroscopie de fluorescence^{184,187}), la chromatographie^{183,187,188}, les méthodes de solubilité^{178,179,186,189,190}, la calorimétrie¹⁸⁴, sont les méthodes parmi les plus couramment utilisées. Le **Tableau 13** indique les différentes valeurs référencées dans la bibliographie pour l'efficacité d'encapsulation, les constantes d'inclusion, en fonction des différents types d'inclusion et différents types de molécules.

Tableau 13. Valeurs de l'efficacité d'encapsulation, des constantes d'inclusion pour différents types de complexes d'inclusion

Molécule	Type de CD	Méthode de complexation	EE (%)	K (M ⁻¹)	Références
Acide gallique	β-CD	n. r	n. r	105, 124 ¹ (Gallate de propyle)	178
	β-CD	n. r	n. r	193, 200 ¹ (Gallate de butyle)	178
	β-CD	n. r	n. r	41 (pH3), 71 (pH5)	181
	HP-β-CD	n. r	n. r	90	181
	M-β-CD	n. r	n. r	37	181
	HP-β-CD	SD ²	89.2	n.r	191
Eugénol	α-CD	SD	43.6	n.r	185
	α-CD	FD ³	82.0	350, 94	183,192
	β-CD	SD	50.0	n.r	185
	β-CD	FD	94.0	264-462	183,192-194
	γ-CD	SD	51.0	n.r	185
	HP-β-CD	FD	99.0	436-462	183,192,194
Carvacrol	α-CD	SD	20.0	n.r	185
	β-CD	SD	80.0	n.r	185
	β-CD	FD	91.3 ± 0.4	155	189
	β-CD	KN ⁴	83.8 ± 2.9		185
	γ-CD	SD	70.0	n. r	185
	HP-β-CD	FD	83.7 ± 1.1	250	179
	HP-β-CD	KN	78.1 ± 1.2		
Géraniol	HP-β-CD	FD	85.1 ± 2.8	712, 1064, 1320 ¹	187
Linalol	HP-β-CD	FD	90.3 ± 0.9	596, 1260, 1500 ¹	187

¹Selon la méthode utilisée ²Méthode « Spray-drying » ou « atomisation » ³Méthode « Freeze-drying » ou « lyophilisation » ⁴Méthode « Kneading » ou « malaxage » n.r : non renseigné

Il est à noter que certaines valeurs du tableau ne peuvent être trouvées dans la littérature et ne sont donc pas renseignées (n.r). Comme mentionné dans les travaux de Kfoury *et al.*, les valeurs des constantes d'inclusion comprises entre 200 et 2000 M⁻¹ sont caractéristiques des complexes d'inclusion de type 1:1¹⁸⁷, d'autres travaux indiquent qu'une valeur située entre 100 et 1000 M⁻¹ est considérée comme idéale¹⁸⁹. D'autre part, les valeurs comprises entre 200 et 10 000 M⁻¹ sont des valeurs appropriées pour l'encapsulation de médicament dans la cyclodextrine et permettent un relargage contrôlé au cours du temps^{187,195,196}. Plus particulièrement, on peut remarquer les faibles valeurs pour l'encapsulation de l'acide gallique (37, 41, 71, 90). Néanmoins, la publication confirme bien la formation de complexes d'inclusion avec un ratio (1:1) et il est également souligné que d'autres études ont confirmé l'obtention de résultats thermodynamiques similaires ainsi que des méthodes d'encapsulation analogues¹⁸¹.

I-3-4-4. Propriétés antibactériennes des complexes d'inclusion

Avant de répertorier les propriétés antibactériennes pour les complexes d'inclusion précédemment cités, il est important d'étudier les propriétés antibactériennes pour les composés

seuls. Comme il a été défini précédemment, l'activité antibactérienne de ces composés est déterminée dans la littérature en calculant la MIC. Le **Tableau 14** indique les MIC pour les différents composés sélectionnés contre les souches *E. coli* et *S. aureus*.

Tableau 14. Valeurs des MIC des différents composés contre une souche de type Gram – et Gram +

Molécule	MIC _{<i>E. coli</i>} (g.L ⁻¹)	MIC _{<i>S. aureus</i>} (g.L ⁻¹)
Eugénol	0.8 - 3 ^{83,147,197,198,199}	0.02 - 0.9 ^{83,147,199}
Carvacrol	0.12 - 5 ^{83,147,176,200,201}	0.12 - 1.25 ^{83,147,176,200,201}
Géranol	0.312 - 2.5 ^{83,142,202,83}	0.312 - 5 ^{83,142,202,203}
Linalol	1.47 ¹⁶⁹	0.18 ¹⁶⁹
Acide gallique	n. r.	1.024 ²⁰⁴
Acide tannique	n. r.	0.128-0.512 ²⁰⁴

Certaines valeurs de MIC, notamment pour l'acide gallique (contre *E. coli*) ne sont pas répertoriées (n.r.) dans la littérature. On note également que les valeurs selon les souches sont assez variables d'une publication à une autre. Le **Tableau 15**, quant à lui, répertorie les valeurs MIC et MBC du carvacrol et des complexes d'inclusion cyclodextrine/carvacrol pour différents types de souches.

Tableau 15. Valeurs des MIC et MBC pour le carvacrol et les complexes d'inclusion contre différents types de souches

Souche	Complexes d'inclusion	Méthode de complexation	MIC (g.L ⁻¹)	MBC (g.L ⁻¹)	Références
<i>E. coli</i>	Carvacrol	-	1	>1	189
	Carvacrol/ β -CD	FD ¹	0.35	0.75	
	Carvacrol/ β -CD	KN ²	0.35	0.75	
	Carvacrol/HP- β -CD	FD	0.4	0.75	179
	Carvacrol/HP- β -CD	KN	0.3	0.6	
<i>Salmonella Typhimurium</i>	Carvacrol	-	1.1	1.1	189
	Carvacrol/ β -CD	FD	0.35	0.8	
	Carvacrol/ β -CD	KN	0.35	0.8	
	Carvacrol/HP- β -CD	FD	0.4	0.6	179
	Carvacrol/HP- β -CD	KN	0.3	0.9	

¹Méthode « Freeze-drying » ou « lyophilisation », ²Méthode « Kneading » ou « malaxage »

Les valeurs des concentrations inhibitrices et bactéricides pour les différents complexes (acide tannique, acide gallique, eugénol, carvacrol, linalol), ne sont pas disponibles dans la littérature, on ne peut donc pas les comparer avec les concentrations inhibitrices des produits purs. Néanmoins, en regardant le carvacrol, on observe une augmentation nette de l'activité antibactérienne lorsque celui-ci est encapsulé dans la cyclodextrine, due à une amélioration de la solubilité du carvacrol dans l'eau.

Conclusion

Cette étude bibliographique a permis de décrire les technologies existantes en matière de protection respiratoire, les structures fibreuses non-tissées qui les composent, ainsi que leurs méthodes de mise en œuvre. Les différents agents antibactériens existants ont également été succinctement présentés, notamment ceux extraits des huiles essentielles choisis selon des critères stricts. L'acide gallique, le carvacrol, l'eugénol, le géraniol et le linalol ont donc été retenus et leurs propriétés antibactériennes seront mesurées grâce à une étude microbiologique dans le chapitre 2. Le composé possédant les propriétés antibactériennes les plus intéressantes sera ensuite encapsulé à l'aide de la cyclodextrine afin de créer des complexes d'inclusion pour enfin être intégrés aux mats filtrants fabriqués par électrospinning. La poly-fonctionnalité et les propriétés antiradicalaires et antibactériennes de l'acide tannique seront mises à profit pour développer des stratégies de fonctionnalisation physique ou chimique de support à base de polypropylène dans le chapitre quatre.

Références

- (1) *Illustrations : Jean-André Deledda - Www.3zigs.Com.*
- (2) Ensor, D. *Aerosol Science and Technology: History and Reviews*; RTI Press: Research Triangle Park, NC, 2011. <https://doi.org/10.3768/rtipress.2011.bk.0003.1109>.
- (3) Guimon, M. *Les appareils de protection respiratoire*; INRS, 2017; p 68.
- (4) ISO 9092:2011, Textiles — Nontissés — Définition (accessed Dec 10, 2018).
- (5) Facts and figures <https://www.edana.org/discover-nonwovens/facts-and-figures> (accessed Dec 10, 2018).
- (6) Hutten, I. M. *Handbook of Nonwoven Filter Media*, 1st ed.; Butterworth-Heinemann: Oxford ; Burlington, MA, 2007.
- (7) Li, Z.; Wang, C. *One-Dimensional Nanostructures: Electrospinning Technique and Unique Nanofibers*; SpringerBriefs in Materials; Springer-Verlag: Berlin Heidelberg, 2013.
- (8) Formhals, A. Process and Apparatus for Preparing Artificial Threads. US1975504A, October 2, 1934.
- (9) Norton, C. L. Method of and Apparatus for Producing Fibrous or Filamentary Material. US2048651A, July 21, 1936.
- (10) Mirjalili, M.; Zohoori, S. Review for Application of Electrospinning and Electrospun Nanofibers Technology in Textile Industry. *J. Nanostructure Chem.* **2016**, *6* (3), 207–213. <https://doi.org/10.1007/s40097-016-0189-y>.
- (11) Bhardwaj, N.; Kundu, S. C. Electrospinning: A Fascinating Fiber Fabrication Technique. *Biotechnol. Adv.* **2010**, *28* (3), 325–347. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2010.01.004>.
- (12) Greiner, A.; Wendorff, J. H. Electrospinning: A Fascinating Method for the Preparation of Ultrathin Fibers. *Angew. Chem. Int. Ed Engl.* **2007**, *46* (30), 5670–5703. <https://doi.org/10.1002/anie.200604646>.
- (13) Deitzel, J. M.; Kleinmeyer, J.; Harris, D.; Beck Tan, N. C. The Effect of Processing Variables on the Morphology of Electrospun Nanofibers and Textiles. *Polymer* **2001**, *42* (1), 261–272. [https://doi.org/10.1016/S0032-3861\(00\)00250-0](https://doi.org/10.1016/S0032-3861(00)00250-0).
- (14) Sukigara, S.; Gandhi, M.; Ayutsede, J.; Micklus, M.; Ko, F. Regeneration of Bombyx Mori Silk by Electrospinning—Part 1: Processing Parameters and Geometric Properties. *Polymer* **2003**, *44* (19), 5721–5727. [https://doi.org/10.1016/S0032-3861\(03\)00532-9](https://doi.org/10.1016/S0032-3861(03)00532-9).
- (15) Demir, M. M.; Yilgor, I.; Yilgor, E.; Erman, B. Electrospinning of Polyurethane Fibers. *Polymer* **2002**, *43* (11), 3303–3309. [https://doi.org/10.1016/S0032-3861\(02\)00136-2](https://doi.org/10.1016/S0032-3861(02)00136-2).
- (16) Kim, K.-H.; Jeong, L.; Park, H.-N.; Shin, S.-Y.; Park, W.-H.; Lee, S.-C.; Kim, T.-I.; Park, Y.-J.; Seol, Y.-J.; Lee, Y.-M.; et al. Biological Efficacy of Silk Fibroin Nanofiber Membranes for Guided Bone Regeneration. *J. Biotechnol.* **2005**, *120* (3), 327–339. <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2005.06.033>.
- (17) Huang, L.; Nagapudi, K.; Apkarian, R. P.; Chaikof, E. L. Engineered Collagen-PEO Nanofibers and Fabrics. *J. Biomater. Sci. Polym. Ed.* **2001**, *12* (9), 979–993.
- (18) Son, W. K.; Youk, J. H.; Lee, T. S.; Park, W. H. The Effects of Solution Properties and Polyelectrolyte on Electrospinning of Ultrafine Poly(Ethylene Oxide) Fibers. *Polymer* **2004**, *45* (9), 2959–2966. <https://doi.org/10.1016/j.polymer.2004.03.006>.
- (19) Ding, B.; Kim, H.-Y.; Lee, S.-C.; Shao, C.-L.; Lee, D.-R.; Park, S.-J.; Kwag, G.-B.; Choi, K.-J. Preparation and Characterization of a Nanoscale Poly(Vinyl Alcohol) Fiber Aggregate Produced by an Electrospinning Method. *J. Polym. Sci. Part B Polym. Phys.* **2002**, *40* (13), 1261–1268. <https://doi.org/10.1002/polb.10191>.
- (20) Koski, A.; Yim, K.; Shivkumar, S. Effect of Molecular Weight on Fibrous PVA Produced by Electrospinning. *Mater. Lett.* **2004**, *58* (3), 493–497. [https://doi.org/10.1016/S0167-577X\(03\)00532-9](https://doi.org/10.1016/S0167-577X(03)00532-9).
- (21) Lee, J. S.; Choi, K. H.; Ghim, H. D.; Kim, S. S.; Chun, D. H.; Kim, H. Y.; Lyoo, W. S. Role of Molecular Weight of Atactic Poly(Vinyl Alcohol) (PVA) in the Structure and Properties of PVA Nanofabric Prepared by Electrospinning. *J. Appl. Polym. Sci.* **2004**, *93* (4), 1638–1646. <https://doi.org/10.1002/app.20602>.

- (22) Zhang, C.; Yuan, X.; Wu, L.; Han, Y.; Sheng, J. Study on Morphology of Electrospun Poly(Vinyl Alcohol) Mats. *Eur. Polym. J.* **2005**, *41* (3), 423–432. <https://doi.org/10.1016/j.eurpolymj.2004.10.027>.
- (23) Gupta, P.; Elkins, C.; Long, T. E.; Wilkes, G. L. Electrospinning of Linear Homopolymers of Poly(Methyl Methacrylate): Exploring Relationships between Fiber Formation, Viscosity, Molecular Weight and Concentration in a Good Solvent. *Polymer* **2005**, *46* (13), 4799–4810. <https://doi.org/10.1016/j.polymer.2005.04.021>.
- (24) Jarusuwannapoom, T.; Hongrojjanawiwat, W.; Jitjaicham, S.; Wannatong, L.; Nithitanakul, M.; Pattamaprom, C.; Koombhongse, P.; Rangkupan, R.; Supaphol, P. Effect of Solvents on Electrospinnability of Polystyrene Solutions and Morphological Appearance of Resulting Electrospun Polystyrene Fibers. *Eur. Polym. J.* **2005**, *41* (3), 409–421. <https://doi.org/10.1016/j.eurpolymj.2004.10.010>.
- (25) Zeng, J.; Haoqing, H.; Schaper, A.; Wendorff, J. H.; Greiner, A. Poly-L-Lactide Nanofibers by Electrospinning – Influence of Solution Viscosity and Electrical Conductivity on Fiber Diameter and Fiber Morphology. *E-Polym.* **2003**, *3* (1). <https://doi.org/10.1515/epoly.2003.3.1.102>.
- (26) Ki, C. S.; Baek, D. H.; Gang, K. D.; Lee, K. H.; Um, I. C.; Park, Y. H. Characterization of Gelatin Nanofiber Prepared from Gelatin–Formic Acid Solution. *Polymer* **2005**, *46* (14), 5094–5102. <https://doi.org/10.1016/j.polymer.2005.04.040>.
- (27) Jiang, H.; Fang, D.; Hsiao, B. S.; Chu, B.; Chen, W. Optimization and Characterization of Dextran Membranes Prepared by Electrospinning. *Biomacromolecules* **2004**, *5* (2), 326–333. <https://doi.org/10.1021/bm034345w>.
- (28) Reneker, D. H.; Yarin, A. L. Electrospinning Jets and Polymer Nanofibers. *Polymer* **2008**, *49* (10), 2387–2425. <https://doi.org/10.1016/j.polymer.2008.02.002>.
- (29) Haghi, A. K.; Akbari, M. Trends in Electrospinning of Natural Nanofibers. *Phys. Status Solidi A* **2007**, *204* (6), 1830–1834. <https://doi.org/10.1002/pssa.200675301>.
- (30) Yuan, X.; Zhang, Y.; Dong, C.; Sheng, J. Morphology of Ultrafine Polysulfone Fibers Prepared by Electrospinning. *Polym. Int.* **2004**, *53* (11), 1704–1710. <https://doi.org/10.1002/pi.1538>.
- (31) Megelski, S.; Stephens, J. S.; Chase, D. B.; Rabolt, J. F. Micro- and Nanostructured Surface Morphology on Electrospun Polymer Fibers. *Macromolecules* **2002**, *35* (22), 8456–8466. <https://doi.org/10.1021/ma020444a>.
- (32) Buchko, C. J.; Chen, L. C.; Shen, Y.; Martin, D. C. Processing and Microstructural Characterization of Porous Biocompatible Protein Polymer Thin Films. *Polymer* **1999**, *40* (26), 7397–7407. [https://doi.org/10.1016/S0032-3861\(98\)00866-0](https://doi.org/10.1016/S0032-3861(98)00866-0).
- (33) Baumgarten, P. K. Electrostatic Spinning of Acrylic Microfibers. *J. Colloid Interface Sci.* **1971**, *36* (1), 71–79. [https://doi.org/10.1016/0021-9797\(71\)90241-4](https://doi.org/10.1016/0021-9797(71)90241-4).
- (34) Sill, T. J.; von Recum, H. A. Electrospinning: Applications in Drug Delivery and Tissue Engineering. *Biomaterials* **2008**, *29* (13), 1989–2006. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2008.01.011>.
- (35) Reneker, D. H.; Chun, I. Nanometre Diameter Fibres of Polymer, Produced by Electrospinning. *Nanotechnology* **1996**, *7* (3), 216. <https://doi.org/10.1088/0957-4484/7/3/009>.
- (36) Katti, D. S.; Robinson, K. W.; Ko, F. K.; Laurencin, C. T. Bioresorbable Nanofiber-Based Systems for Wound Healing and Drug Delivery: Optimization of Fabrication Parameters. *J. Biomed. Mater. Res. B Appl. Biomater.* **2004**, *70* (2), 286–296. <https://doi.org/10.1002/jbm.b.30041>.
- (37) Mo, X. M.; Xu, C. Y.; Kotaki, M.; Ramakrishna, S. Electrospun P(LLA-CL) Nanofiber: A Biomimetic Extracellular Matrix for Smooth Muscle Cell and Endothelial Cell Proliferation. *Biomaterials* **2004**, *25* (10), 1883–1890.
- (38) Pawlowski, K. J.; Barnes, C. P.; Boland, E. D.; Wnek, G. E.; Bowlin, G. L. Biomedical Nanoscience: Electrospinning Basic Concepts, Applications, and Classroom Demonstration. *MRS Online Proc. Libr. Arch.* **2004**, 827. <https://doi.org/10.1557/PROC-827-BB1.7>.
- (39) Megelski, S.; Stephens, J. S.; Chase, D. B.; Rabolt, J. F. Micro- and Nanostructured Surface Morphology on Electrospun Polymer Fibers. *Macromolecules* **2002**, *35* (22), 8456–8466. <https://doi.org/10.1021/ma020444a>.

- (40) Zuo, W.; Zhu, M.; Yang, W.; Yu, H.; Chen, Y.; Zhang, Y. Experimental Study on Relationship between Jet Instability and Formation of Beaded Fibers during Electrospinning. *Polym. Eng. Sci.* **2005**, *45* (5), 704–709. <https://doi.org/10.1002/pen.20304>.
- (41) Geng, X.; Kwon, O.-H.; Jang, J. Electrospinning of Chitosan Dissolved in Concentrated Acetic Acid Solution. *Biomaterials* **2005**, *26* (27), 5427–5432. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2005.01.066>.
- (42) Mit-uppatham, C.; Nithitanakul, M.; Supaphol, P. Ultrafine Electrospun Polyamide-6 Fibers: Effect of Solution Conditions on Morphology and Average Fiber Diameter. *Macromol. Chem. Phys.* **2004**, *205* (17), 2327–2338. <https://doi.org/10.1002/macp.200400225>.
- (43) Casper, C. L.; Stephens, J. S.; Tassi, N. G.; Chase, D. B.; Rabolt, J. F. Controlling Surface Morphology of Electrospun Polystyrene Fibers: Effect of Humidity and Molecular Weight in the Electrospinning Process. *Macromolecules* **2004**, *37* (2), 573–578. <https://doi.org/10.1021/ma0351975>.
- (44) Ramier, J. Structures Poreuses Tridimensionnelles de Biopolymères Pour l'ingénierie Tissulaire, Université Paris-Est, 2012.
- (45) Steinbüchel, A.; Valentin, H. E. Diversity of Bacterial Polyhydroxyalkanoic Acids. *FEMS Microbiol. Lett.* **1995**, *128* (3), 219–228. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.1995.tb07528.x>.
- (46) Müller, H.-M.; Seebach, D. Poly(Hydroxyalkanoates): A Fifth Class of Physiologically Important Organic Biopolymers? *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1993**, *32* (4), 477–502. <https://doi.org/10.1002/anie.199304771>.
- (47) Berezina, N.; Martelli, S. M. CHAPTER 1: Bio-Based Polymers and Materials. In *CHAPTER 1: Bio-based Polymers and Materials*; 2014; pp 1–28.
- (48) Tian, J.; Sinskey, A. J.; Stubbe, J. Kinetic Studies of Polyhydroxybutyrate Granule Formation in *Wautersia Eutropha* H16 by Transmission Electron Microscopy. *J. Bacteriol.* **2005**, *187* (11), 3814–3824. <https://doi.org/10.1128/JB.187.11.3814-3824.2005>.
- (49) Lee, S. Y. Bacterial Polyhydroxyalkanoates. *Biotechnol. Bioeng.* **1996**, *49* (1), 1–14. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1097-0290\(19960105\)49:1<1::AID-BIT1>3.0.CO;2-P](https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-0290(19960105)49:1<1::AID-BIT1>3.0.CO;2-P).
- (50) Chen, G.-Q. A Microbial Polyhydroxyalkanoates (PHA) Based Bio- and Materials Industry. *Chem. Soc. Rev.* **2009**, *38* (8), 2434–2446. <https://doi.org/10.1039/b812677c>.
- (51) Chen, G.-Q.; Wu, Q. The Application of Polyhydroxyalkanoates as Tissue Engineering Materials. *Biomaterials* **2005**, *26* (33), 6565–6578. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2005.04.036>.
- (52) Rai, R.; Keshavarz, T.; Roether, J. A.; Boccaccini, A. R.; Roy, I. Medium Chain Length Polyhydroxyalkanoates, Promising New Biomedical Materials for the Future. *Mater. Sci. Eng. R Rep.* **2011**, *72* (3), 29–47. <https://doi.org/10.1016/j.mser.2010.11.002>.
- (53) Lemechko, P.; Ramier, J.; Versace, D. L.; Guezennec, J.; Simon-Colin, C.; Albanese, P.; Renard, E.; Langlois, V. Designing Exopolysaccharide-Graft-Poly(3-Hydroxyalkanoate) Copolymers for Electrospun Scaffolds. *React. Funct. Polym.* **2013**, *73* (1), 237–243. <https://doi.org/10.1016/j.reactfunctpolym.2012.10.012>.
- (54) Dzenis, Y. Material Science. Spinning Continuous Fibers for Nanotechnology. *Science* **2004**, *304* (5679), 1917–1919. <https://doi.org/10.1126/science.1099074>.
- (55) Hazer, D. B.; Kılıçay, E.; Hazer, B. Poly(3-Hydroxyalkanoate)s: Diversification and Biomedical Applications: A State of the Art Review. *Mater. Sci. Eng. C* **2012**, *32* (4), 637–647. <https://doi.org/10.1016/j.msec.2012.01.021>.
- (56) Sudesh, K. *Polyhydroxyalkanoates from Palm Oil: Biodegradable Plastics*; SpringerBriefs in Microbiology; Springer Berlin Heidelberg: Berlin, Heidelberg, 2013. <https://doi.org/10.1007/978-3-642-33539-6>.
- (57) Marova, I.; Kundrat, V.; Benesova, P.; Matouskova, P.; Obruca, S. Use of Biodegradable PHA-Based Nanofibers to Removing Microorganisms from Water. In *2015 IEEE 15th International Conference on Nanotechnology (IEEE-NANO)*; 2015; pp 204–206. <https://doi.org/10.1109/NANO.2015.7388958>.
- (58) Wu, C.-S.; Wang, S.-S. Bio-Based Electrospun Nanofiber of Polyhydroxyalkanoate Modified with Black Soldier Fly's Pupa Shell with Antibacterial and Cytocompatibility Properties. *ACS Appl. Mater. Interfaces* **2018**, *10* (49), 42127–42135. <https://doi.org/10.1021/acsami.8b16606>.

- (59) Naveen, N.; Kumar, R.; Balaji, S.; Uma, T. S.; Natrajan, T. S.; Sehgal, P. K. Synthesis of Nonwoven Nanofibers by Electrospinning – A Promising Biomaterial for Tissue Engineering and Drug Delivery. *Adv. Eng. Mater.* **2010**, *12* (8), B380–B387. <https://doi.org/10.1002/adem.200980067>.
- (60) Cherpinski, A.; Torres-Giner, S.; Vartiainen, J.; Peresin, M. S.; Lahtinen, P.; Lagaron, J. M. Improving the Water Resistance of Nanocellulose-Based Films with Polyhydroxyalkanoates Processed by the Electrospinning Coating Technique. *Cellulose* **2018**, *25* (2), 1291–1307. <https://doi.org/10.1007/s10570-018-1648-z>.
- (61) Fabra, M. J.; Lopez-Rubio, A.; Lagaron, J. M. Nanostructured Interlayers of Zein to Improve the Barrier Properties of High Barrier Polyhydroxyalkanoates and Other Polyesters. *J. Food Eng.* **2014**, *127*, 1–9. <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2013.11.022>.
- (62) Cherpinski, A.; Torres-Giner, S.; Cabedo, L.; Lagaron, J. M. Post-Processing Optimization of Electrospun Submicron Poly(3-Hydroxybutyrate) Fibers to Obtain Continuous Films of Interest in Food Packaging Applications. *Food Addit. Contam. Part A* **2017**, *34* (10), 1817–1830. <https://doi.org/10.1080/19440049.2017.1355115>.
- (63) Castro-Mayorga, J. L.; Fabra, M. J.; Cabedo, L.; Lagaron, J. M. On the Use of the Electrospinning Coating Technique to Produce Antimicrobial Polyhydroxyalkanoate Materials Containing In Situ-Stabilized Silver Nanoparticles. *Nanomater. Basel Switz.* **2016**, *7* (1). <https://doi.org/10.3390/nano7010004>.
- (64) Fabra, M. J.; López-Rubio, A.; Ambrosio-Martín, J.; Lagaron, J. M. Improving the Barrier Properties of Thermoplastic Corn Starch-Based Films Containing Bacterial Cellulose Nanowhiskers by Means of PHA Electrospun Coatings of Interest in Food Packaging. *Food Hydrocoll.* **2016**, *61*, 261–268. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2016.05.025>.
- (65) Ramier, J.; Grande, D.; Boudelique, T.; Stoilova, O.; Manolova, N.; Rashkov, I.; Langlois, V.; Albanese, P.; Renard, E. From Design of Bio-Based Biocomposite Electrospun Scaffolds to Osteogenic Differentiation of Human Mesenchymal Stromal Cells. *J. Mater. Sci. Mater. Med.* **2014**, *25* (6), 1563–1575. <https://doi.org/10.1007/s10856-014-5174-8>.
- (66) Ramier, J.; Boudelique, T.; Stoilova, O.; Manolova, N.; Rashkov, I.; Langlois, V.; Renard, E.; Albanese, P.; Grande, D. Biocomposite Scaffolds Based on Electrospun Poly(3-Hydroxybutyrate) Nanofibers and Electrospayed Hydroxyapatite Nanoparticles for Bone Tissue Engineering Applications. *Mater. Sci. Eng. C Mater. Biol. Appl.* **2014**, *38*, 161–169. <https://doi.org/10.1016/j.msec.2014.01.046>.
- (67) Yao, C.-L.; Chen, J.-H.; Lee, C.-H. Effects of Various Monomers and Micro-Structure of Polyhydroxyalkanoates on the Behavior of Endothelial Progenitor Cells and Endothelial Cells for Vascular Tissue Engineering. *J. Polym. Res.* **2017**, *25* (3), 187. <https://doi.org/10.1007/s10965-017-1341-1>.
- (68) Lee, I. S.; Kwon, O. H.; Meng, W.; Kang, I.-K.; Ito, Y. Nanofabrication of Microbial Polyester by Electrospinning Promotes Cell Attachment. *Macromol. Res.* **2004**, *12* (4), 374–378. <https://doi.org/10.1007/BF03218414>.
- (69) Meng, W.; Kim, S.-Y.; Yuan, J.; Kim, J. C.; Kwon, O. H.; Kawazoe, N.; Chen, G.; Ito, Y.; Kang, I.-K. Electrospun PHBV/Collagen Composite Nanofibrous Scaffolds for Tissue Engineering. *J. Biomater. Sci. Polym. Ed.* **2007**, *18* (1), 81–94.
- (70) Lemeckko, P.; Ramier, J.; Versace, D. L.; Guezennec, J.; Simon-Colin, C.; Albanese, P.; Renard, E.; Langlois, V. Designing Exopolysaccharide-Graft-Poly(3-Hydroxyalkanoate) Copolymers for Electrospun Scaffolds. *React. Funct. Polym.* **2013**, *73* (1), 237–243. <https://doi.org/10.1016/j.reactfunctpolym.2012.10.012>.
- (71) Mangeon, C.; Mahouche-Chergui, S.; Versace, D. L.; Guerrouache, M.; Carbonnier, B.; Langlois, V.; Renard, E. Poly(3-Hydroxyalkanoate)-Grafted Carbon Nanotube Nanofillers as Reinforcing Agent for PHAs-Based Electrospun Mats. *React. Funct. Polym.* **2015**, *89*, 18–23. <https://doi.org/10.1016/j.reactfunctpolym.2015.03.001>.
- (72) Yu, B.-Y.; Chen, C.-R.; Sun, Y.-M.; Young, T.-H. The Response of Rat Cerebellar Granule Neurons (RCGNs) to Various Polyhydroxyalkanoate (PHA) Films. *Desalination* **2009**, *245* (1), 639–646. <https://doi.org/10.1016/j.desal.2009.02.031>.

- (73) Grande, D.; Ramier, J.; Versace, D. L.; Renard, E.; Langlois, V. Design of Functionalized Biodegradable PHA-Based Electrospun Scaffolds Meant for Tissue Engineering Applications. *New Biotechnol.* **2017**, *37* (Pt A), 129–137. <https://doi.org/10.1016/j.nbt.2016.05.006>.
- (74) Ramier, J.; Boubaker, M. B.; Guerrouache, M.; Langlois, V.; Grande, D.; Renard, E. Novel Routes to Epoxy Functionalization of PHA-Based Electrospun Scaffolds as Ways to Improve Cell Adhesion. *J. Polym. Sci. Part Polym. Chem.* **2014**, *52* (6), 816–824. <https://doi.org/10.1002/pola.27063>.
- (75) Versace, D.-L.; Ramier, J.; Grande, D.; Andaloussi, S. A.; Dubot, P.; Hobeika, N.; Malval, J.-P.; Lalevee, J.; Renard, E.; Langlois, V. Versatile Photochemical Surface Modification of Biopolyester Microfibrous Scaffolds with Photogenerated Silver Nanoparticles for Antibacterial Activity. *Adv. Healthc. Mater.* **2013**, *2* (7), 1008–1018. <https://doi.org/10.1002/adhm.201200269>.
- (76) Jin, X.; Fan, Y.; Xue, Y.; Wu, L.; Lu, Y.; Chen, J.; Wang, X.; Dong, D.; Meng, F.; Lu, Y.; et al. Electrospun CF-PHA Nanocomposites: Effect of Surface Modifications of Carbon Fibers. *Int. J. Polym. Mater. Polym. Biomater.* **2014**, *63* (5), 262–267. <https://doi.org/10.1080/00914037.2013.830253>.
- (77) Tanadchangsang, N.; Kitmongkolpaisarn, S.; Boonyagul, S.; Koobkokkrud, T. Chemomechanical and Morphological Properties with Proliferation of Keratinocyte Cells of Electrospun Polyhydroxyalkanoate Fibers Incorporated with Essential Oil. *Polym. Adv. Technol.* **2018**, *29* (8), 2364–2372. <https://doi.org/10.1002/pat.4348>.
- (78) Zhijiang, C.; Jianru, J.; Qing, Z.; Shiyang, Z.; Jie, G. Preparation and Characterization of Novel Poly(3-Hydroxybutyrate-Co-4-Hydroxybutyrate)/Cellulose Acetate Composite Fibers. *Mater. Lett.* **2016**, *173*, 119–122. <https://doi.org/10.1016/j.matlet.2016.03.019>.
- (79) Canadas, R. F.; Cavalheiro, J. M. B. T.; Guerreiro, J. D. T.; de Almeida, M. C. M. D.; Pollet, E.; da Silva, C. L.; da Fonseca, M. M. R.; Ferreira, F. C. Polyhydroxyalkanoates: Waste Glycerol Upgrade into Electrospun Fibrous Scaffolds for Stem Cells Culture. *Int. J. Biol. Macromol.* **2014**, *71*, 131–140. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2014.05.008>.
- (80) Mukheem, A.; Muthosamy, K.; Manickam, S.; Sudesh, K.; Shahabuddin, S.; Saidur, R.; Akbar, N.; Sridewi, N. Fabrication and Characterization of an Electrospun PHA/Graphene Silver Nanocomposite Scaffold for Antibacterial Applications. *Materials* **2018**, *11* (9), 1673. <https://doi.org/10.3390/ma11091673>.
- (81) Kehail, A. A.; Brigham, C. J. Anti-Biofilm Activity of Solvent-Cast and Electrospun Polyhydroxyalkanoate Membranes Treated with Lysozyme. *J. Polym. Environ.* **2018**, *26* (1), 66–72. <https://doi.org/10.1007/s10924-016-0921-1>.
- (82) Tanadchangsang, N.; Boonyagul, S. Physical Properties and Morphology of Electrospun Composite Fiber Mats of Polyhydroxyalkanoate Containing Nanoclay and Tricalcium Phosphate Additives. *IOP Conf. Ser. Mater. Sci. Eng.* **2018**, *369*, 012013. <https://doi.org/10.1088/1757-899X/369/1/012013>.
- (83) Silverwood, R. Développement d'un film antibactérien ayant des propriétés de glissement pour une meilleure processabilité. masters, École Polytechnique de Montréal, 2012.
- (84) Guinoiseau, E. Molécules antibactériennes issues d'huiles essentielles: séparation, identification et mode d'action. phdthesis, Université de Corse, 2010.
- (85) Muñoz-Bonilla, A.; Fernández-García, M. Polymeric Materials with Antimicrobial Activity. *Prog. Polym. Sci.* **2012**, *37* (2), 281–339. <https://doi.org/10.1016/j.progpolymsci.2011.08.005>.
- (86) Venault de Bourleuf, A. Elaboration d'hydrogels composites chitosane/charbon actif à visée cicatrisante par procédés d'inversion de phase. Thèse de doctorat, Génie des Procédés Eau et Bioproduits: Montpellier, France, 2010.
- (87) Aljawish, A. Fonctionnalisation Enzymatique de Chitosane Par Des Composés Phénoliques : Évaluation Des Propriétés Biologiques et Physico-Chimiques de Ces Nouveaux Biopolymères, Université de Lorraine, 2013.
- (88) Lala, N. L.; Ramaseshan, R.; Bojun, L.; Sundarajan, S.; Barhate, R. S.; Ying-jun, L.; Ramakrishna, S. Fabrication of Nanofibers with Antimicrobial Functionality Used as Filters: Protection against Bacterial Contaminants. *Biotechnol. Bioeng.* **2007**, *97* (6), 1357–1365. <https://doi.org/10.1002/bit.21351>.

- (89) Zhang, L.; Luo, J.; Menkhaus, T. J.; Varadaraju, H.; Sun, Y.; Fong, H. Antimicrobial Nano-Fibrous Membranes Developed from Electrospun Polyacrylonitrile Nanofibers. *J. Membr. Sci.* **2011**, *369* (1), 499–505. <https://doi.org/10.1016/j.memsci.2010.12.032>.
- (90) Karthick, S. A.; Gobi, N. Nano Silver Incorporated Electrospun Polyacrylonitrile Nanofibers and Spun Bonded Polypropylene Composite for Aerosol Filtration. *J. Ind. Text.* **2017**, *46* (6), 1342–1361. <https://doi.org/10.1177/1528083715622428>.
- (91) Selvam, A. K.; Nallathambi, G. Polyacrylonitrile/Silver Nanoparticle Electrospun Nanocomposite Matrix for Bacterial Filtration. *Fibers Polym.* **2015**, *16* (6), 1327–1335. <https://doi.org/10.1007/s12221-015-1327-8>.
- (92) Zhu, M.; Xiong, R.; Huang, C. Bio-Based and Photocrosslinked Electrospun Antibacterial Nanofibrous Membranes for Air Filtration. *Carbohydr. Polym.* **2019**, *205*, 55–62. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2018.09.075>.
- (93) Kong, H.; Jang, J. Antibacterial Properties of Novel Poly(Methyl Methacrylate) Nanofiber Containing Silver Nanoparticles. *Langmuir* **2008**, *24* (5), 2051–2056. <https://doi.org/10.1021/la703085e>.
- (94) Lee, W. J.; Lee, J.; Kim, M. H.; Aguilar, L. E.; Park, C. H.; Kim, C. S. Investigation of Composite Nano Air Filter for Improving Antimicrobial Activity and Reducing VOCs Using a High Speed Upward Electrospinning System. *J. Nanosci. Nanotechnol.* **2019**, *19* (2), 697–700. <https://doi.org/10.1166/jnn.2019.15959>.
- (95) Pant, H. R.; Kim, H. J.; Joshi, M. K.; Pant, B.; Park, C. H.; Kim, J. I.; Hui, K. S.; Kim, C. S. One-Step Fabrication of Multifunctional Composite Polyurethane Spider-Web-like Nanofibrous Membrane for Water Purification. *J. Hazard. Mater.* **2014**, *264*, 25–33. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2013.10.066>.
- (96) Kim, H. J.; Han, S. W.; Joshi, M. K.; Kim, C. S. Fabrication and Characterization of Silver Nanoparticle-Incorporated Bilayer Electrospun–Melt-Blown Micro/Nanofibrous Membrane. *Int. J. Polym. Mater. Polym. Biomater.* **2017**, *66* (10), 514–520. <https://doi.org/10.1080/00914037.2016.1255615>.
- (97) Montazer, M.; Malekzadeh, S. B. Electrospun Antibacterial Nylon Nanofibers through in Situ Synthesis of Nanosilver: Preparation and Characteristics. *J. Polym. Res.* **2012**, *19* (10), 9980. <https://doi.org/10.1007/s10965-012-9980-8>.
- (98) Pant, H. R.; Pandeya, D. R.; Nam, K. T.; Baek, W.; Hong, S. T.; Kim, H. Y. Photocatalytic and Antibacterial Properties of a TiO₂/Nylon-6 Electrospun Nanocomposite Mat Containing Silver Nanoparticles. *J. Hazard. Mater.* **2011**, *189* (1), 465–471. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2011.02.062>.
- (99) Pan, Y. J.; Chuang, W. S.; Lin, C. Y.; Chu, C. H. Composites Silver-Contained PA 6 Electrospun Fibers with Spunbond Nonwovens for Filtration Applications <https://www.scientific.net/AMR.287-290.2626> (accessed Feb 6, 2019). <https://doi.org/10.4028/www.scientific.net/AMR.287-290.2626>.
- (100) Nicosia, A.; Gieparda, W.; Foksovicz-Flaczyk, J.; Walentowska, J.; Wesolek, D.; Vazquez, B.; Prodi, F.; Belosi, F. Air Filtration and Antimicrobial Capabilities of Electrospun PLA/PHB Containing Ionic Liquid. *Sep. Purif. Technol.* **2015**, *154*, 154–160. <https://doi.org/10.1016/j.seppur.2015.09.037>.
- (101) Nabil, B.; Morshed, M. N.; Ahmida, E. A.; Nemeshwaree, B.; Christine, C.; Julien, V.; Olivier, T.; Abdelkrim, A. Development of New Multifunctional Filter Based Nonwovens for Organics Pollutants Reduction and Detoxification: High Catalytic and Antibacterial Activities. *Chem. Eng. J.* **2019**, *356*, 702–716. <https://doi.org/10.1016/j.cej.2018.08.166>.
- (102) Woo, C. G.; Kang, J.-S.; Kim, H.-J.; Kim, Y.-J.; Han, B. Treatment of Air Filters Using the Antimicrobial Natural Products Propolis and Grapefruit Seed Extract for Deactivation of Bioaerosols. *Aerosol Sci. Technol.* **2015**, *49* (8), 611–619. <https://doi.org/10.1080/02786826.2015.1054983>.
- (103) Goetzendorf-Grabowska, B.; Polus, Z.; Kiwała, M.; Karaszewska, A.; Kamińska, I.; Mączka, I. Antibacterial Air Filter Nonwovens Modified by Poly(Lactide) Microspheres Containing Triclosan. *Fibres Text. East. Eur.* **2015**, *Nr 1* (109).
- (104) Han, B.; Kang, J.-S.; Kim, H.-J.; Woo, C.-G.; Kim, Y.-J. Investigation of Antimicrobial Activity of Grapefruit Seed Extract and Its Application to Air Filters with Comparison to Propolis and

- Shiitake. *Aerosol Air Qual. Res.* **2015**, *15* (3), 1035–1044. <https://doi.org/10.4209/aaqr.2014.09.0208>.
- (105) Ren, Y.; Guo, J.; Lu, Q.; Xu, D.; Qin, J.; Yan, F. Polypropylene Nonwoven Fabric@Poly(Ionic Liquid)s for Switchable Oil/Water Separation, Dye Absorption, and Antibacterial Applications. *ChemSusChem* **2018**, *11* (6), 1092–1098. <https://doi.org/10.1002/cssc.201702320>.
- (106) Majchrzycka, K.; Okrasa, M.; Szulc, J.; Brycki, B.; Gutarowska, B. Time-Dependent Antimicrobial Activity of Filtering Nonwovens with Gemini Surfactant-Based Biocides. *Mol. Basel Switz.* **2017**, *22* (10). <https://doi.org/10.3390/molecules22101620>.
- (107) Wang, J. Preparation and Characterization of the Anti-Virus and Anti-Bacteria Composite Air Filter Materials. *Sci. China Technol. Sci.* **2013**, *56* (1), 48–52. <https://doi.org/10.1007/s11431-012-5069-1>.
- (108) Ekabutr, P.; Chuysinuan, P.; Suksamrarn, S.; Sukhumsirichart, W.; Hongmanee, P.; Supaphol, P. Development of Antituberculosis Melt-Blown Polypropylene Filters Coated with Mangosteen Extracts for Medical Face Mask Applications. *Polym. Bull.* **2018**. <https://doi.org/10.1007/s00289-018-2468-x>.
- (109) Demir, B.; Cerkez, I.; Worley, S. D.; Broughton, R. M.; Huang, T.-S. N-Halamine-Modified Antimicrobial Polypropylene Nonwoven Fabrics for Use against Airborne Bacteria. *ACS Appl. Mater. Interfaces* **2015**, *7* (3), 1752–1757. <https://doi.org/10.1021/am507329m>.
- (110) Cerkez, I.; Worley, S. D.; Broughton, R. M.; Huang, T. S. Antimicrobial Surface Coatings for Polypropylene Nonwoven Fabrics. *React. Funct. Polym.* **2013**, *73* (11), 1412–1419. <https://doi.org/10.1016/j.reactfunctpolym.2013.07.016>.
- (111) Gutarowska, B.; Brycki, B.; Majchrzycka, K.; Brochocka, A. New Bioactive Polymer Filtering Material Composed of Nonwoven Polypropylene Containing Alkylammonium Microbiocides on a Perlite Carrier. *Polimery* **2010**, *55* (07/08), 568–574. <https://doi.org/10.14314/polimery.2010.568>.
- (112) Sójka-Ledakowicz, J.; Chruściel, J. J.; Kudzin, M. H.; Łatwińska, M.; Kiwała, M. Antimicrobial Functionalization of Textile Materials with Copper Silicate. *Fibres Text. East. Eur.* **2016**, *Nr 5* (119).
- (113) Majchrzycka, K.; Gutarowska, B.; Brochocka, A. Aspects of Tests and Assessment of Filtering Materials Used for Respiratory Protection Against Bioaerosols. Part I: Type of Active Substance, Contact Time, Microorganism Species. *Int. J. Occup. Saf. Ergon.* **2010**, *16* (2), 263–273. <https://doi.org/10.1080/10803548.2010.11076841>.
- (114) Abou-Elela, S. I.; Ibrahim, H. S.; Kamel, M. M.; Gouda, M. Application of Nanometal Oxides In Situ in Nonwoven Polyester Fabric for the Removal of Bacterial Indicators of Pollution from Wastewater. *Sci. World J.* **2014**, *2014*, 1–7. <https://doi.org/10.1155/2014/950348>.
- (115) Detsri, E.; Kamhom, K.; Ruen-ngam, D. Layer-by-Layer Deposition of Green Synthesised Silver Nanoparticles on Polyester Air Filters and Its Antimicrobial Activity. *J. Exp. Nanosci.* **2016**, *11* (12), 930–939. <https://doi.org/10.1080/17458080.2016.1181277>.
- (116) Cerkez, I.; Worley, S. D.; Broughton, R. M.; Huang, T. S. Rechargeable Antimicrobial Coatings for Poly(Lactic Acid) Nonwoven Fabrics. *Polymer* **2013**, *54* (2), 536–541. <https://doi.org/10.1016/j.polymer.2012.11.049>.
- (117) Hwang, G. B.; Heo, K. J.; Yun, J. H.; Lee, J. E.; Lee, H. J.; Nho, C. W.; Bae, G.-N.; Jung, J. H. Antimicrobial Air Filters Using Natural Euscaphis Japonica Nanoparticles. *PloS One* **2015**, *10* (5), e0126481. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0126481>.
- (118) Jung, J. H.; Lee, J. E.; Bae, G.-N. Use of Electrospayed Sophora Flavescens Natural-Product Nanoparticles for Antimicrobial Air Filtration. *J. Aerosol Sci.* **2013**, *57*, 185–193. <https://doi.org/10.1016/j.jaerosci.2012.09.004>.
- (119) Cusola, O.; Tabary, N.; Belgacem, M. N.; Bras, J. Cyclodextrin Functionalization of Several Cellulosic Substrates for Prolonged Release of Antibacterial Agents. *J. Appl. Polym. Sci.* **2013**, *129* (2), 604–613. <https://doi.org/10.1002/app.38748>.
- (120) Li, X.; Sun, J.; Che, Y.; Lv, Y.; Liu, F. Antibacterial Properties of Chitosan Chloride-Graphene Oxide Composites Modified Quartz Sand Filter Media in Water Treatment. *Int. J. Biol. Macromol.* **2019**, *121*, 760–773. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2018.10.123>.

- (121) Wang, Z.; Yan, F.; Pei, H.; Li, J.; Cui, Z.; He, B. Antibacterial and Environmentally Friendly Chitosan/Polyvinyl Alcohol Blend Membranes for Air Filtration. *Carbohydr. Polym.* **2018**, *198*, 241–248. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2018.06.090>.
- (122) Ren, T.; Dormitorio, T. V.; Qiao, M.; Huang, T.-S.; Weese, J. N-Halamine Incorporated Antimicrobial Nonwoven Fabrics for Use against Avian Influenza Virus. *Vet. Microbiol.* **2018**, *218*, 78–83. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2018.03.032>.
- (123) Wen, S. Antiviral and Antibacterial Respirator Mask. WO/2003/051460, June 27, 2003.
- (124) Tsutsumi, K. Mask and Graft Polymer Extract. Japanese Patent No. JP 2009225930 A, 2009.
- (125) Sundarrajan, S.; Tan, K. L.; Lim, S. H.; Ramakrishna, S. Electrospun Nanofibers for Air Filtration Applications. *Procedia Eng.* **2014**, *75*, 159–163. <https://doi.org/10.1016/j.proeng.2013.11.034>.
- (126) Schönemyr, L.; Holmberg, K.; Persson, D. Antimicrobial and Antiviral Product, July 7, 2006.
- (127) Nguyen, Q. T.; Lebrun, L. Antiviral Filter and Use Thereof in an Air Purifier, Air Conditioner or Air Humidifier, January 25, 2008.
- (128) Biedermann, K.; Deng, F.; King, S.; Middleton, A.; Oths, P. Anti-Viral Face Mask and Filter Material, January 25, 2008.
- (129) Nonomura, A. Virucidal/Germicidal Mask, October 26, 2007.
- (130) Iida, Y.; Tomio, H.; Yuzo, T. Antibacterial and Antiviral Material. Japanese Patent No. JP200423428, 2004.
- (131) Kazuo, N.; Yoshikazu, T. Gargling Cup, Antiviral Mask, Antiviral Filter, Antifungal, Antibacterial, And Antiviral Filter Air Cleaner And Air-Cleaner Humidifier. US 5888527 A, April 25, 1997.
- (132) Nashimoto, K.; Tashiro, Y.; Kosaka, Y.; Hara, Y. Antiviral Filter Air Cleaner Impregnated with Tea Extract. US5747053A, May 5, 1998.
- (133) Kim, H. J.; Pant, H. R.; Kim, C. S. NOVEL COMPOSITE POLYACRYLONITRILE (PAN) ELECTROSPUN FIBROUS MEMBRANE FOR HIGH-PERFORMANCE WATER FILTRATION. 8.
- (134) Wang, Z.; Pan, Z.; Wang, J.; Zhao, R. A Novel Hierarchical Structured Poly(lactic acid)/Titania Fibrous Membrane with Excellent Antibacterial Activity and Air Filtration Performance <https://www.hindawi.com/journals/jnm/2016/6272983/> (accessed Feb 7, 2019). <https://doi.org/10.1155/2016/6272983>.
- (135) Choi, J.; Yang, B. J.; Bae, G.-N.; Jung, J. H. Herbal Extract Incorporated Nanofiber Fabricated by an Electrospinning Technique and Its Application to Antimicrobial Air Filtration. *ACS Appl. Mater. Interfaces* **2015**, *7* (45), 25313–25320. <https://doi.org/10.1021/acsami.5b07441>.
- (136) Purwar, R.; Sai Goutham, K.; Srivastava, C. M. Electrospun Sericin/PVA/Clay Nanofibrous Mats for Antimicrobial Air Filtration Mask. *Fibers Polym.* **2016**, *17* (8), 1206–1216. <https://doi.org/10.1007/s12221-016-6345-7>.
- (137) Pharmacopée Européenne : Huiles Essentielles - Aetherolea (01/2008 :2098).
- (138) Norme ISO 9235:2013, Matières Premières Aromatiques Naturelles - Vocabulaire.
- (139) Desramaux, M. Huiles essentielles en dermocosmétologie. **2018**, 146.
- (140) Zengin, H.; Baysal, A. H. Antibacterial and Antioxidant Activity of Essential Oil Terpenes against Pathogenic and Spoilage-Forming Bacteria and Cell Structure-Activity Relationships Evaluated by SEM Microscopy. *Mol. Basel Switz.* **2014**, *19* (11), 17773–17798. <https://doi.org/10.3390/molecules19117773>.
- (141) Inouye, S.; Takizawa, T.; Yamaguchi, H. Antibacterial Activity of Essential Oils and Their Major Constituents against Respiratory Tract Pathogens by Gaseous Contact. *J. Antimicrob. Chemother.* **2001**, *47* (5), 565–573. <https://doi.org/10.1093/jac/47.5.565>.
- (142) Singh, D.; Kumar, T. R. S.; Gupt, V. K.; Chaturvedi, P. Antimicrobial Activity of Some Promising Plant Oils, Molecules and Formulations. *Indian J. Exp. Biol.* **2012**, *50* (10), 714–717.
- (143) Couic-Marinié, F.; Lobstein, A. Composition Chimique Des Huiles Essentielles. *Actual. Pharm.* **2013**, *52* (525), 22–25. <https://doi.org/10.1016/j.actpha.2013.02.006>.
- (144) Deans, S. G.; Ritchie, G. Antibacterial Properties of Plant Essential Oils. *Int. J. Food Microbiol.* **1987**, *5* (2), 165–180. [https://doi.org/10.1016/0168-1605\(87\)90034-1](https://doi.org/10.1016/0168-1605(87)90034-1).

- (145) Burt, S. Essential Oils: Their Antibacterial Properties and Potential Applications in Foods—a Review. *Int. J. Food Microbiol.* **2004**, *94* (3), 223–253. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2004.03.022>.
- (146) LENS-LISBONNE C; CREMIEUX A; Maillard, C. Méthodes d'évaluation de l'activité antibactérienne des huiles essentielles : application aux essences de thym et de cannelle. **1987**.
- (147) Abdali, H. Development of Antibacterial Structures and Films Using Ground Plants, Extracts/Essential Oils. masters, École Polytechnique de Montréal, 2014.
- (148) McGimpsey, J. A.; Douglas, M. H.; Van Klink, J. W.; Beauregard, D. A.; Perry, N. B. Seasonal Variation in Essential Oil Yield and Composition from Naturalized *Thymus Vulgaris* L. in New Zealand. *Flavour Fragr. J.* **1994**, *9* (6), 347–352. <https://doi.org/10.1002/ffj.2730090613>.
- (149) Cosentino, S.; Tuberoso, C. I.; Pisano, B.; Satta, M.; Mascia, V.; Arzedi, E.; Palmas, F. In-Vitro Antimicrobial Activity and Chemical Composition of Sardinian *Thymus* Essential Oils. *Lett. Appl. Microbiol.* **1999**, *29* (2), 130–135.
- (150) Marino, M.; Bersani, C.; Comi, G. Antimicrobial Activity of the Essential Oils of *Thymus Vulgaris* L. Measured Using a Bioimpedometric Method. *J. Food Prot.* **1999**, *62* (9), 1017–1023.
- (151) Daferera, D. J.; Ziogas, B. N.; Polissiou, M. G. GC-MS Analysis of Essential Oils from Some Greek Aromatic Plants and Their Fungitoxicity on *Penicillium Digitatum*. *J. Agric. Food Chem.* **2000**, *48* (6), 2576–2581.
- (152) Juliano, C.; Mattana, A.; Usai, M. Composition and in Vitro Antimicrobial Activity of the Essential Oil of *Thymus Herba-Barona* Loisel Growing Wild in Sardinia. *J. Essent. Oil Res.* **2000**, *12* (4), 516–522. <https://doi.org/10.1080/10412905.2000.9699578>.
- (153) Delaquis, P. J.; Stanich, K.; Girard, B.; Mazza, G. Antimicrobial Activity of Individual and Mixed Fractions of Dill, Cilantro, Coriander and Eucalyptus Essential Oils. *Int. J. Food Microbiol.* **2002**, *74* (1–2), 101–109. [https://doi.org/10.1016/S0168-1605\(01\)00734-6](https://doi.org/10.1016/S0168-1605(01)00734-6).
- (154) Pintore, G.; Usai, M.; Bradesi, P.; Juliano, C.; Boatto, G.; Tomi, F.; Chessa, M.; Cerri, R.; Casanova, J. Chemical Composition and Antimicrobial Activity of *Rosmarinus Officinalis* L. Oils from Sardinia and Corsica. *Flavour Fragr. J.* **2002**, *17* (1), 15–19. <https://doi.org/10.1002/ffj.1022>.
- (155) Daferera, D. J.; Ziogas, B. N.; Polissiou, M. G. The Effectiveness of Plant Essential Oils on the Growth of *Botrytis Cinerea*, *Fusarium* Sp. and *Clavibacter Michiganensis* Subsp. *Michiganensis*. *Crop Prot.* **2003**, *22* (1), 39–44. [https://doi.org/10.1016/S0261-2194\(02\)00095-9](https://doi.org/10.1016/S0261-2194(02)00095-9).
- (156) Lawrence, B. M. The Botanical and Chemical Aspects of Oregano. *Perfum. Flavorist* **1984**, *9* (5), 41–51.
- (157) Prudent, D.; Perineau, F.; Bessiere, J. M.; Michel, G. M.; Baccou, J. C. Analysis of the Essential Oil of Wild Oregano from Martinique (*Coleus Aromaticus* Benth.)—Evaluation of Its Bacteriostatic and Fungistatic Properties. *J. Essent. Oil Res.* **1995**, *7* (2), 165–173. <https://doi.org/10.1080/10412905.1995.9698492>.
- (158) Charai, M.; Mosaddak, M.; Faid, M. Chemical Composition and Antimicrobial Activities of Two Aromatic Plants: *Origanum Majorana* L. and *O. Compactum* Benth. *J. Essent. Oil Res.* **1996**, *8* (6), 657–664. <https://doi.org/10.1080/10412905.1996.9701036>.
- (159) Sivropoulou, A.; Kokkini, S.; Lanaras, T.; Arsenakis, M. Antimicrobial Activity of Mint Essential Oils. *J. Agric. Food Chem.* **1995**, *43* (9), 2384–2388. <https://doi.org/10.1021/jf00057a013>.
- (160) Kokkini, S.; Karousou, R.; Dardioti, A.; Krigas, N.; Lanaras, T. Autumn Essential Oils of Greek Oregano. *Phytochemistry* **1997**, *44* (5), 883–886. [https://doi.org/10.1016/S0031-9422\(96\)00576-6](https://doi.org/10.1016/S0031-9422(96)00576-6).
- (161) Russo, M.; Galletti, G. C.; Bocchini, P.; Carnacini, A. Essential Oil Chemical Composition of Wild Populations of Italian Oregano Spice (*Origanum Vulgare* Ssp. *Hirtum* (Link) Ietswaart): A Preliminary Evaluation of Their Use in Chemotaxonomy by Cluster Analysis. 1. Inflorescences. *J. Agric. Food Chem.* **1998**, *46* (9), 3741–3746. <https://doi.org/10.1021/jf980087w>.
- (162) Demetzos, C.; Perdetzoglou, D. K.; Tan, K. Composition and Antimicrobial Studies of the Oils of *Origanum Calcaratum* Juss. and *O. Scabrum* Boiss. et Heldr. from Greece. *J. Essent. Oil Res.* **2001**, *13* (6), 460–462. <https://doi.org/10.1080/10412905.2001.9699729>.

- (163) Marino, M.; Bersani, C.; Comi, G. Impedance Measurements to Study the Antimicrobial Activity of Essential Oils from Lamiaceae and Compositae. *Int. J. Food Microbiol.* **2001**, *67* (3), 187–195.
- (164) Bauer, K.; Garbe, D.; Surburg, H. Front Matter and Index. In *Common Fragrance and Flavor Materials*; Wiley-VCH Verlag GmbH, 2001; pp i–xii.
- (165) Hammer, K. A.; Carson, C. F.; Riley, T. V. Antimicrobial Activity of Essential Oils and Other Plant Extracts. *J. Appl. Microbiol.* **1999**, *86* (6), 985–990. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2672.1999.00780.x>.
- (166) Dorman, H. J. D.; Deans, S. G. Antimicrobial Agents from Plants: Antibacterial Activity of Plant Volatile Oils. *J. Appl. Microbiol.* **2000**, *88* (2), 308–316. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2672.2000.00969.x>.
- (167) Hayashi, M. A.; Bizerra, F. C.; Da Silva, P. I. Antimicrobial Compounds from Natural Sources. *Front. Microbiol.* **2013**, *4*. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2013.00195>.
- (168) Tarek, N.; Hassan, H. M.; AbdelGhani, S. M. M.; Radwan, I. A.; Hammouda, O.; El-Gendy, A. O. Comparative Chemical and Antimicrobial Study of Nine Essential Oils Obtained from Medicinal Plants Growing in Egypt. *Beni-Suef Univ. J. Basic Appl. Sci.* **2014**, *3* (2), 149–156. <https://doi.org/10.1016/j.bjbas.2014.05.009>.
- (169) Randrianarivelo, R.; Sarter, S.; Odoux, E.; Brat, P.; Lebrun, M.; Romestand, B.; Menut, C.; Andrianoelisoa, H. S.; Raherimandimby, M.; Danthu, P. Composition and Antimicrobial Activity of Essential Oils of *Cinnamosma Fragrans*. *Food Chem.* **2009**, *114* (2), 680–684.
- (170) Nazzaro, F.; Fratianni, F.; De Martino, L.; Coppola, R.; De Feo, V. Effect of Essential Oils on Pathogenic Bacteria. *Pharmaceuticals* **2013**, *6* (12), 1451–1474. <https://doi.org/10.3390/ph6121451>.
- (171) Les huiles essentielles, un pouvoir antimicrobien avéré - Aromathérapie scientifique - Nutranews <http://www.nutranews.org/sujet.pl?id=58> (accessed Oct 14, 2015).
- (172) Gea, A. *Illustration Pour Le Compte Des Laboratoires Dumani - Mode d'action Des Huiles Essentielles Sur Les Bactéries*; 2018.
- (173) Goetz, P.; Ghédira, K. *Phytothérapie anti-infectieuse*; Collection phytothérapie practice; Springer: Paris, 2012.
- (174) Andrews, J. M. Determination of Minimum Inhibitory Concentrations. *J. Antimicrob. Chemother.* **2001**, *48* (suppl 1), 5–16. https://doi.org/10.1093/jac/48.suppl_1.5.
- (175) Rios, J. L.; Recio, M. C.; Villar, A. Screening Methods for Natural Products with Antimicrobial Activity: A Review of the Literature. *J. Ethnopharmacol.* **1988**, *23* (2), 127–149. [https://doi.org/10.1016/0378-8741\(88\)90001-3](https://doi.org/10.1016/0378-8741(88)90001-3).
- (176) Soković, M.; Glamčević, J.; Marin, P. D.; Brkić, D.; van Griensven, L. J. L. D. Antibacterial Effects of the Essential Oils of Commonly Consumed Medicinal Herbs Using an in Vitro Model. *Mol. Basel Switz.* **2010**, *15* (11), 7532–7546. <https://doi.org/10.3390/molecules15117532>.
- (177) Lambert, R. J. W.; Skandamis, P. N.; Coote, P. J.; Nychas, G.-J. E. A Study of the Minimum Inhibitory Concentration and Mode of Action of Oregano Essential Oil, Thymol and Carvacrol. *J. Appl. Microbiol.* **2001**, *91* (3), 453–462. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2672.2001.01428.x>.
- (178) Martínez-Alonso, A.; Losada-Barreiro, S.; Bravo-Díaz, C. Encapsulation and Solubilization of the Antioxidants Gallic Acid and Ethyl, Propyl and Butyl Gallate with β -Cyclodextrin. *J. Mol. Liq.* **2015**, *210*, Part A, 143–150. <https://doi.org/10.1016/j.molliq.2014.12.016>.
- (179) Juliane A. Kamimura, E. H. S. Antimicrobial and Antioxidant Activities of Carvacrol Microencapsulated in Hydroxypropyl-Beta-Cyclodextrin. *LWT - Food Sci. Technol.* **2014**, *57* (2), 701–709. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2014.02.014>.
- (180) Del Valle, E. M. M. Cyclodextrins and Their Uses: A Review. *Process Biochem.* **2004**, *39* (9), 1033–1046. [https://doi.org/10.1016/S0032-9592\(03\)00258-9](https://doi.org/10.1016/S0032-9592(03)00258-9).
- (181) Pinho, E.; Soares, G.; Henriques, M. Cyclodextrin Modulation of Gallic Acid in Vitro Antibacterial Activity. *J. Incl. Phenom. Macrocycl. Chem.* **2014**, *81* (1–2), 205–214. <https://doi.org/10.1007/s10847-014-0449-8>.
- (182) Dann, A. B.; Hontela, A. Triclosan: Environmental Exposure, Toxicity and Mechanisms of Action. *J. Appl. Toxicol. JAT* **2011**, *31* (4), 285–311. <https://doi.org/10.1002/jat.1660>.
- (183) Kfoury, M.; Fourmentin, S.; Auezova, L.; Greige-Gerges, H. Effets Des Substituants de Phénylpropènes Sur La Stabilité d'encapsulation Dans Les Cyclodextrines.

- (184) Liu, M.; Zheng, Y.; Wang, C.; Xie, J.; Wang, B.; Wang, Z.; Han, J.; Sun, D.; Niu, M. Improved Stability of (+)-Catechin and (–)-Epicatechin by Complexing with Hydroxypropyl- β -Cyclodextrin: Effect of PH, Temperature and Configuration. *Food Chem.* **2016**, *196*, 148–154. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2015.09.016>.
- (185) Barba, C.; Eguinoa, A.; Ignacio Mate, J. Preparation and Characterization of Beta-Cyclodextrin Inclusion Complexes as a Tool of a Controlled Antimicrobial Release in Whey Protein Edible Films. *Lwt-Food Sci. Technol.* **2015**, *64* (2), 1362–1369. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2015.07.060>.
- (186) Dias, K.; Nikolaou, S.; De Giovanni, W. F. Synthesis and Spectral Investigation of Al(III) Catechin/ β -Cyclodextrin and Al(III) Quercetin/ β -Cyclodextrin Inclusion Compounds. *Spectrochim. Acta. A. Mol. Biomol. Spectrosc.* **2008**, *70* (1), 154–161. <https://doi.org/10.1016/j.saa.2007.07.022>.
- (187) Kfoury, M.; Auezova, L.; Fourmentin, S.; Greige-Gerges, H. Investigation of Monoterpenes Complexation with Hydroxypropyl- β -Cyclodextrin. *J. Incl. Phenom. Macrocycl. Chem.* **2014**, *80* (1–2), 51–60. <https://doi.org/10.1007/s10847-014-0385-7>.
- (188) Marreto, R. N.; Almeida, E. E. C. V.; Alves, P. B.; Niculau, E. S.; Nunes, R. S.; Matos, C. R. S.; Araújo, A. A. S. Thermal Analysis and Gas Chromatography Coupled Mass Spectrometry Analyses of Hydroxypropyl- β -Cyclodextrin Inclusion Complex Containing Lippia Gracilis Essential Oil. *Thermochim. Acta* **2008**, *475* (1–2), 53–58. <https://doi.org/10.1016/j.tca.2008.06.015>.
- (189) Santos, E. H.; Kamimura, J. A.; Hill, L. E.; Gomes, C. L. Characterization of Carvacrol Beta-Cyclodextrin Inclusion Complexes as Delivery Systems for Antibacterial and Antioxidant Applications. *Lwt-Food Sci. Technol.* **2015**, *60* (1), 583–592. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2014.08.046>.
- (190) Higuchi, T.; Connors, K. A. Phase Solubility Techniques. *Adv. Anal. Chem. Instrum.* **1965**, *4*, 117–212.
- (191) Olga, G.; Styliani, C.; Ioannis, R. G. Coencapsulation of Ferulic and Gallic Acid in Hp-b-Cyclodextrin. *Food Chem.* **2015**, *185*, 33–40. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2015.03.058>.
- (192) Decock, G.; Landy, D.; Surpateanu, G.; Fourmentin, S. Study of the Retention of Aroma Components by Cyclodextrins by Static Headspace Gas Chromatography. *J. Incl. Phenom. Macrocycl. Chem.* **2008**, *62* (3–4), 297–302. <https://doi.org/10.1007/s10847-008-9471-z>.
- (193) Zhan, H.; Jiang, Z.-T.; Wang, Y.; Li, R.; Dong, T.-S. Molecular Microcapsules and Inclusion Interactions of Eugenol with β -Cyclodextrin and Its Derivatives. *Eur. Food Res. Technol.* **2008**, *227* (5), 1507–1513. <https://doi.org/10.1007/s00217-008-0873-3>.
- (194) Decock, G.; Fourmentin, S.; Surpateanu, G. G.; Landy, D.; Decock, P.; Surpateanu, G. Experimental and Theoretical Study on the Inclusion Compounds of Aroma Components with β -Cyclodextrins. *Supramol. Chem.* **2006**, *18* (6), 477–482. <https://doi.org/10.1080/10610270600665749>.
- (195) Challa, R.; Ahuja, A.; Ali, J.; Khar, R. K. Cyclodextrins in Drug Delivery: An Updated Review. *AAPS PharmSciTech* **2005**, *6* (2), E329–357. <https://doi.org/10.1208/pt060243>.
- (196) Aicart, E.; Junquera, E. Complex Formation between Purine Derivatives and Cyclodextrins: A Fluorescence Spectroscopy Study. *J. Incl. Phenom. Macrocycl. Chem.* **2003**, *47* (3–4), 161–165. <https://doi.org/10.1023/B:JIPH.0000011786.89533.0e>.
- (197) Shah, B.; Davidson, P. M.; Zhong, Q. Nanodispersed Eugenol Has Improved Antimicrobial Activity against Escherichia Coli O157:H7 and Listeria Monocytogenes in Bovine Milk. *Int. J. Food Microbiol.* **2013**, *161* (1), 53–59. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2012.11.020>.
- (198) Pei, R.; Zhou, F.; Ji, B.; Xu, J. Evaluation of Combined Antibacterial Effects of Eugenol, Cinnamaldehyde, Thymol, and Carvacrol against E. Coli with an Improved Method. *J. Food Sci.* **2009**, *74* (7), M379–M383. <https://doi.org/10.1111/j.1750-3841.2009.01287.x>.
- (199) Chen, F.; Shi, Z.; Neoh, K. G.; Kang, E. T. Antioxidant and Antibacterial Activities of Eugenol and Carvacrol-Grafted Chitosan Nanoparticles. *Biotechnol. Bioeng.* **2009**, *104* (1), 30–39. <https://doi.org/10.1002/bit.22363>.
- (200) Abel Guarda, J. F. R. The Antimicrobial Activity of Microencapsulated Thymol and Carvacrol. *Int. J. Food Microbiol.* **2011**, *146* (2), 144–150. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2011.02.011>.

- (201) White, S. B. Antibacterial Efficacy of Phosvitin, Carvacrol, or Nisin Alone or Combined against Foodborne Human Enteric Pathogens. **2011**.
- (202) ZR, Z. M. T. Microbiological Characterization of Pure Geraniol and Comparison with Bactericidal Activity of the Cinnamic Acid in Gram-Positive and Gram-Negative Bacteria. *J. Microb. Amp Biochem. Technol.* **2015**, 07 (04). <https://doi.org/10.4172/1948-5948.1000203>.
- (203) Kim, J. m.; Marshall, Mr.; Cornell, J. a.; Iii, J. f. P.; Wei, C. i. Antibacterial Activity of Carvacrol, Citral, and Geraniol against Salmonella Typhimurium in Culture Medium and on Fish Cubes. *J. Food Sci.* **1995**, 60 (6), 1364–1368. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.1995.tb04592.x>.
- (204) Kyaw, B. M.; arora, S.; Lim, C. S. Bactericidal Antibiotic-Phytochemical Combinations against Methicillin Resistant Staphylococcus Aureus. *Braz. J. Microbiol.* **2012**, 43 (3), 938–945. <https://doi.org/10.1590/S1517-838220120003000013>.

Chapitre II : Elaboration de mâts nanofibreux antibactériens par electrospinning

Introduction

Cette partie porte sur l'élaboration de mats non tissés antibactériens élaborés à base de PHAs et de complexes d'inclusion cyclodextrine (CD)/huiles essentielles. L'intérêt des CD est d'assurer une diffusion contrôlée des molécules bioactives au cours du temps compatible avec l'application envisagée. Cette stratégie est tout à fait adaptée à l'utilisation des composés terpéniques ou phénoliques volatils. Dans la partie bibliographique précédente, une étude a été réalisée de manière à réaliser un criblage de molécules naturelles en particulier extraites des huiles essentielles dont les propriétés antibactériennes sont avérées. Les cinq molécules sélectionnées suite à cette étude sont l'eugénol, le carvacrol, le géraniol, le linalol et l'acide gallique. La première partie de ce chapitre permettra de conforter, par une étude *in vitro*, les propriétés antibactériennes des molécules choisies. La deuxième partie est consacrée à l'élaboration des mats nanofibreux en PHA par électrospinning en incorporant des complexes d'inclusion à base de cyclodextrine et de carvacrol, molécule choisie au terme de l'étude *in vitro* des différents composés. Les résultats de ces travaux sont rédigés en anglais sous la forme d'un article qui sera prochainement soumis.

II-1. Etude de l'activité antibactérienne

L'activité antibactérienne a été évaluée pour les cinq molécules retenues. La méthode de dilution en milieu liquide a été utilisée afin de déterminer la Concentration Minimale Inhibitrice (MIC). La MIC₅₀ est définie comme étant la concentration la plus basse d'un agent antimicrobien permettant d'inhiber 50% de croissance d'un microorganisme après une nuit d'incubation¹. Ce test va permettre d'identifier le composé ayant la MIC la plus basse et qui sera utilisé pour la suite de notre étude.

II-1-1. Tests de dilution en milieu liquide

La méthode de dilution en milieu liquide consiste à tester, pour une suspension bactérienne (*inoculum*), une gamme de concentration croissante d'agent antibactérien. Les tests sont réalisés à l'aide d'une microplaque à 96 trous (**Figure 14**), dans lesquels sont introduites les solutions contenant le milieu de culture et l'agent antibactérien avec des concentrations croissantes (C₀ à C₁₀). L'*inoculum* est ensuite ajouté et la plaque est incubée à 30°C pendant 24h. Les tests ont été réalisés pour deux souches : *E.coli* et *S.aureus*.

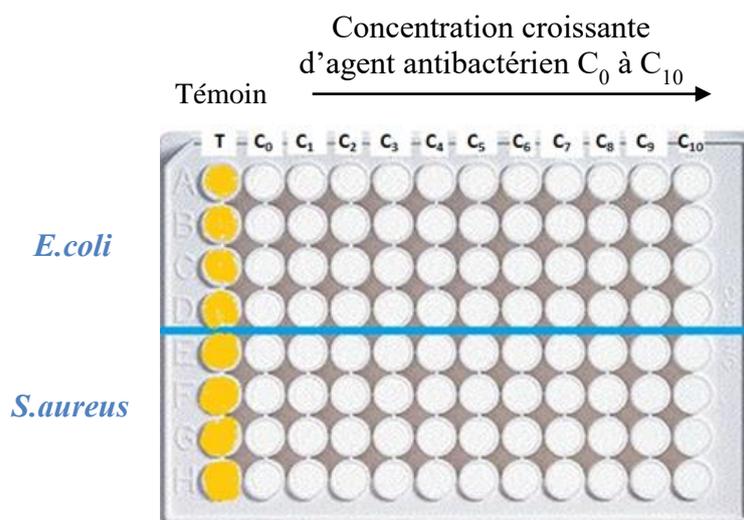


Figure 14. Microplaque de 96 trous

Sur cette plaque :

- Les 4 premières lignes de la plaque (A à D) correspondent aux solutions dans lesquelles on aura inoculé la bactérie *E. coli*.
- Les 4 dernières lignes (E à H) correspondent aux solutions dans lesquelles on aura inoculé la bactérie *S. aureus*.
- Les colonnes (C₀ à C₁₀) correspondent à la gamme de concentration de l'agent antibactérien à tester.

La première colonne (T) est la colonne témoin qui ne contient que le milieu de culture, afin de s'assurer que celle-ci ne soit pas contaminée initialement ou lors des analyses. La deuxième colonne (C₀) correspond au témoin de croissance de la souche à tester. Aucun agent bactérien n'est ajouté (C₀=0 g/L).

Le suivi de la croissance des bactéries est effectué toutes les 2 heures pendant 24h par spectrophotométrie UV-visible, en mesurant l'absorbance à $\lambda = 600$ nm. Dans un premier temps, le tracé de la densité optique en fonction du temps permet de rendre compte de la croissance bactérienne et ainsi déterminer quelle concentration induit la mort des bactéries. Dans un deuxième temps, le graphique de la densité optique (correspondant à la croissance des bactéries) en fonction de la concentration permet de déterminer la concentration minimale d'inhibition (MIC) obtenue à 50% d'inhibition. Les essais ont été réalisés en duplicate. Les résultats concernant le carvacrol sont décrits et pour les autres composés, les valeurs de la MIC sont regroupées dans le **Tableau 16**.

II-1-2. Résultats

Une gamme de concentration allant de $C_0=0 \text{ g.L}^{-1}$ à $C_{10}=1 \text{ g.L}^{-1}$ a été testée pour le carvacrol (Figure 15). La concentration C_0 correspond à une concentration nulle en carvacrol, et constitue la référence. A partir de 0.1 g.L^{-1} pour *E. coli* et 0.5 g.L^{-1} pour *S. aureus*, l'inhibition des bactéries est totale.

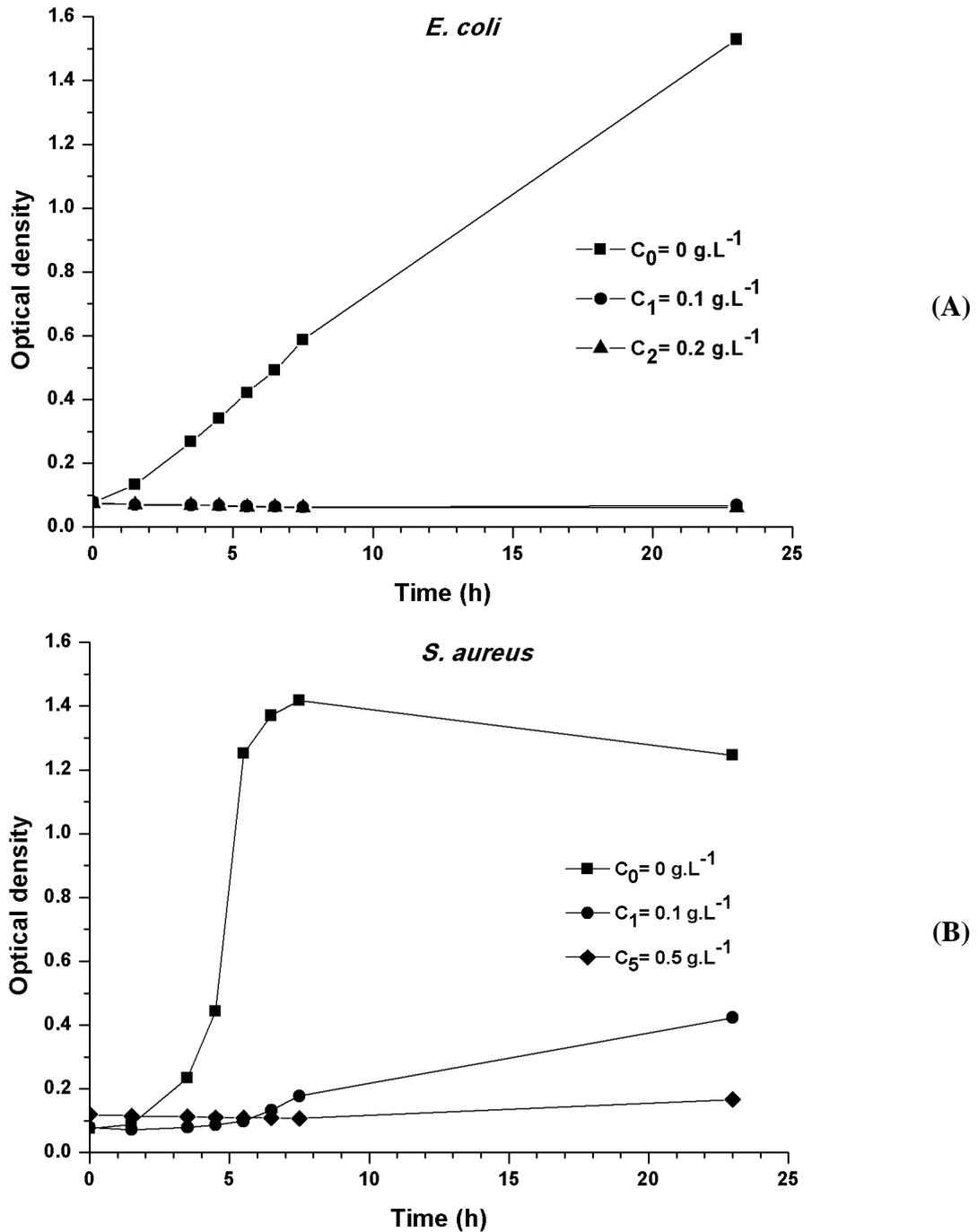
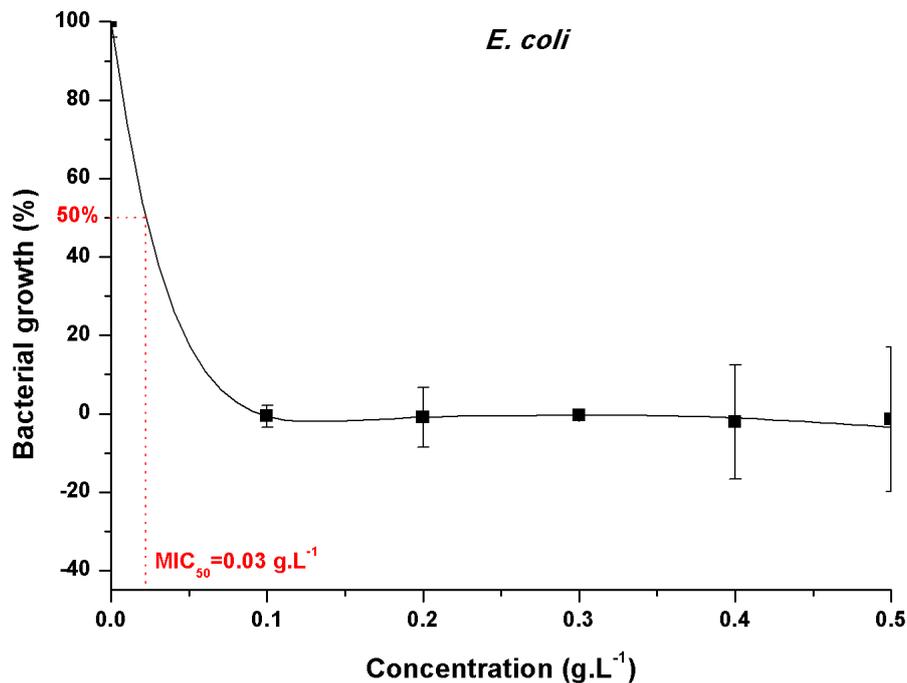


Figure 15. Croissance de *E. coli* (A) et *S. aureus* (B) pour différentes concentrations de carvacrol

Le pourcentage de croissance bactérienne en fonction de la concentration à partir des mesures de densité optique (DO) précédentes est défini par l'équation 1.

$$\text{équation 1} \quad \text{Croissance bactérienne (\%)} = \left(\frac{DO_{C_0} - DO_{C_i}}{DO_{C_0}} \right)_t \times 100$$

avec DO_{C_0} la densité optique pour une concentration nulle en carvacrol et DO_{C_i} la densité optique à une concentration donnée de carvacrol ($C_1 < C_i < C_{10}$). Pour le calcul du pourcentage de croissance les valeurs de DO pour un temps d'incubation $t=24h$ sont prises en compte. Les courbes du pourcentage de croissance bactérienne en fonction de la croissance permettent de déterminer la MIC_{50} (Figure 16).



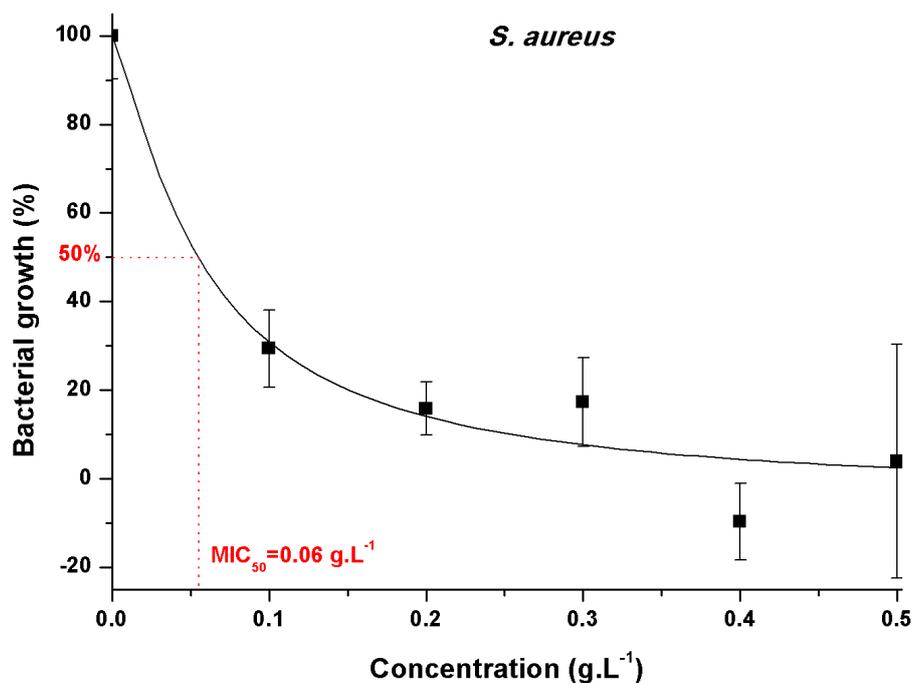


Figure 16. Croissance bactérienne à 24h pour *E. coli* et *S. aureus* en fonction de la concentration de carvacrol

Pour le carvacrol, on obtient des MIC de 0.03 g.L⁻¹ pour *E. coli* et 0.06 g.L⁻¹ pour *S. aureus*. Les valeurs sont légèrement plus faibles que celles trouvées dans la littérature (0.12-5 et 0.12-1.25 g.L⁻¹ pour *E. coli* et *S. aureus* respectivement) en raison d'une différence de méthodologie². Les MIC sont calculées pour tous les autres composés. Le **Tableau 16** regroupe les valeurs moyennes des MIC pour chaque composé.

Tableau 16. MIC expérimentales et théoriques pour les différents composés (en g.L⁻¹)

Composés	(MIC <i>E. coli</i>) _{exp}	(MIC <i>E. coli</i>) _{littérature}	(MIC <i>S. aureus</i>) _{exp}	(MIC <i>S. aureus</i>) _{littérature}
Acide gallique	2.62*	/	1.7*	1.024 ³
Carvacrol	0.08 ± 0.06	0.12 - 5 ⁴⁻⁸	0.24±0.25	0.12 - 1.25 ⁴⁻⁸
Eugénol	0.54 ± 0.12	0.8 à 3 ^{4,5,9-11}	0.66 ± 0.07	0.02 - 0.9 ^{4,5,11}
Géranol	0.16*	0.31 à 2.5 ^{4,12,13}	n.d	0.31 - 5 ^{4,12-14}

n.d non déterminée, * 1 mesure

Pour certains composés l'activité antibactérienne n'a pas pu être déterminée. En effet, pour le linalol les tests réalisés pour une gamme de concentration de 0 à 3 g.L⁻¹ n'ont pas permis d'inhiber totalement la croissance des bactéries après 24h. Il serait donc nécessaire d'augmenter la concentration pour détruire la totalité des bactéries ce qui n'apparaît pas pertinent dans le cadre de notre étude car il faudrait utiliser alors une trop grande quantité de linalol. Quant à l'acide tannique, celui-ci n'est pas soluble dans le milieu de culture et n'a donc pas pu être testé par cette méthode. La MIC de l'acide gallique est assez élevée mais le caractère non volatil de

l'acide gallique et sa fonction carboxylique réactive le rendent intéressant. Certaines molécules telles que le carvacrol, le géraniol et l'eugénol sont quant à eux plus efficaces, avec des MIC très faibles. Ayant la plus faible valeur de MIC, le carvacrol sera utilisé dans la deuxième partie pour l'encapsulation dans la cyclodextrine et l'électrospinning avec le PHBHV.

II-2. Electrospinning de nanofibres à base de PHA incorporant des complexes d'inclusion β -CD/Carvacrol aux propriétés antibactériennes

II-2-1. Introduction

Poly(3-hydroxyalkanoates) (PHAs) are a class of natural biodegradable polyesters accumulated by many bacteria as carbon and energy supply when an essential nutrient is limited. Using various substrates, a wide variety of PHAs are synthesized, differing notably by the length of the side chains¹⁵⁻¹⁷. Among them, the poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) PHBHV having lateral short chain lengths is the most widely known. Thanks to their biocompatibility and biodegradability, PHAs proved to be good candidates for medical applications¹⁸⁻²³ including biomedical devices, degradable drug carriers²⁴⁻²⁹ or for tissue engineering³⁰. Electrospinning is a suitable technique to obtain PHA nanofibers (NFs) that have been used as biocompatible scaffold³¹⁻³⁴. To improve the properties of electrospun NFs, chemical modifications have been carried out³³, bioactive molecules are directly incorporated into the fibers³⁵ or deposited at the surface of the NFs by the combined electrospinning/electrospraying process^{32,36}. Due to the emergence of antibiotic-resistant bacteria, the development of new antibacterial agents has become more than necessary. The exploration of natural resources appears to be one of the most promising^{37,38} because they constitute a large reserve of bioactive substances. The active molecules involved in the defensive mechanisms of plants are mostly concentrated in essential oils. The exploration of essential oils for the search for molecules with antibacterial activity therefore seems to be an interesting approach. The constituents of essential oils can be divided into two classes according to their biosynthetic pathway, the terpenoids and the phenylpropanoids. Among them carvacrol (5-isopropyl-2-methylphenol) extracted from oregano exhibits antibacterial, antifungal, antiviral, antitumor and anti-inflammatory properties³⁹⁻⁴². Entrapment of carvacrol by polymeric particles^{43,44} or molecular encapsulation by hydrophobic cavity of β -cyclodextrin (CD)⁴⁵⁻⁴⁸ have been used to extend its stability against evaporation and degradation. The CD, produced from starch by an enzymatic process is a cyclic oligosaccharide able to form non-covalent host guest inclusion complex (CD-IC) with a variety

of nonpolar molecules such as antioxidant, fragrance and essential oils⁴⁹. Carvacrol is really included inside the lipophilic CD cavity. The intermolecular hydrogen interactions in the carvacrol/CD-IC play an essential role with regard to the stability of these complexes. Concerning the orientation inside the CD cavity it has been shown that the methyl group of carvacrol is oriented toward the narrower rim of the CD cavity whereas the isopropyl group points to the wider rim^{48,50,51}. Carvacrol/modified-cyclodextrin inclusion complex fibers (carvacrol/CD-IC fibers) were recently produced *via* electrospinning⁵² and nanofibres have shown fast-dissolving properties in water.

In this context, the unique properties of biocompatible PHA nanofibers and the performance of the carvacrol/ β -cyclodextrin inclusion complexes (carv/CD-IC) systems are promising strategies to both combine antibacterial activity and biocompatibility of materials. The carv/CD-IC (**Figure 17**) were prepared and characterized by ¹H NMR, XRD and TGA analysis. Nanofibers based on PHBHV and carv/CD-IC were prepared by electrospinning in one step.

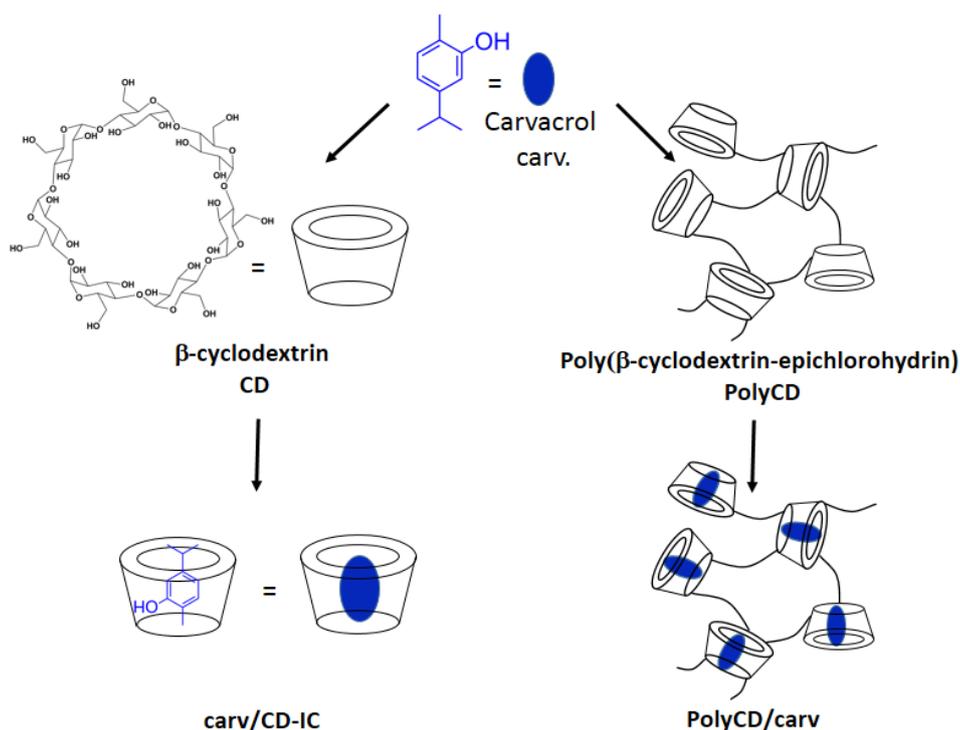


Figure 17. Chemical structures of carvacrol/CD-Inclusion complex and polyCD/carvacrol

In the objective to enhance content of carvacrol, β -cyclodextrin polymer, PolyCD, prepared by reaction between CD and epichlorohydrin under basic conditions⁵³, has been used. Due to its solubility in water, multilayered materials were prepared by combining two layers of

hydrophobic PHBHV containing a layer of PolyCD inside in a three steps electrospinning processes (**Figure 18**). Materials were analyzed by SEM, TGA and XRD. The influence of the proportion of the carv/CD-IC on thermal and morphological structure of the nanofibers was reported and their actions against the adhesion of both pathogenic bacteria strains *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli* were evaluated.

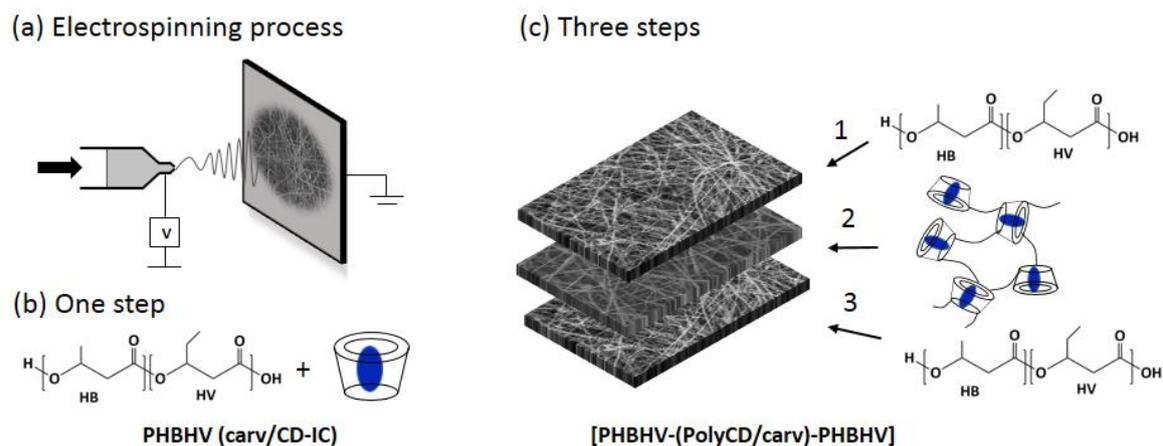


Figure 18. Schematic representations (a) electrospinning process (b) formation of PHBHV(carv/CD-IC) in one step (c) formation of 3-layered electrospun [PHBHV-(PolyCD/carv)-PHBHV]

II-2-2. Experimental part

Materials. Poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) (PHBHV) containing 12 mol % hydroxyvalerate (HV) with average $M_w = 210\,000\text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$ was purchased from Goodfellow. β -CD was purchased from Roquette. Carvacrol, chloroform, N,N-dimethylformamide anhydrous, methanol, 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH), Lysogeny Broth, Miller (LB medium) and all solvents were purchased from Sigma-Aldrich and used without purification. The high molar mass CD-epichlorohydrin polymer, PolyCD, was prepared by reaction between CD and epichlorohydrin under basic conditions⁴¹.

Preparation of inclusion complex, carv/CD-IC. The inclusion complexes of carv/CD-IC were prepared using co-precipitation method in 1:1 molar ratio. CD solution was prepared by dissolving 3.64 g of CD in 200 mL of water ($18.2\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$) and then 481.9 mg of carvacrol was added slowly and a suspension was formed. The suspension was kept under stirring at 30°C during 48 hours. Suspension of inclusion complexes was freeze-dried or filtered under 2 bars of pressure with stainless steel pressure filter holder through a $0.2\ \mu\text{m}$ membrane filter. Inclusion complexes were then dried under vacuum at 60°C during 16 hours.

Entrapment efficiency (EE). The entrapment efficiency was determined by UV-vis spectroscopy at 274 nm, Varian Cary 50 Bio UV–Visible spectrophotometer. Calibration curve was plotted using carvacrol concentration ranging from 0.028 to 0.064 g.L⁻¹. To determine total amount of carvacrol from inclusion complexes, 5 mg of inclusion complexes were dissolved in 5 mL of acetonitrile during 48h at room temperature to allow all entrapped carvacrol to be in solution, providing the total carvacrol from inclusion complexes (entrapped and surface-adsorbed). To determine the amount of carvacrol adsorbed at the surface of inclusion complexes, 0.5 g of inclusion complexes was washed in 5 mL of acetonitrile for 20 min. Solutions were then centrifuged at 3200 x g for 15 min to separate carvacrol adsorbed from inclusion complexes. The EE was calculated according to **Equation 1**:

$$\text{Equation (1)} \quad EE = \frac{(\text{Total amount of carvacrol} - \text{surface adsorbed carvacrol})}{\text{Initial amount of carvacrol}} \times 100$$

Electrospinning. PHBHV₉₁(carv/CD-IC)₉ scaffolds were obtained by electrospinning a mixture of 23% (w/v) PHBHV solution with 9 wt.% of carv/CD-IC. The concentration of the solution was 253 g.L⁻¹. [PHBHV-(PolyCD/carv)-PHBHV] multilayered materials were prepared as follows: the first layer was obtained by electrospinning a 23 % (w/v) PHBHV solution, the second layer was obtained by electrospinning the solution of polyCD (89 wt.%) complexed with carvacrol (11 wt.%) in DMF (897 g.L⁻¹), and then another electrospun PHBHV layer. For all the mixtures, PHBHV was dissolved overnight in a 85/15 (v/v) ratio of CHCl₃/DMF before adding the CD or carv/CD-IC. The electrospun fibers were obtained using a Fluidnatek® LE-10 electrospinning apparatus manufactured by Bioinicia S.L., Valencia, Spain. The suspensions were processed by a single phase nozzle with scanning motion through one concentric stainless-steel needles (0.9 mm of outer diameters). The tool was operated under a steady flow-rate using a motorized syringe pump system and equipped with a variable high-voltage 0-31 kV power supply. Briefly, the polymer mixtures were placed in a 20 mL syringe and nanofibers were collected onto a stainless-steel plate collector recovered of foil connected to the ground electrode of the power supply and placed at a tip-to-collector distance of 15 or 25 cm at a variable flow rate of 1-1.5 mL h⁻¹; a voltage of 25-31 kV was applied. The experiments were carried out at room temperature.

Test DPPH. The radical scavenging activity (RSA) of the networks was determined by using DPPH (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl)⁵⁴. 50 mg of the samples were immersed in 4 mL of 0.1 mM of DPPH solution in methanol in the dark for 60 min at room temperature. The RSA was measured by using a Varian Cary 50 Bio UV–Visible spectrophotometer controlled by the CaryWinUV software. The DPPH solution is well known to have a maximum of absorption at

517 nm. RSA was therefore determined by monitoring the decrease of the absorbance at this wavelength. RSA was calculated according to the following **Equation 2**.

$$\text{Equation (2)} \quad \text{RSA (\%)} = \left(\frac{A_{\text{ref}} - A_s}{A_{\text{ref}}} \right) \times 100$$

where A_{ref} corresponds to the absorbance of the 0.1 mM of DPPH solution without sample and A_s corresponds to the absorbance of the 0.1 mM solution of DPPH with 50 mg samples of electrospun scaffolds at 517 nm.

Microbial Growth Inhibition. The samples of electrospun scaffolds (1 cm²) were immersed 6 h at 37 °C and stirred (130 rpm) in the bacterial suspension containing *E. coli* or *S. aureus*. 100 µL are taken to measure the absorbance at 600 nm every hour for 6h and at 24h. Experiments were conducted in three replicates. The ANalysis Of the VAriance (ANOVA) statistical test was used and significant differences ($p < 0.05$) among antibacterial properties of the scaffolds were detected thanks to the least significant difference method (LSD) of Fisher.

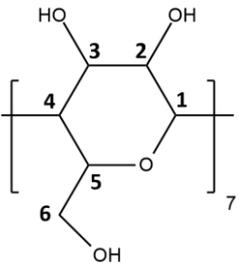
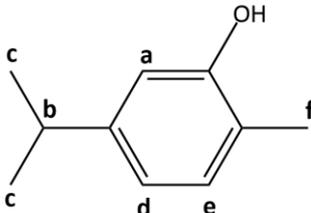
Characterization. The thermal and decomposition characteristics of the materials were determined by thermal gravimetric analyses (TGA) on a Setaram Setsys Evolution 16 apparatus, with a temperature range of 20-800 °C and a heating rate of 10 °C/min. ¹H-NMR spectra were recorded on a Bruker Avance II NMR spectrometer 400 MHz. The morphology of the nanofibers was investigated using a Merlin Zeiss scanning electron microscopy. Images were recorded with an acceleration voltage of 5 keV. Prior to analyses, the samples were sputter-coated with a 3nm layer of Pt/Pd in a Cressington 208 HR sputter-coater. The thickness of the metallic layer was monitored by a MTM-20 Cressington quartz balance. The average fiber diameter and porosity were calculated from SEM images using ImageJ software coupled with DiameterJ plugin, a validated nanofiber diameter characterization tool, developed at the National Institute of Standards and Technology. For rheological studies, TA Instruments Advanced Rheometer AR1000 was used with a cone-and-plate geometry of 40 mm diameter and 0.01 rad angle. The geometry was equipped with a solvent trap filled with water and a solvent trap cover in order to limit evaporation and thus concentration changes during long time experiments. All measurements were carried out at room temperature.

II-2-3. Results and discussion

II-2-3-1. Preparation and characterization of the carv/CD-Inclusion Complexes, carv/CD-IC and polyCD/carv

The carv/CD-IC prepared by direct co-precipitation were then collected by pressure filtration or by freeze-drying method. Although the filtration method gives a lower yield (65% against 99%) due to the solubility of free CD in water, this process is the more adapted method to obtain inclusion complexes because the entrapment efficiency is higher (95%) than those obtained by freeze-drying method (71%). The chemical shifts ($\Delta\delta$) of the aromatic protons between the free carvacrol and the complexed carvacrol determined by ^1H NMR were calculated as it was previously reported⁴⁵ in order to observe the interactions between the complexed compounds and the cavity of the CD (**Table 1**).

Table 1. Chemical shifts (δ) of CD, carv/CD-IC and polyCD/carv in D_2O solution using NMR ^1H

Protons	Free state δ (ppm)	Complexed state δ (ppm)	$\Delta\delta$ free-complexed (ppm)	Chemical structure
CD				
1	5.06	5.03	0.03	
2	3.64	3.62	0.02	
3	3.96	3.88	0.08	
4	3.58	3.57	0.01	
5	3.85	3.69	0.16	
6	3.87	3.78	0.09	
carvacrol		carv/CD-IC		
a	6.80	6.66	0.14	
b	2.82	2.80	0.02	
c	1.17	1.24	-0.07	
d	6.83	6.68	0.15	
e	7.13	7.00	0.13	
f	2.15	2.17	-0.02	
carvacrol		polyCD/carv		
a	6.80	6.68	0.12	
b	2.82	2.80	0.02	
c	1.17	1.26	-0.09	
d	6.83	6.68	0.15	
e	7.13	7.04	0.09	
f	2.15	2.20	-0.05	

The slight shifts of CD protons noted **3** and **5** of 0.08 and 0.16 ppm respectively combined to the shifts observed for carvacrol protons **a**, **d** and **e** of 0.14, 0.15 and 0.13 ppm (**Figure 19**) showed significant interactions between the CD and the carvacrol that are characteristic host guest inclusion complex formation. The carv/CD-IC stoichiometry was determined by the ratio

of the integration of the peak at 2.2 ppm corresponding to methyl group **f** of carvacrol and 5.0 ppm corresponding to proton **1** of the CD.

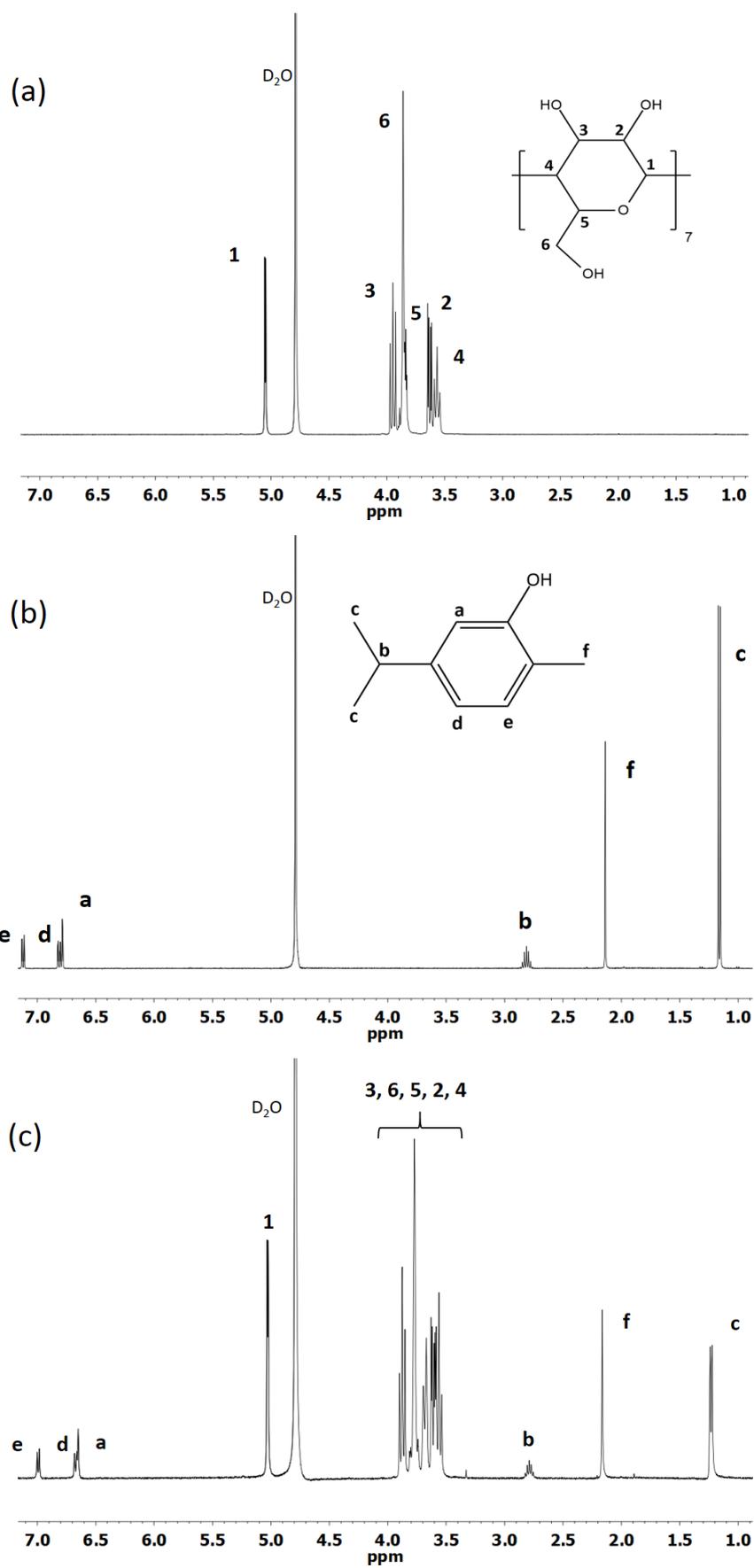


Figure 19. ¹H NMR spectra (a) CD, (b) carvacrol, (c) carv/CD-IC

Stoichiometries were (1:0.93) and (1:0.94) for the complexes obtained by pressure filtration and freeze-drying methods respectively. In presence of carvacrol, the ^1H NMR spectrum also provides evidence for the formation of an inclusion complex with the polyCD (**Figure 20**, **Table 1**).

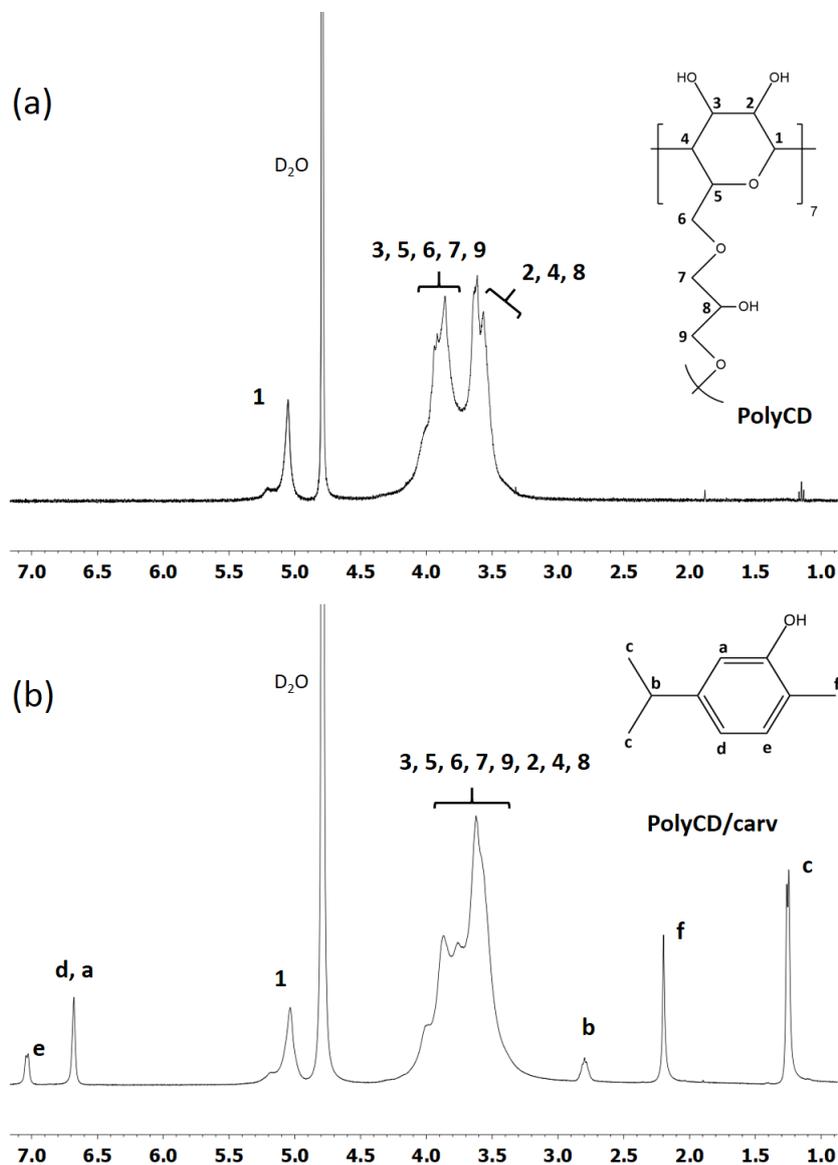


Figure 20. ^1H NMR spectra of (a) polyCD, (b) polyCD/carv

The chemical shifts ($\Delta\delta$) of the aromatic protons between the free carvacrol and the complexed carvacrol attest significant interactions between polyCD and carvacrol. Furthermore, these signals enlarged in complexed state which was consistent with that above reported for native CD. At the same time, the shape of the signal present in the range 3.3 to 4.5 ppm corresponding

to 6 protons of CD and those of 5 protons of epichlorohydrin residues confirmed the inclusion complex. Diffractograms of native CD and carv/CD-IC (**Figure 21**) showed diffraction peaks in the range of $2\theta = 10\text{-}35^\circ$.

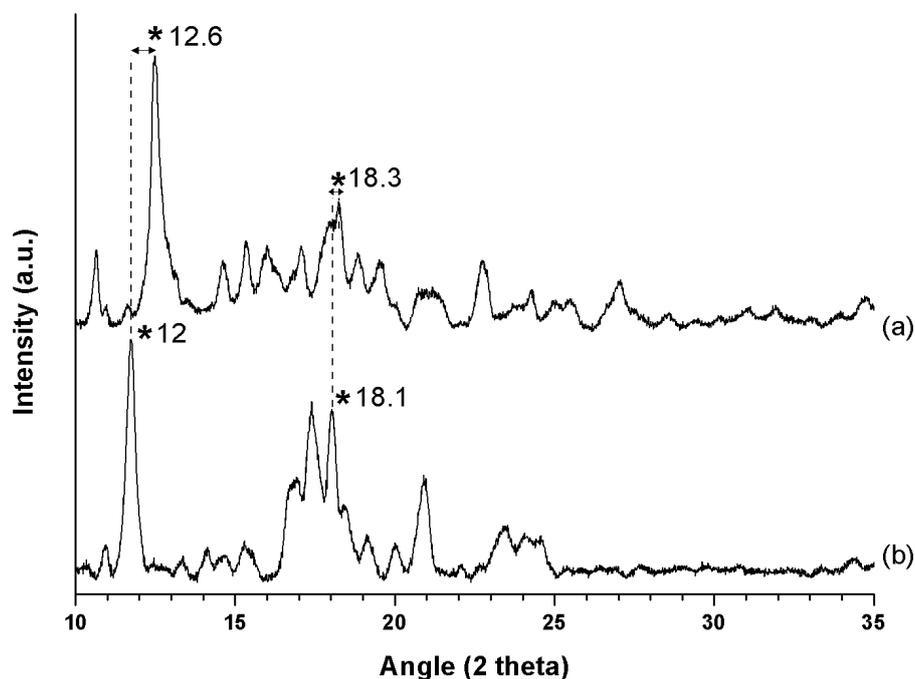


Figure 21. XRD patterns of CD (a) and carv/CD-IC (b)

The characteristic peaks observed for XRD pattern of CD at 12.6 and 18.3° correspond to the cage-type packing according to previous studies^{55,56}. The XRD pattern carv/CD-IC showed that the crystalline structure of CD has been modified due to the interactions between carvacrol and CD. The intense peaks at 12° and 17.5° and 18.1° respectively are characteristic of channel-type packing which confirms the inclusion complexation of carvacrol inside the CD. Thermal stability of carv/CD-IC was studied by TGA (**Figure 22**).

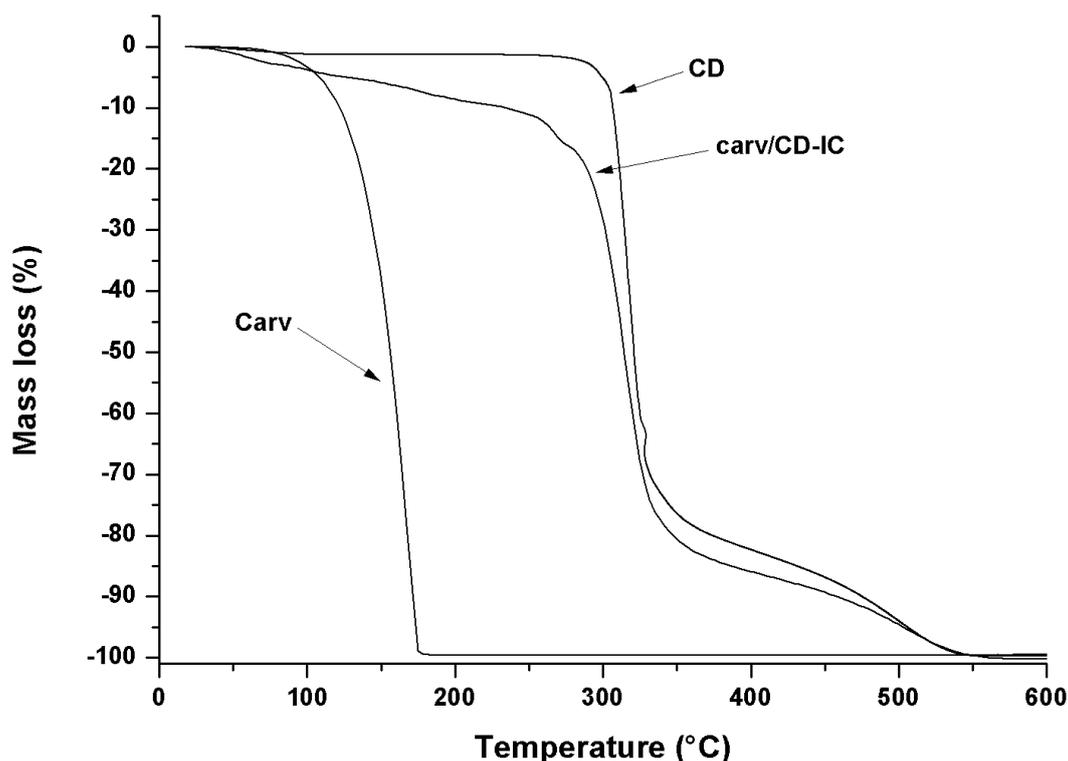


Figure 22. TGA curves of native CD, carv and carv/CD-IC

The major mass loss at around 320°C corresponded to the degradation of the CD. The evaporation of carvacrol shifted from 168°C to 270°C (about 13.6% mass loss) when it is inside the CD as it was previously reported⁵⁷⁻⁵⁹ in the case of other host guest interactions in the CD-IC complex. The loss mass of 13.6% of carvacrol observed is similar to the amount of carvacrol introduced during the preparation of inclusion complexes. These results are in agreement with XRD and NMR results.

II-2-3-2. Elaboration of electrospun materials

The use of the mixture of two solvents for the electrospinning process is necessary due to the difference of the PHBHV and carv/CD-IC polarities. PHBHV is a very hydrophobic polyester mainly soluble in CHCl_3 whereas carv/CD-IC is soluble in DMF. As a consequence, PHBHV was solubilized in a CHCl_3/DMF 85/15 (v/v) mixture and it was also previously shown that DMF increased the conductivity of the solution thus promoting the formation of homogeneous and beadless PHBHV fibers by electrospinning³²⁻³⁴. The polymer concentration needs to be precisely determined because the morphology of the fibers is closely related to the viscosity of the polymer solution^{34,60}. At 150 g.L⁻¹, the viscosity (135 cP) is not enough and the resulting mat shows defects in the form of beads. As the concentration of the PHBHV increases the diameter increases (**Table 2**).

Table 2. Rheology and fiber characteristics

Samples	Flow rate (mL.h ⁻¹)	Concentration (g.L ⁻¹)	Diameter (nm)	Porosity (%)	Viscosity (cP)
PHBHV	1.5	150	No fibers		135 ± 4
	1.5	230	465 ± 172	45 ± 10	2550 ± 430
PHBHV ₉₁ CD ₉	1.5	220	505 ± 251	66 ± 8	290 ± 8
PHBHV ₉₁ CD ₉	1.5	253	884 ± 191	47 ± 1	979 ± 228
PHBHV ₉₁ (carv/CD-IC) ₉	1.5	253	549 ± 287	43 ± 3	3837 ± 775
PHBHV ₉₁ (carv/CD-IC) ₉	1.0	253	423 ± 175	52 ± 3	3837 ± 775
PHBHV ₉₁ polyCD ₉	1.5	253	974 ± 385	48 ± 4	397 ± 27
PolyCD ₈₉ /carv ₁₁	1	897	421 ± 149	66 ± 8	4660 ± 762

At 230 g.L⁻¹, the fibers are homogeneous with very few defects and high fiber diameter (465 ± 172 nm). The viscosity (2550 cP) is sufficient to obtain homogeneous fibers with very few defects. For the blend PHBHV₉₁CD₉, homogeneous and flawless fibers were obtained at a concentration of 253 g.L⁻¹. Above 9 wt% of CD, the syringe was blocked by the suspension and electrospinning was impossible due to precipitation of CD. Nevertheless, the introduction of carv/CD-IC improves the electrospinning process and it is then possible to introduce up to 17 wt% of carv/CD-IC. The optimal morphology is obtained for the electrospun PHBHV₈₃(carv/CD-IC)₁₇ (276 g.L⁻¹) at 1 mL.h⁻¹. Homogeneous fibers without defects were obtained with a diameter of 854 ± 346 nm. As mentioned above, whatever the concentration of complexes, the decrease in the flow rate (from 1.5 to 1 mL.h⁻¹) favorably influences the morphology of the fibers. XRD studies were performed on PHBHV₉₁(carv/CD-IC)₉ and PHBHV₈₃(carv/CD-IC)₁₇ (**Figure 23**) to investigate the effect of the presence of inclusion complexes into PHBHV nanofibers.

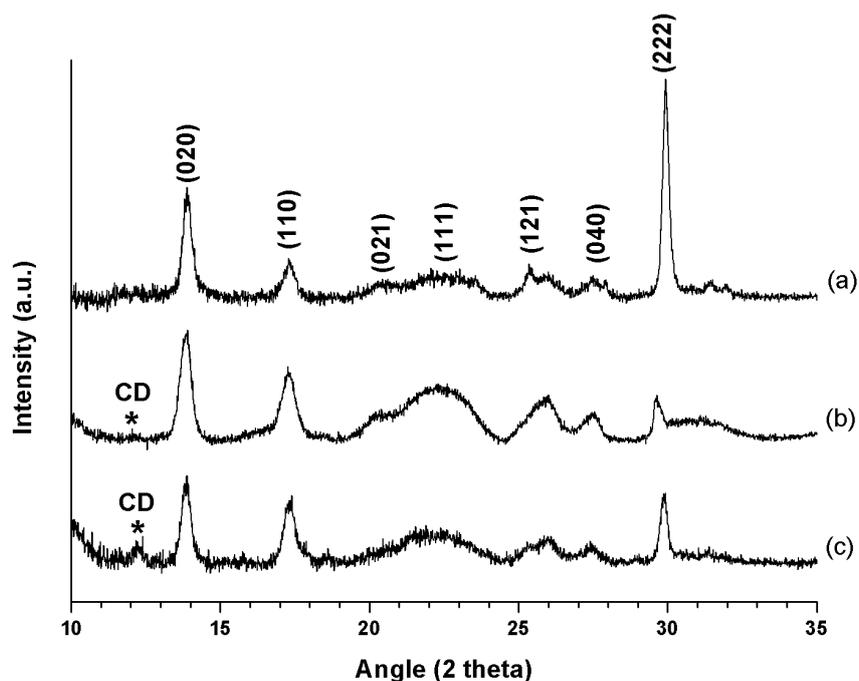


Figure 23. XRD patterns of PHBHV nanofibers (a) PHBHV₉₁(carv/CD-IC)₉ (b) and PHBHV₈₃(carv/CD-IC)₁₇ (c)

A peak characteristic of carv/CD-IC around 12° increases with the content of carv/CD-IC introduced in the blend. The crystalline PHBHV molecules are packed in an orthorhombic unit cell in a helical form with space group P2₁2₁2₁. The polymer has a compact and a right-handed helix with a 2-fold screw axis^{61–63}. The diffraction profile obtained for the different scaffolds are typical of semi-crystalline polymers and the presence of carv/CD-IC does not affect the crystallization of PHBHV.

The electrospinning of the blend containing PHBHV₉₁ [PolyCD/carv]₉ was not possible due to the formation of a suspension. To overcome this difficulty, multilayered material was electrospun in three steps (**Figure 18**) by successively PHBHV, PolyCD/carv and then PHBHV. The advantage of this approach is to have a high concentration of cyclodextrin. The fibers are well defined with few defects. The fiber diameters are 465 ± 172 nm for PHBHV and 421 ± 149 nm for PolyCD/carv (**Table 2**).

II-2-3-3. Radical Scavenging Activity and antibacterial activities

The antioxidant capacity was assessed using the DPPH radical scavenging assay. This method consists in performing reduction of the DPPH radical to its non-radical form in the presence of carvacrol, a hydrogen donating compound (**Figure 24A**). The solution containing PHBHV electrospun mat has a purple color, which corresponds to a UV-visible absorbance at 517 nm showing that PHBHV does not present antiradical activity. On the contrary the solutions containing electrospun fibers of PHBHV₉₁(carv/CD-IC)₉ and [PHBHV-(PolyCD/carv)-

PHBHV] became yellow and present a significant antiradical activity due to the presence of carvacrol.

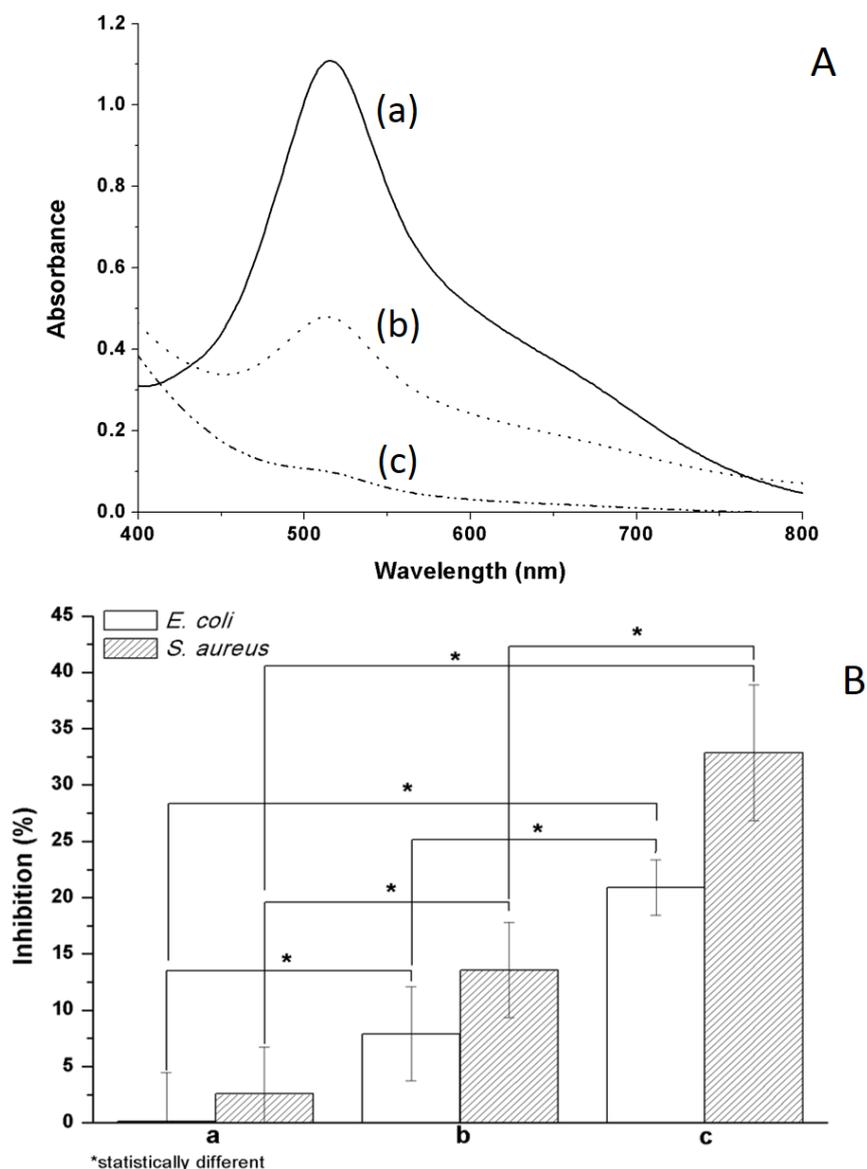


Figure 24. Absorption spectra at 517 nm in presence of DPPH (A), bacterial Inhibition for (a) PHBHV, (b) PHBHV₉₁(carv/CD-IC)₉, (c) [PHBHV-(PolyCD/carv)-PHBHV] (B)

The PHBHV₉₁(carv/CD-IC)₉ film is nevertheless less antioxidant (RSA 55.1%) than the multilayered one due (RSA 88.6%) to its low concentration of carvacrol. The 3-layered [PHBHV-(PolyCD/carv)-PHBHV] is sufficient to ensure optimal antiradical activity. The antibacterial activity of the supports was tested by inhibiting the bacterial growth of *E. coli* and *S. aureus*. **Figure 24B** shows the bacterial growths on the different nanofibers after immersion in the bacterial suspension for 24 hours. The [PHBHV-(PolyCD/carv)-PHBHV] presents better inhibition (20.9% for *E.coli* and 32.9% *S.aureus*) compared to PHBHV₉₁(carv/CD-IC)₉ (7.9%

and 13.6%), with respect to the reference. These results are related with the weight percentage of carvacrol in the material because the PHBHV₉₁(carv/CD-IC)₉ only contains 1 wt.% of carvacrol inside the nanofibers while the content reaches 11 wt.% in the [PHBHV-(PolyCD/carv)-PHBHV] material.

Conclusion

Electrospun PHBHV nanofibers incorporating carvacrol was successfully prepared by using carvacrol/ β -cyclodextrin inclusion complexes. The antibacterial activity and antioxidant properties of the materials are directly related to the amount of carvacrol included in the hydrophobic cavity of CD. The use of poly(β -CD-epichlorohydrin) polymer, PolyCD, increases the amount of CD and therefore the content of carvacrol. As the electrospinning of the blend containing PHBHV[PolyCD/carv] is not possible due to the formation of a suspension during the process, multilayered material was electrospun in consecutive three steps. The obtained three-layered material [PHBHV-(PolyCD/carv)-PHBHV] is interesting to both ensure optimal antiradical and antibacterial activities and could be advantageously used for enhancing performance of antibacterial materials.

Acknowledgment

We would like to thank Eric Lafontaine for the helpful discussions and the DGA (Direction Generale de l'Armement, France) for the financial support.

II-3. Références

- (1) Andrews, J. M. Determination of Minimum Inhibitory Concentrations. *J. Antimicrob. Chemother.* **2001**, 48 (suppl 1), 5–16. https://doi.org/10.1093/jac/48.suppl_1.5.
- (2) Burt, S. Essential Oils: Their Antibacterial Properties and Potential Applications in Foods—a Review. *Int. J. Food Microbiol.* **2004**, 94 (3), 223–253. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2004.03.022>.
- (3) Kyaw, B. M.; arora, S.; Lim, C. S. Bactericidal Antibiotic-Phytochemical Combinations against Methicillin Resistant Staphylococcus Aureus. *Braz. J. Microbiol.* **2012**, 43 (3), 938–945. <https://doi.org/10.1590/S1517-838220120003000013>.
- (4) Silverwood, R. Développement d'un film antibactérien ayant des propriétés de glissement pour une meilleure processabilité. masters, École Polytechnique de Montréal, 2012.
- (5) Abdali, H. Development of Antibacterial Structures and Films Using Ground Plants, Extracts/Essential Oils. masters, École Polytechnique de Montréal, 2014.
- (6) Soković, M.; Glamočlija, J.; Marin, P. D.; Brkić, D.; van Griensven, L. J. L. D. Antibacterial Effects of the Essential Oils of Commonly Consumed Medicinal Herbs Using an in Vitro Model. *Mol. Basel Switz.* **2010**, 15 (11), 7532–7546. <https://doi.org/10.3390/molecules15117532>.
- (7) Abel Guarda, J. F. R. The Antimicrobial Activity of Microencapsulated Thymol and Carvacrol. *Int. J. Food Microbiol.* **2011**, 146 (2), 144–150. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2011.02.011>.
- (8) White, S. B. Antibacterial Efficacy of Phosvitin, Carvacrol, or Nisin Alone or Combined against Foodborne Human Enteric Pathogens. **2011**.
- (9) Shah, B.; Davidson, P. M.; Zhong, Q. Nanodispersed Eugenol Has Improved Antimicrobial Activity against Escherichia Coli O157:H7 and Listeria Monocytogenes in Bovine Milk. *Int. J. Food Microbiol.* **2013**, 161 (1), 53–59. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2012.11.020>.
- (10) Pei, R.; Zhou, F.; Ji, B.; Xu, J. Evaluation of Combined Antibacterial Effects of Eugenol, Cinnamaldehyde, Thymol, and Carvacrol against E. Coli with an Improved Method. *J. Food Sci.* **2009**, 74 (7), M379–M383. <https://doi.org/10.1111/j.1750-3841.2009.01287.x>.
- (11) Chen, F.; Shi, Z.; Neoh, K. G.; Kang, E. T. Antioxidant and Antibacterial Activities of Eugenol and Carvacrol-Grafted Chitosan Nanoparticles. *Biotechnol. Bioeng.* **2009**, 104 (1), 30–39. <https://doi.org/10.1002/bit.22363>.
- (12) Singh, D.; Kumar, T. R. S.; Gupta, V. K.; Chaturvedi, P. Antimicrobial Activity of Some Promising Plant Oils, Molecules and Formulations. *Indian J. Exp. Biol.* **2012**, 50 (10), 714–717.
- (13) ZR, Z. M. T. Microbiological Characterization of Pure Geraniol and Comparison with Bactericidal Activity of the Cinnamic Acid in Gram-Positive and Gram-Negative Bacteria. *J. Microb. Amp Biochem. Technol.* **2015**, 07 (04). <https://doi.org/10.4172/1948-5948.1000203>.
- (14) Juliane A. Kamimura, E. H. S. Antimicrobial and Antioxidant Activities of Carvacrol Microencapsulated in Hydroxypropyl-Beta-Cyclodextrin. *LWT - Food Sci. Technol.* **2014**, 57 (2), 701–709. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2014.02.014>.
- (15) Steinbüchel, A.; Valentin, H. E. Diversity of Bacterial Polyhydroxyalkanoic Acids. *FEMS Microbiol. Lett.* **1995**, 128 (3), 219–228. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.1995.tb07528.x>.
- (16) Müller, H.-M.; Seebach, D. Poly(Hydroxyalkanoates): A Fifth Class of Physiologically Important Organic Biopolymers? *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1993**, 32 (4), 477–502. <https://doi.org/10.1002/anie.199304771>.

-
- (17) Lee, S. Y. Bacterial Polyhydroxyalkanoates. *Biotechnol. Bioeng.* **1996**, *49* (1), 1–14. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1097-0290\(19960105\)49:1<1::AID-BIT1>3.0.CO;2-P](https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-0290(19960105)49:1<1::AID-BIT1>3.0.CO;2-P).
- (18) Chen, G.-Q. A Microbial Polyhydroxyalkanoates (PHA) Based Bio- and Materials Industry. *Chem. Soc. Rev.* **2009**, *38* (8), 2434–2446. <https://doi.org/10.1039/b812677c>.
- (19) Philip, S.; Keshavarz, T.; Roy, I. Polyhydroxyalkanoates: Biodegradable Polymers with a Range of Applications. *J. Chem. Technol. Biotechnol.* **2007**, *82* (3), 233–247. <https://doi.org/10.1002/jctb.1667>.
- (20) Rai, R.; Keshavarz, T.; Roether, J. A.; Boccaccini, A. R.; Roy, I. Medium Chain Length Polyhydroxyalkanoates, Promising New Biomedical Materials for the Future. *Mater. Sci. Eng. R Rep.* **2011**, *72* (3), 29–47. <https://doi.org/10.1016/j.mser.2010.11.002>.
- (21) Hazer, D. B.; Kılıçay, E.; Hazer, B. Poly(3-Hydroxyalkanoate)s: Diversification and Biomedical Applications: A State of the Art Review. *Mater. Sci. Eng. C* **2012**, *32* (4), 637–647. <https://doi.org/10.1016/j.msec.2012.01.021>.
- (22) Zinn, M.; Witholt, B.; Egli, T. Occurrence, Synthesis and Medical Application of Bacterial Polyhydroxyalkanoate. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **2001**, *53* (1), 5–21. [https://doi.org/10.1016/S0169-409X\(01\)00218-6](https://doi.org/10.1016/S0169-409X(01)00218-6).
- (23) Zhang, J.; Shishatskaya, E. I.; Volova, T. G.; da Silva, L. F.; Chen, G.-Q. Polyhydroxyalkanoates (PHA) for Therapeutic Applications. *Mater. Sci. Eng. C* **2018**, *86*, 144–150. <https://doi.org/10.1016/j.msec.2017.12.035>.
- (24) Kurth, N.; Renard, E.; Brachet, F.; Robic, D.; Guerin, P.; Bourbouze, R. Poly(3-Hydroxyoctanoate) Containing Pendant Carboxylic Groups for the Preparation of Nanoparticles Aimed at Drug Transport and Release. *Polymer* **2002**, *43* (4), 1095–1101. [https://doi.org/10.1016/S0032-3861\(01\)00692-9](https://doi.org/10.1016/S0032-3861(01)00692-9).
- (25) Shrivastav, A.; Kim, H.-Y.; Kim, Y.-R. Advances in the Applications of Polyhydroxyalkanoate Nanoparticles for Novel Drug Delivery System <https://www.hindawi.com/journals/bmri/2013/581684/> (accessed May 16, 2019). <https://doi.org/10.1155/2013/581684>.
- (26) Nigmatullin, R.; Thomas, P.; Lukasiewicz, B.; Puthussery, H.; Roy, I. Polyhydroxyalkanoates, a Family of Natural Polymers, and Their Applications in Drug Delivery. *J. Chem. Technol. Biotechnol.* **2015**, *90* (7), 1209–1221. <https://doi.org/10.1002/jctb.4685>.
- (27) Li, Z.; Loh, X. J. Recent Advances of Using Polyhydroxyalkanoate-Based Nanovehicles as Therapeutic Delivery Carriers. *Wiley Interdiscip. Rev. Nanomed. Nanobiotechnol.* **2017**, *9* (3). <https://doi.org/10.1002/wnan.1429>.
- (28) Babinot, J.; Guigner, J.-M.; Renard, E.; Langlois, V. Poly(3-Hydroxyalkanoate)-Derived Amphiphilic Graft Copolymers for the Design of Polymersomes. *Chem. Commun.* **2012**, *48* (43), 5364–5366. <https://doi.org/10.1039/C2CC30482A>.
- (29) Vergnol, G.; Sow, H.; Renard, E.; Haroun, F.; Langlois, V. Multilayer Approach for Tuning the Drug Delivery from Poly(3-Hydroxyalkanoate)s Coatings. *React. Funct. Polym.* **2012**, *72* (4), 260–267. <https://doi.org/10.1016/j.reactfunctpolym.2012.02.004>.
- (30) Chen, G.-Q.; Wu, Q. The Application of Polyhydroxyalkanoates as Tissue Engineering Materials. *Biomaterials* **2005**, *26* (33), 6565–6578. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2005.04.036>.
- (31) Lemechko, P.; Ramier, J.; Versace, D. L.; Guezennec, J.; Simon-Colin, C.; Albanese, P.; Renard, E.; Langlois, V. Designing Exopolysaccharide-Graft-Poly(3-Hydroxyalkanoate) Copolymers for Electrospun Scaffolds. *React. Funct. Polym.* **2013**, *73* (1), 237–243. <https://doi.org/10.1016/j.reactfunctpolym.2012.10.012>.
- (32) Ramier, J.; Boudierlique, T.; Stoilova, O.; Manolova, N.; Rashkov, I.; Langlois, V.; Renard, E.; Albanese, P.; Grande, D. Biocomposite Scaffolds Based on Electrospun Poly(3-Hydroxybutyrate) Nanofibers and Electrospayed Hydroxyapatite Nanoparticles

-
- for Bone Tissue Engineering Applications. *Mater. Sci. Eng. C Mater. Biol. Appl.* **2014**, *38*, 161–169. <https://doi.org/10.1016/j.msec.2014.01.046>.
- (33) Ramier, J.; Boubaker, M. B.; Guerrouache, M.; Langlois, V.; Grande, D.; Renard, E. Novel Routes to Epoxy Functionalization of PHA-Based Electrospun Scaffolds as Ways to Improve Cell Adhesion. *J. Polym. Sci. Part Polym. Chem.* **2014**, *52* (6), 816–824. <https://doi.org/10.1002/pola.27063>.
- (34) Grande, D.; Ramier, J.; Versace, D. L.; Renard, E.; Langlois, V. Design of Functionalized Biodegradable PHA-Based Electrospun Scaffolds Meant for Tissue Engineering Applications. *New Biotechnol.* **2017**, *37*, 129–137. <https://doi.org/10.1016/j.nbt.2016.05.006>.
- (35) Versace, D.-L.; Ramier, J.; Grande, D.; Andaloussi, S. A.; Dubot, P.; Hobeika, N.; Malval, J.-P.; Lalevee, J.; Renard, E.; Langlois, V. Versatile Photochemical Surface Modification of Biopolyester Microfibrous Scaffolds with Photogenerated Silver Nanoparticles for Antibacterial Activity. *Adv. Healthc. Mater.* **2013**, *2* (7), 1008–1018. <https://doi.org/10.1002/adhm.201200269>.
- (36) Rodríguez-Tobías, H.; Morales, G.; Ledezma, A.; Romero, J.; Saldívar, R.; Langlois, V.; Renard, E.; Grande, D. Electrospinning and Electro spraying Techniques for Designing Novel Antibacterial Poly(3-Hydroxybutyrate)/Zinc Oxide Nanofibrous Composites. *J. Mater. Sci.* **2016**, *51* (18), 8593–8609. <https://doi.org/10.1007/s10853-016-0119-x>.
- (37) Ignatova, M.; Manolova, N.; Rashkov, I.; Markova, N. Antibacterial and Antioxidant Electrospun Materials from Poly(3-Hydroxybutyrate) and Polyvinylpyrrolidone Containing Caffeic Acid Phenethyl Ester – “in” and “on” Strategies for Enhanced Solubility. *Int. J. Pharm.* **2018**, *545* (1), 342–356. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2018.05.013>.
- (38) Kuntzler, S. G.; Almeida, A. C. A. de; Costa, J. A. V.; Morais, M. G. de. Polyhydroxybutyrate and Phenolic Compounds Microalgae Electrospun Nanofibers: A Novel Nanomaterial with Antibacterial Activity. *Int. J. Biol. Macromol.* **2018**, *113*, 1008–1014. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2018.03.002>.
- (39) Park, E.-S.; Moon, W.-S.; Song, M.-J.; Kim, M.-N.; Chung, K.-H.; Yoon, J.-S. Antimicrobial Activity of Phenol and Benzoic Acid Derivatives. *Int. Biodeterior. Biodegrad.* **2001**, *47* (4), 209–214. [https://doi.org/10.1016/S0964-8305\(01\)00058-0](https://doi.org/10.1016/S0964-8305(01)00058-0).
- (40) Nostro, A.; Papalia, T. Antimicrobial Activity of Carvacrol: Current Progress and Future Perspectives. *Recent Patents Anti-Infect. Drug Disc.* **2012**, *7* (1), 28–35.
- (41) Baser, K. H. C. Biological and Pharmacological Activities of Carvacrol and Carvacrol Bearing Essential Oils. *Curr. Pharm. Des.* **2008**, *14* (29), 3106–3119.
- (42) Beena; Kumar, D.; Rawat, D. S. Synthesis and Antioxidant Activity of Thymol and Carvacrol Based Schiff Bases. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2013**, *23* (3), 641–645. <https://doi.org/10.1016/j.bmcl.2012.12.001>.
- (43) Iannitelli, A.; Grande, R.; Di Stefano, A.; Di Giulio, M.; Sozio, P.; Bessa, L. J.; Laserra, S.; Paolini, C.; Protasi, F.; Cellini, L. Potential Antibacterial Activity of Carvacrol-Loaded Poly(DL-Lactide-Co-Glycolide) (PLGA) Nanoparticles against Microbial Biofilm. *Int. J. Mol. Sci.* **2011**, *12* (8), 5039–5051. <https://doi.org/10.3390/ijms12085039>.
- (44) Shakeri, F.; Shakeri, S.; Hojjatoleslami, M. Preparation and Characterization of Carvacrol Loaded Polyhydroxybutyrate Nanoparticles by Nanoprecipitation and Dialysis Methods. *J. Food Sci.* **2014**, *79* (4), N697-705. <https://doi.org/10.1111/1750-3841.12406>.
- (45) Barba, C.; Eguinoa, A.; Ignacio Mate, J. Preparation and Characterization of Beta-Cyclodextrin Inclusion Complexes as a Tool of a Controlled Antimicrobial Release in Whey Protein Edible Films. *Lwt-Food Sci. Technol.* **2015**, *64* (2), 1362–1369. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2015.07.060>.

-
- (46) Santos, E. H.; Kamimura, J. A.; Hill, L. E.; Gomes, C. L. Characterization of Carvacrol Beta-Cyclodextrin Inclusion Complexes as Delivery Systems for Antibacterial and Antioxidant Applications. *Lwt-Food Sci. Technol.* **2015**, *60* (1), 583–592. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2014.08.046>.
- (47) Al-Nasiri, G.; Cran, M. J.; Smallridge, A. J.; Bigger, S. W. Optimisation of β -Cyclodextrin Inclusion Complexes with Natural Antimicrobial Agents: Thymol, Carvacrol and Linalool. *J. Microencapsul.* **2018**, *35* (1), 26–35. <https://doi.org/10.1080/02652048.2017.1413147>.
- (48) Kfoury, M.; Landy, D.; Ruellan, S.; Auezova, L.; Greige-Gerges, H.; Fourmentin, S. Determination of Formation Constants and Structural Characterization of Cyclodextrin Inclusion Complexes with Two Phenolic Isomers: Carvacrol and Thymol. *Beilstein J. Org. Chem.* **2016**, *12*, 29–42. <https://doi.org/10.3762/bjoc.12.5>.
- (49) Kfoury, M.; Auezova, L.; Greige-Gerges, H.; Fourmentin, S. Encapsulation in Cyclodextrins to Widen the Applications of Essential Oils. *Environ. Chem. Lett.* **2019**, *17* (1), 129–143. <https://doi.org/10.1007/s10311-018-0783-y>.
- (50) Mulinacci, N.; Melani, F.; Vincieri, F. F.; Mazzi, G.; Romani, A. ¹H-NMR NOE and Molecular Modelling to Characterize Thymol and Carvacrol β -Cyclodextrin Complexes. *Int. J. Pharm.* **1996**, *128* (1), 81–88. [https://doi.org/10.1016/0378-5173\(95\)04224-5](https://doi.org/10.1016/0378-5173(95)04224-5).
- (51) Abdelmalek, L.; Fatiha, M.; Leila, N.; Mouna, C.; Nora, M.; Djameleddine, K. Computational Study of Inclusion Complex Formation between Carvacrol and β -Cyclodextrin in Vacuum and in Water: Charge Transfer, Electronic Transitions and NBO Analysis. *J. Mol. Liq.* **2016**, *224*, 62–71. <https://doi.org/10.1016/j.molliq.2016.09.053>.
- (52) Aytac, Z.; Yildiz, Z. I.; Kayaci-Senirmak, F.; San Keskin, N. O.; Kusku, S. I.; Durgun, E.; Tekinay, T.; Uyar, T. Fast-Dissolving, Prolonged Release, and Antibacterial Cyclodextrin/Limonene-Inclusion Complex Nanofibrous Webs via Polymer-Free Electrospinning. *J. Agric. Food Chem.* **2016**, *64* (39), 7325–7334. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.6b02632>.
- (53) Renard, E.; Volet, G.; Amiel, C. Synthesis of a Novel Linear Water-Soluble β -Cyclodextrin Polymer. *Polym. Int.* **2005**, *54* (3), 594–599. <https://doi.org/10.1002/pi.1742>.
- (54) Modjinou, T.; Versace, D.-L.; Abbad-Andalousi, S.; Bousserhine, N.; Dubot, P.; Langlois, V.; Renard, E. Antibacterial and Antioxidant Bio-Based Networks Derived from Eugenol Using Photo-Activated Thiol-Ene Reaction. *React. Funct. Polym.* **2016**, *101*, 47–53. <https://doi.org/10.1016/j.reactfunctpolym.2016.02.002>.
- (55) Rusa, C. C.; Bullions, T. A.; Fox, J.; Porbeni, F. E.; Wang, X.; Tonelli, A. E. Inclusion Compound Formation with a New Columnar Cyclodextrin Host. *Langmuir* **2002**, *18* (25), 10016–10023. <https://doi.org/10.1021/la0262452>.
- (56) Saenger, W.; Jacob, J.; Gessler, K.; Steiner, T.; Hoffmann, D.; Sanbe, H.; Koizumi, K.; Smith, S. M.; Takaha, T. Structures of the Common Cyclodextrins and Their Larger Analogues Beyond the Doughnut. *Chem. Rev.* **1998**, *98* (5), 1787–1802. <https://doi.org/10.1021/cr9700181>.
- (57) Kayaci, F.; Uyar, T. Solid Inclusion Complexes of Vanillin with Cyclodextrins: Their Formation, Characterization, and High-Temperature Stability. *J. Agric. Food Chem.* **2011**, *59* (21), 11772–11778. <https://doi.org/10.1021/jf202915c>.
- (58) Marcolino, V. A.; Zanin, G. M.; Durrant, L. R.; Benassi, M. D. T.; Matioli, G. Interaction of Curcumin and Bixin with β -Cyclodextrin: Complexation Methods, Stability, and Applications in Food. *J. Agric. Food Chem.* **2011**, *59* (7), 3348–3357. <https://doi.org/10.1021/jf104223k>.
- (59) Tsai, Y.; Tsai, H.-H.; Wu, C.-P.; Tsai, F.-J. Preparation, Characterisation and Activity of the Inclusion Complex of Paeonol with β -Cyclodextrin. *Food Chem.* **2010**, *120* (3), 837–841. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2009.11.024>.

-
- (60) Fong, H.; Chun, I.; Reneker, D. H. Beaded Nanofibers Formed during Electrospinning. *Polymer* **1999**, *40* (16), 4585–4592.
- (61) Cobntbekt, J.; Mabchessault, R. H. Physical Properties of Poly- β -Hydroxybutyrate: IV. Conformational Analysis and Crystalline Structure. *J. Mol. Biol.* **1972**, *71* (3), 735–756. [https://doi.org/10.1016/S0022-2836\(72\)80035-4](https://doi.org/10.1016/S0022-2836(72)80035-4).
- (62) *Biopolymers from Renewable Resources*; Kaplan, D. L., Ed.; Macromolecular Systems - Materials Approach; Springer-Verlag: Berlin Heidelberg, 1998.
- (63) Marchessault, R. H.; Coulombe, S.; Morikawa, H.; Okamura, K.; Revol, J. F. Solid State Properties of Poly- β -Hydroxybutyrate and of Its Oligomers. *Can. J. Chem.* **1981**, *59* (1), 38–44. <https://doi.org/10.1139/v81-007>.

Chapitre III : Assemblage multicouches antibactérien à base de chitosane et de polymère de cyclodextrine

Introduction

Afin de proposer une autre alternative aux supports antibactériens présentés dans le chapitre II, nous avons fonctionnalisé des structures fibreuses commerciales provenant de pièces faciales filtrantes. Nous avons utilisé des masques pliables à soupape de type FFP3 de la marque Sup Air® (**Annexe 1**). Le masque est constitué de quatre couches qui sont toutes en polypropylène (PP). Le média filtrant électrostatique en feutre (N°3) présente une grande efficacité de filtration électrostatique (**Figure 25**). Pour la fonctionnalisation de ces masques de protection nous avons sélectionné le feuillet N°2, appelé support par le constructeur (**Annexe 1**) en raison de sa porosité élevée et de l'aspect rugueux de ses fibres. Le diamètre des fibres est de l'ordre de 20 microns et la porosité de 51%.

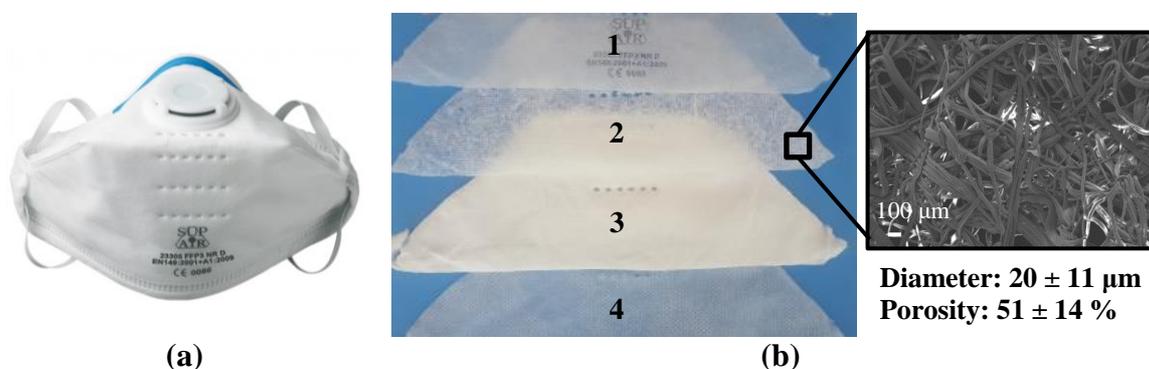


Figure 25. Picture of a Sup Air® FFP3 mask (a), the different layers of the mask (b)

Le PP offre des propriétés mécaniques intéressantes et présente un processus de mise en œuvre simple notamment pour la fabrication des pièces faciales filtrantes mais il ne possède pas de propriétés antibactériennes intrinsèques. Ainsi, afin de donner une double action à ces masques, à la fois filtrante et antibactérienne, nous avons fonctionnalisé le polypropylène en surface pour capturer les bactéries et les neutraliser. Pour ce faire, une technique simple basée sur l'assemblage multi-couches par liaisons ioniques a été mise en place. Les multicouches de polyélectrolytes ont déjà été décrites comme technique permettant la modification de supports afin de les rendre antibactériens^{1,2}.

Dans notre cas, l'assemblage multicouche repose sur l'association d'un polymère cationique, le chitosane (CS), polymère naturel dérivé de la chitine³⁻⁵ (**Tableau 17**), aux propriétés antibactériennes reconnues^{6,7}, et d'un polymère anionique, un polymère de cyclodextrine fonctionnalisé (P(CD)) permettant l'encapsulation de composés phénoliques. Ce polymère a été

décrit dans le chapitre précédent. Cette technique est facile à mettre en œuvre car il s'agit d'une imprégnation « layer by layer » à partir d'une solution diluée de deux types de polymères, l'un cationique et l'autre anionique (**Figure 26**).

Le chitosane, chargé positivement en solution acide peut être utilisé comme polymère cationique. Même si les multicouches utilisant du chitosane ont été décrites par plusieurs auteurs, il n'y a que peu de publications sur les propriétés antibactériennes de ces assemblages^{1,8-13}.

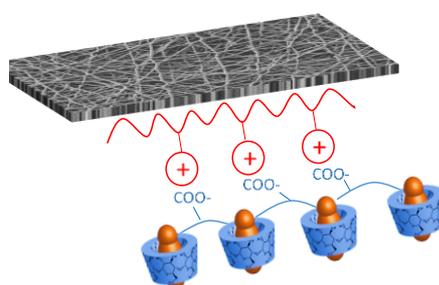


Figure 26. Layer by layer assembly based on ionic interactions

Notre originalité réside essentiellement dans l'utilisation d'un polymère anionique à base de cyclodextrine, P(CD). L'avantage de ce polymère (**Tableau 17**) est sa capacité d'encapsulation liée à la présence des molécules cages de CD. Ce sont des oligosaccharides capables de former des complexes d'inclusion avec une large gamme de molécules non polaires¹⁴. L'incorporation de molécules antibactériennes à l'intérieur des cavités de la cyclodextrine devrait protéger les molécules hôtes contre la dégradation et maintenir leur bioactivité et, par conséquent, améliorer les propriétés antibactériennes du masque filtrant. Les molécules contenant des groupes phénoliques sont des agents antimicrobiens agissant efficacement contre la membrane bactérienne^{15,16}. Parmi les composés phénoliques, le carvacrol (**Tableau 17**) est particulièrement intéressant en raison de son origine biologique, de sa non-toxicité¹⁷ et de son activité antibactérienne. Il est déjà utilisé pour ces propriétés dans l'industrie alimentaire notamment^{18,19}.

Dans ce chapitre, la stratégie de modification de surface du filtre en PP par la méthode de « layer by layer » à base de chitosane et de P(CD) sera décrite ainsi que la caractérisation par gravimétrie, ATR-FTIR, porosimétrie par intrusion de mercure (MIP) et MEB/EDX. De plus,

les propriétés antioxydantes et antibactériennes contre deux souches pathogènes *E. Coli* et *S. Aureus* seront étudiées.

Pour faciliter la lecture de ce chapitre les noms des différents polymères et les abréviations utilisées sont listés dans les **Tableau 17** et **Tableau 18**.

Tableau 17. Structure des molécules réactives

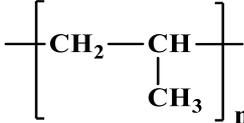
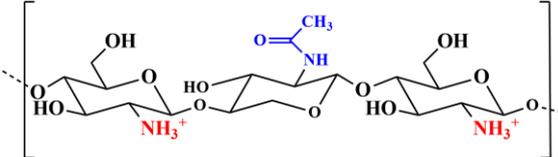
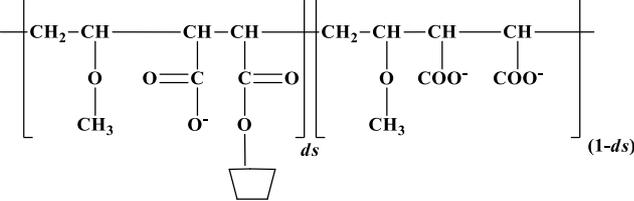
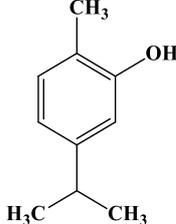
Compounds	Structures
Polypropylene (PP)	
Chitosan (CS) Deacetylation: >75%	
βCD-g-Poly[methyl vinyl ether)-alt-(maleic acid)] P(CD) ds low mass molar P(CD): 0.89 ds high mass molar P(CD): 0.87	
carvacrol (carv)	

Tableau 18. Noms des différents matériaux utilisés

Samples	Description
CS_{LMM}	Chitosan low molar mass
CS_{MMM}	Chitosan medium molar mass
CS_{HMM}	Chitosan high molar mass
(PP/CS)_{Imp}	PP impregnated with chitosan
(PP/CS)_{nSp}	CS sprayed at the surface of PP filter (n sprays)
[(PP/CS/P(CD))]_n	Multilayered material (n layers)
P(CD)_{LMM7.5}	Low molar mass P(CD) with a concentration of 7.5g.L ⁻¹
P(CD)_{HMM3}	High molar mass P(CD) with a concentration of 3g.L ⁻¹

III-1. Partie expérimentale

Des masques de protection respiratoire en polypropylène (PP) Sup Air® ont été utilisés. Le chitosane CS_{LMM} de 50 000 à 190 000 g.mol⁻¹ avec un degré de désacétylation de 75-85%, le CS_{MMM} de 190 000 à 310 000 g.mol⁻¹ avec un degré de désacétylation de 75-85%, le CS_{HMM} de 310 000 à 375 000 g.mol⁻¹ avec un degré de désacétylation >75 %, l'acide acétique, le méthanol, le 2,2-diphényl-1-picrylhydrazyl (DPPH), le milieu pour bactéries Luria Bertani (Miller) et tous les solvants ont été achetés chez Sigma-Aldrich et utilisés sans purification. Le βCD-g-Poly[methyl vinyl ether)-alt-(maleic acid)], P(CD), a été obtenu par greffage de CD sur le Poly[methyl vinyl ether)-alt-(maleic anyhydride)]. Le P(CD)_{LMM} de 80 000 g.mol⁻¹, possédant un degré de substitution (ds) de 0.89 et le P(CD)_{HMM} de 485 000 g.mol⁻¹, possédant un ds de 0.87 ont été synthétisés au laboratoire²⁰.

L'augmentation de masse après les procédés de pulvérisation ou d'imprégnation a été suivie par gravimétrie. Le gain de masse (WG) a été calculé à l'aide de l'**Equation 1**.

$$WG = \frac{w_f - w_i}{w_i} \times 100 \quad \text{Equation 1}$$

où w_i et w_f correspondent respectivement à la masse initiale et à la masse finale de l'échantillon après dépôt et séchage.

Processus de pulvérisation. Un pistolet de peinture pour maquette de la marque Revell® a été utilisé (**Figure 27**). La concentration du chitosane dans l'acide acétique à 1% a été fixée à 7.5 g.L⁻¹, le volume total pulvérisé par masque est de 10 mL (5 mL sur chaque côté du masque). La distance entre le pulvérisateur et le masque est fixée à 10 cm pour assurer une pulvérisation

uniforme. Le masque a ensuite été lavé à l'eau en le retournant à plusieurs reprises pendant 15 minutes pour éliminer l'excès d'acide acétique.



Figure 27. Pictures of the experimental setup (a) and the paint sprayer used (b)

Procédé d'imprégnation. Les échantillons de filtres commerciaux en PP (2cm²) préalablement vaporisés de chitosane ont été recouverts d'une première couche de P(CD) par trempage dans une solution aqueuse de P(CD)_{LMM} à 7.5 g.L⁻¹ ou de P(CD)_{HMM} à 3 g.L⁻¹ pendant 15 minutes puis rincés dans 5 mL d'eau pendant 30 secondes. La deuxième couche est appliquée successivement par trempage dans une solution de chitosane de 7.5 g.L⁻¹ pendant 15 minutes et rincée pendant 30 secondes. Au total, 5 immersions ont été effectuées successivement. Les échantillons ont été séchés sous vide pendant 1h à 70°C lorsque le P(CD) n'est pas complexé et une nuit à température ambiante sous vide lorsque le P(CD) est complexé au carvacrol.

Préparation du complexe d'inclusion, P(CD)-carv. Les complexes d'inclusion de P(CD)-carv ont été préparés en utilisant la méthode de co-précipitation dans un rapport molaire 1:1. Les complexes d'inclusion de P(CD)-carv ont été préparés en dissolvant le P(CD) dans de l'eau pour obtenir une solution de 7.5 g.L⁻¹, puis le carvacrol a été ajouté lentement. La suspension a été maintenue sous agitation à température ambiante pendant 48 heures. Les solutions de complexes d'inclusion ont ensuite été lyophilisées (Christ Alpha 1-2 LD).

Etude de l'activité antiradicalaire. L'activité antiradicalaire des matériaux multicouches a été déterminée avec la méthode qui utilise le DPPH (2,2-diphényl-1-picrylhydrazyl) comme un radical libre relativement stable²¹⁻²⁴. Dans ce test les molécules antioxydantes réduisent le

DPPH de couleur violette en un composé jaune, dont l'intensité de la couleur est inversement proportionnelle à la capacité des antioxydants présents dans le milieu à donner des protons. Chaque échantillon ($m \approx 30$ mg) a été immergé dans 3 mL d'une solution méthanolique de DPPH (0.1 mM). Cette solution a ensuite été laissée dans l'obscurité à température ambiante et l'étude cinétique de l'activité antiradicalaire a été mesurée par spectrophotométrie (Varian Cary 50 Bio UV-Visible). La solution de DPPH possède un maximum d'absorption à 517 nm. L'activité antiradicalaire (RSA) a donc été déterminée en mesurant la diminution de l'absorbance à cette longueur d'onde selon l'**Equation 2** suivante.

$$\text{Radical Scavenging Activity (\%)} = \left(\frac{A_{\text{ref}} - A_s}{A_{\text{ref}}} \right) \times 100 \quad \text{Equation 2}$$

où A_{ref} correspond à l'absorbance de la solution de 0.1 mM de DPPH sans échantillon et A_s correspond à l'absorbance de la solution de 0.1 mM de DPPH avec 30 mg d'échantillons à 517 nm.

Etude de l'adhérence bactérienne. L'activité anti-adhérence des matériaux multicouches a été évaluée à l'aide de deux souches bactériennes pathogènes : *S. aureus* (Gram positif) et *E. coli* (Gram négatif) qui ont été cultivées en aérobiose à 37 °C pendant la nuit sur milieu LB avant les tests d'adhésion bactérienne. Les échantillons (2 cm²) de PP, [PP/CS/P(CD)_{LMM7.5}]₅ et [PP/CS/(P(CD)_{LMM7.5}-Carv)]₅ ont été immergés 3 h à 37 °C dans la suspension bactérienne des deux souches différentes (OD 600 nm = 0.05). Les bactéries non adhérentes ont ensuite été éliminées de la surface de l'échantillon par plusieurs lavages avec un tampon physiologique salin. Les échantillons ont ensuite été soumis à un vortex et à des ultrasons dans 3 mL de tampon physiologique pour décrocher les bactéries adhérentes. Enfin, 100 µL de cette suspension bactérienne ont été inoculés sur la surface d'une gélose PCA (gélose pour numération en boîtes de Petri). Après 24 h d'incubation à 37 °C en conditions aérobies, l'activité antibactérienne a été mesurée en comptant le nombre total de bactéries (CFU-Colony Forming Units) pour les différentes souches. Le logiciel R a été utilisé pour analyser les données. Au moins trois répétitions des expériences ont été réalisées afin de permettre une analyse statistique significative. Le test statistique ANalysis Of the VAriance (ANOVA) a été utilisé et des différences significatives ($p < 0.05$) entre les propriétés antibactériennes des réseaux ont été détectées grâce à la méthode des différences les moins significatives (LSD) de Fisher.

Caractérisation. Les spectres FTIR ont été obtenus sur un Tensor 27 Bruker équipé d'un appareil ATR (détecteur Digi Tect Dlagts, 32 scans, 4 cm⁻¹) de 500-4000 cm⁻¹. La morphologie des nanofibres a été étudiée au microscope électronique à balayage Merlin Zeiss. Les images ont été enregistrées avec une tension d'accélération de 5 keV. Avant les analyses, les échantillons ont été recouverts d'une couche de 3 nm de Pt/Pd par pulvérisation cathodique dans un pulvérisateur Cressington 208 HR. L'épaisseur de la couche métallique a été contrôlée par une balance à quartz MTM-20 Cressington. Les rapports de porosité, les volumes de pores et les distributions de taille de pores des matériaux ont été déterminés par porosimétrie d'intrusion de mercure (MIP) en utilisant un porosimètre AutoPore IV 9500 de Micromeritics. La détermination des caractéristiques de porosité était basée sur l'équation de Washburn entre la pression appliquée (de 1.03 à 206.8 MPa) et la taille des pores dans lesquels le mercure a pénétré.

III-2. Résultats et discussion

III-2-1. Dépôt d'une sous-couche d'adhésion de chitosane sur le PP

Nous avons choisi de modifier la surface de la couche intermédiaire du filtre FFP3 en raison de sa grande porosité (51%±14) et de l'aspect rugueux des fibres. L'adsorption du chitosane à la surface du PP a été réalisée par deux méthodes afin d'obtenir le revêtement le plus homogène possible : soit par imprégnation directe dans une solution de chitosane, soit par pulvérisation d'une solution de chitosane. Nous noterons PP/Chitosan_{imp} le support obtenu par imprégnation et PP/Chitosan_{spray} le PP recouvert de chitosane par pulvérisation. Nous avons procédé à plusieurs cycles de pulvérisation de chitosane et nous noterons le nombre de cycle dans le nom du matériau de la façon suivante : PP/Chitosan_{N spray}.

La **Figure 28** montre les spectres FTIR du PP (a), du chitosane (b) et du PP/Chitosan_{7 spray} (c). Le spectre du PP/Chitosan_{7 spray} présente des différences par rapport à celui du PP. On retrouve les bandes caractéristiques du chitosane (3300 cm⁻¹ fonction OH ; 1650 cm⁻¹ groupe C=O du groupe amide I et 1550 cm⁻¹ groupe NH du groupe amide II). Pour évaluer l'importance du dépôt de chitosane, le rapport (R₁) a été déterminé selon l'**Equation 3**.

$$R_1 = \frac{I_{1650}}{I_{2950}} \quad \text{Equation 3}$$

où I_{1650} correspond au groupe C=O amide I du chitosane et I_{2950} correspond au groupe CH₃ du PP.

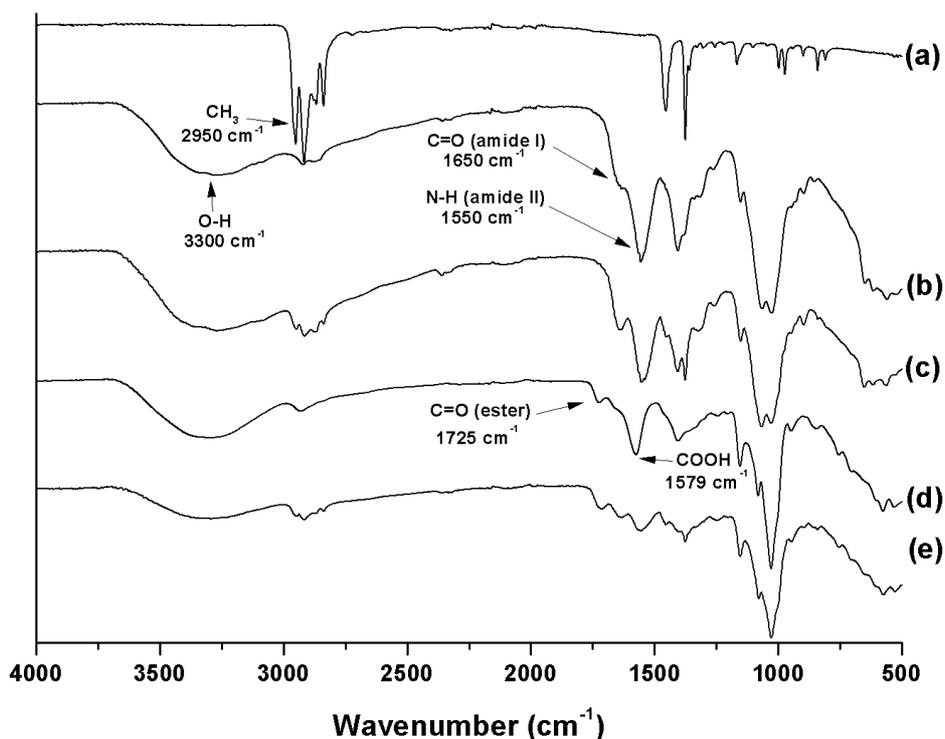


Figure 28. FTIR spectra of PP filter (a), chitosan (b), (PP/CS)_{7Sp} (c), P(CD) (d), [(PP/CS/P(CD))]₅ (e)

En ce qui concerne l'imprégnation de chitosane à la surface du PP, une concentration minimale de chitosane de 7.5 g.L⁻¹ est nécessaire pour détecter un gain de masse par gravimétrie. Des solutions de 7.5 g.L⁻¹ avec différentes masses molaires de chitosane (CS_{LMM}, CS_{MMM}, CS_{HMM}) ont été préparées et différents temps d'imprégnation ont été étudiés allant de 30 secondes (0.01h) à 2 heures d'imprégnation. Le **Tableau 19** montre un gain de masse plus élevé (6.82%) et un R₁ plus élevé (0.28) pour le chitosane de haute masse molaire, CS_{HMM}, même pour un temps très court d'imprégnation de 30 secondes. Cependant, les valeurs de R₁ présentent un écart-type très élevé, ce qui signifie que le processus d'imprégnation est hétérogène.

En ce qui concerne les résultats obtenus par pulvérisation de la solution de chitosane le rapport de bande R₁ et le gain massique augmentent proportionnellement au nombre de pulvérisations (**Figure 29**). Au total sept couches de chitosane ont été pulvérisées avec un gain de masse total de 11.94 ± 0.67% avec un écart type très faible au niveau des valeurs obtenues, ce qui démontre une bonne homogénéité du dépôt de chitosane à la surface du PP.

Tableau 19. Gain de masse et R_1 déterminé par FTIR après les processus d'imprégnation et de pulvérisation du chitosane sur le PP

Samples	Impregnation time (h)	Mass gain (%)	R_1
(PP/CS _{LMM}) _{imp}	1.00	2.56 ± 0.05	0.06 ± 0.01
	2.00	1.19 ± 0.05	0.11 ± 0.01
(PP/CS _{MMM}) _{imp}	1.00	2.70 ± 0.06	0.08 ± 0.01
	2.00	2.04 ± 0.05	0.15 ± 0.03
(PP/CS _{HMM}) _{imp}	0.01	6.82 ± 1.19	0.28 ± 0.21
	1.00	7.69 ± 0.07	0.21 ± 0.14
	2.00	9.72 ± 0.10	0.42 ± 0.18

Samples	Numbers of sprays	Mass gain (%)	R_1
PP/CS _{1Sp}	1	0.35±0.49	0.17±0.03
PP/CS _{2Sp}	2	1.14±1.51	0.25±0.10
PP/CS _{3Sp}	3	2.68±1.44	0.33±0.09
PP/CS _{4Sp}	4	4.77±0.92	0.46±0.12
PP/CS _{5Sp}	5	6.67±0.93	0.53±0.08
PP/CS _{6Sp}	6	9.54±0.96	0.68±0.10
PP/CS _{7Sp}	7	11.94±0.67	0.82±0.06

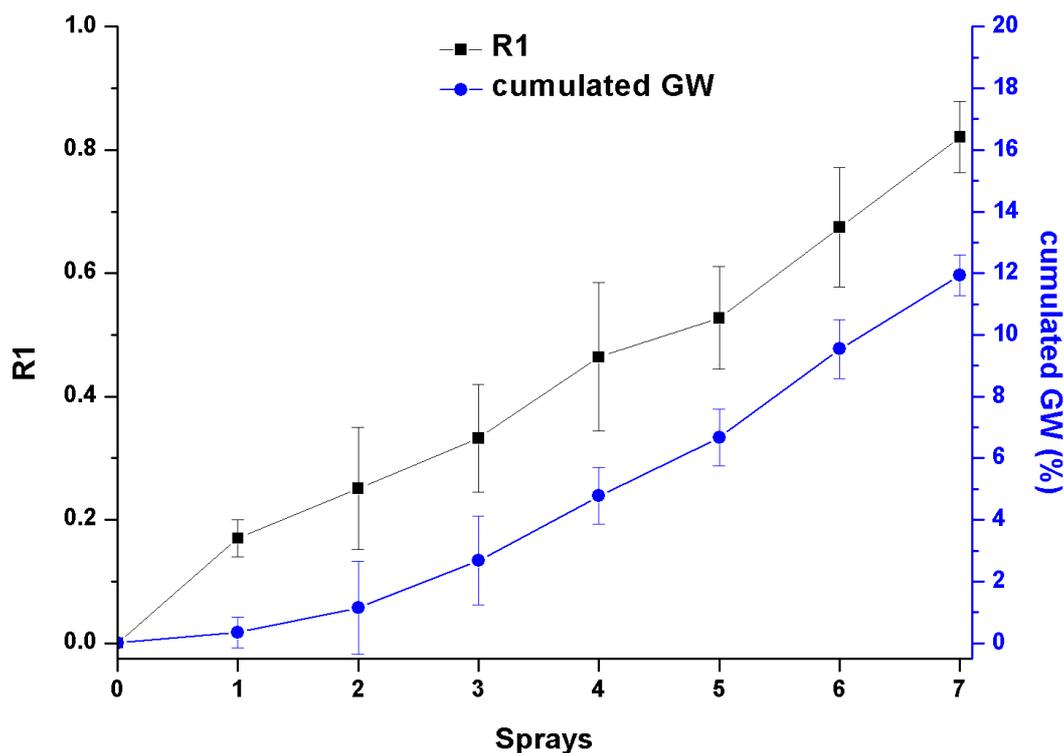


Figure 29. Evolution of the cumulated mass gain (■) and the peak ratio R_1 (●) of (PP/CS) in function of the number of sprays

Des analyses MEB/EDX ont été effectuées pour étudier le dépôt de chitosane sur le PP. La **Figure 30** montre les images MEB obtenues pour le PP, PP/Chitosan_{imp}, PP/Chitosan_{2 spray} et

PP/Chitosan_{7 spray}. En ce qui concerne la surface du PP/Chitosan_{imp}, une partie de la surface est recouverte de chitosane mais certaines fibres de PP ne sont pas recouvertes, ce qui confirme un dépôt hétérogène. Le meilleur recouvrement des fibres de PP est obtenu après le dépôt par pulvérisation de 7 couches de chitosane, c'est-à-dire pour l'échantillon PP/Chitosan_{7 spray}. La méthode de pulvérisation apparaît donc plus appropriée pour obtenir une couche uniforme de chitosane sur toute la surface. Au fur et à mesure que le nombre de pulvérisations augmente, le chitosane recouvre uniformément le PP.

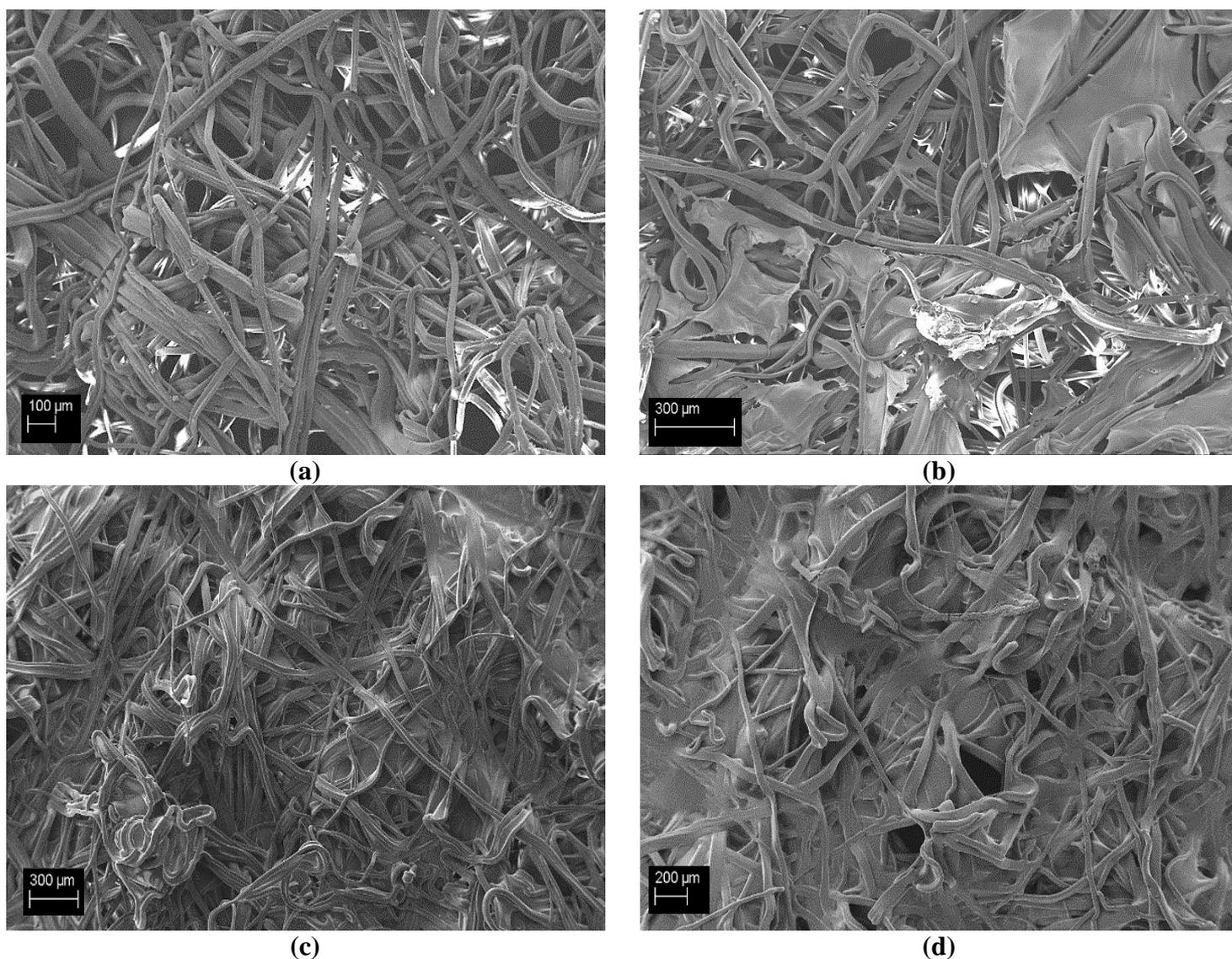


Figure 30. SEM images of a PP (a), (PP/CS)_{imp} (b) PP/CS_{2 spray} (c), and (PP/CS)_{7 spray} (d)

Le spectre EDX du PP indique que les fibres ne sont composées que de carbone (**Figure 31**) alors que le spectre EDX du PP/Chitosan_{7 spray} montre nettement la présence des atomes d'azote et d'oxygène confirmant ainsi la présence de chitosane. La surface du PP/Chitosan_{7 spray} présente la même composition atomique que le chitosane (**Tableau 20**). Le procédé de

pulvérisation a donc été choisi pour la suite de ce travail car la couche de chitosane déposée est homogène avec un gain de masse important (11.94 %).

Tableau 20. Composition atomique expérimentale du (PP/CS)_{7 spray} et composition atomique théorique du chitosane

Element	Exp. (% at.) PP	Th. (% at.) (CS)	Exp. (% at.) (PP/CS)_{7 spray}
Carbon	100	54	56.0±0.7
Oxygen	0	36	33.2±0.8
Nitrogen	0	10	10.8±0.0

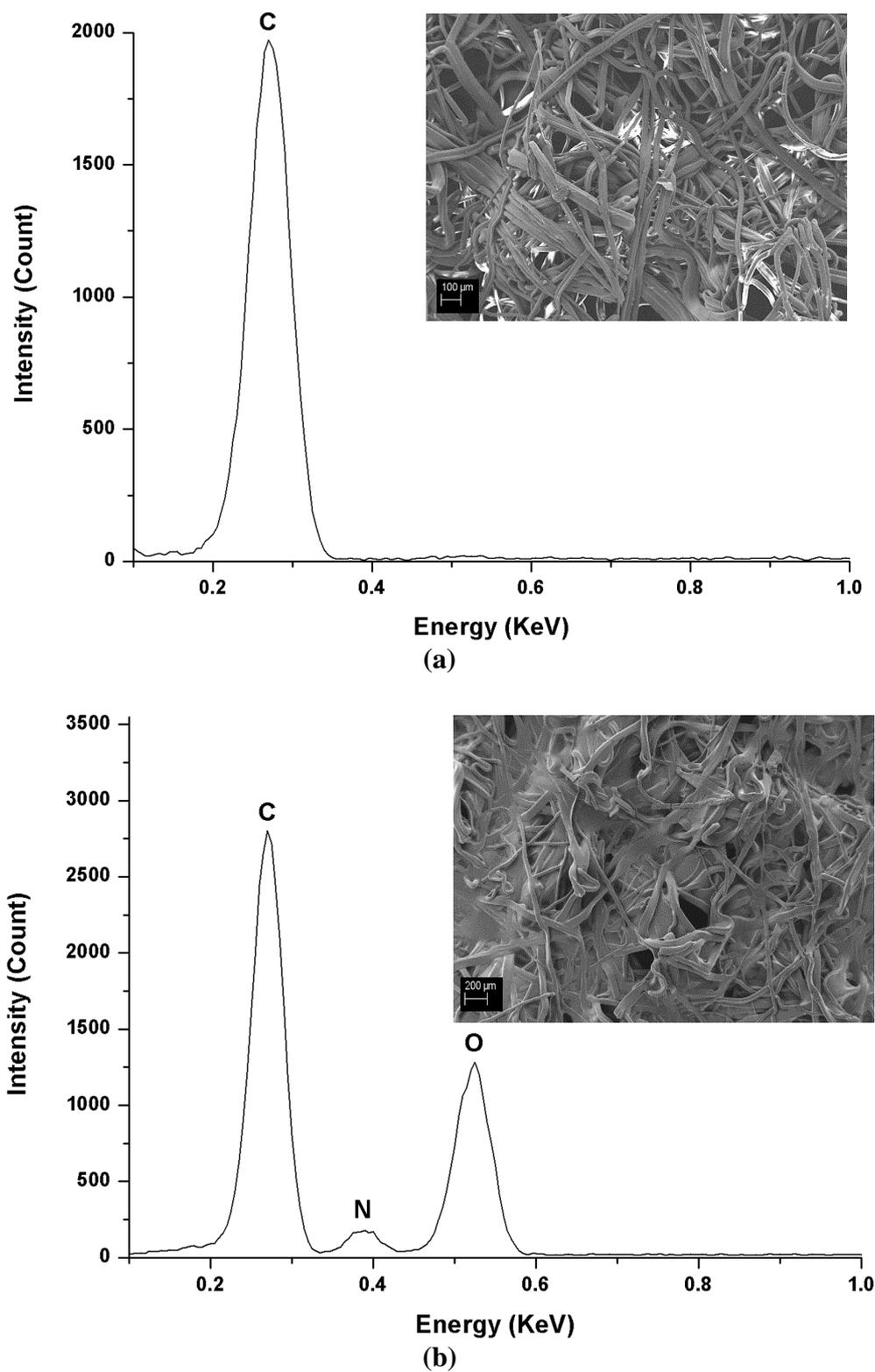


Figure 31. EDX spectra of a PP (a) and (PP/CS)_{7S} (b)

III-2-2. Assemblage couche par couche de chitosane/polymère de cyclodextrine à la surface du PP

Nous avons utilisé un polymère hydrosoluble à base de β -cyclodextrine, P(CD), qui possède à la fois des fonctions carboxylates susceptibles de faire des liaisons ioniques avec les fonctions ammonium des polymères de chitosane et également des cyclodextrines en groupements latéraux pour encapsuler le carvacrol (**Tableau 17**). Le P(CD) a été préparé par greffage de la cyclodextrine sur du poly[(méthylvinyléther)-alt-(acide maléique)]²⁰. Bien que ce polymère ait une teneur élevée en CD (80% en poids) il reste néanmoins soluble dans l'eau. Nous avons utilisé deux polymères de P(CD) ayant des masses molaires différentes : le P(CD)_{HMM} de masse molaire 485 000 g/mol et le P(CD)_{LMM} de masse molaire 80 000g/mol et à deux concentrations différentes, 3 et 7.5 g.L⁻¹.

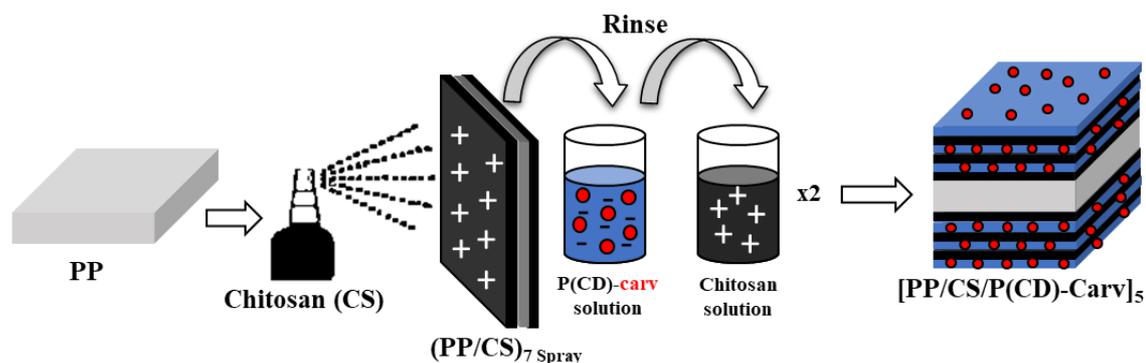


Figure 32. Strategy for functionalizing commercial protection masks with layer-by-layer method

La stratégie du dépôt des différentes couches à la surface du PP est illustrée sur la **Figure 32**. La 1^{ère} couche homogène de chitosane est appliquée à la surface du PP par 7 pulvérisations de chaque côté du PP (PP/CS)₇ spray. Cette couche sera appelée primaire d'adhésion puisqu'elle va permettre l'accrochage des couches de P(CD). Les couches suivantes sont appliquées par immersion tout d'abord dans une solution aqueuse contenant le complexe P(CD)-carvacrol. Le système obtenu a ensuite été immergé dans une solution acide de chitosane.

Par ce procédé, à chaque immersion, deux couches se déposent de façon simultanée de chaque côté du PP (**Figure 26**). Nous avons ainsi déposé jusqu'à 5 couches de chaque côté du PP ce qui correspond au total à 10 couches déposées. Entre chaque immersion, le matériau est séché sous vide à 60°C pendant deux heures. Pour gagner du temps lors de l'élaboration des multi-

couches, nous avons ensuite comparé les résultats obtenus avec un procédé que nous qualifierons de continu, c'est-à-dire sans phase de séchage.

Dans un premier temps, pour montrer la faisabilité du système, nous avons déposé successivement des couches de P(CD) sans carvacrol et des couches de chitosane. Les échantillons ont été analysés par FTIR. Le P(CD) présente des bandes d'absorption caractéristiques à 1575 cm^{-1} (fonction COOH) et à 1725 cm^{-1} (fonction ester). Pour évaluer le dépôt de P(CD), nous avons défini le rapport noté R_2 défini par l'Equation 4.

$$R_2 = \frac{I_{1725}}{I_{2950}} \quad \text{Equation 4}$$

où I_{1725} correspond à l'intensité maximale de la liaison C=O du groupe ester de P(CD) à 1725 cm^{-1} et I_{2950} correspond à l'intensité maximale du groupe CH_3 du PP à 2950 cm^{-1} .

Nous avons déposé au total 10 couches de polymère pour avoir un gain de masse suffisant et une teneur importante de CD pour encapsuler le carvacrol. Nous avons utilisé le P(CD) de faible masse molaire dans un premier temps à une concentration de 7.5 g.L^{-1} (Figure 33). Nous observons par FTIR que de façon simultanée le rapport R_2 augmente à chaque dépôt de P(CD) et au contraire le rapport R_1 diminue puisque le rapport R_1 est caractéristique du chitosane. Le gain de masse cumulé est de 1.99 %, c'est-à-dire bien inférieur au gain de masse obtenu lors de la formation de la sous couche d'adhésion du chitosane par pulvérisation.

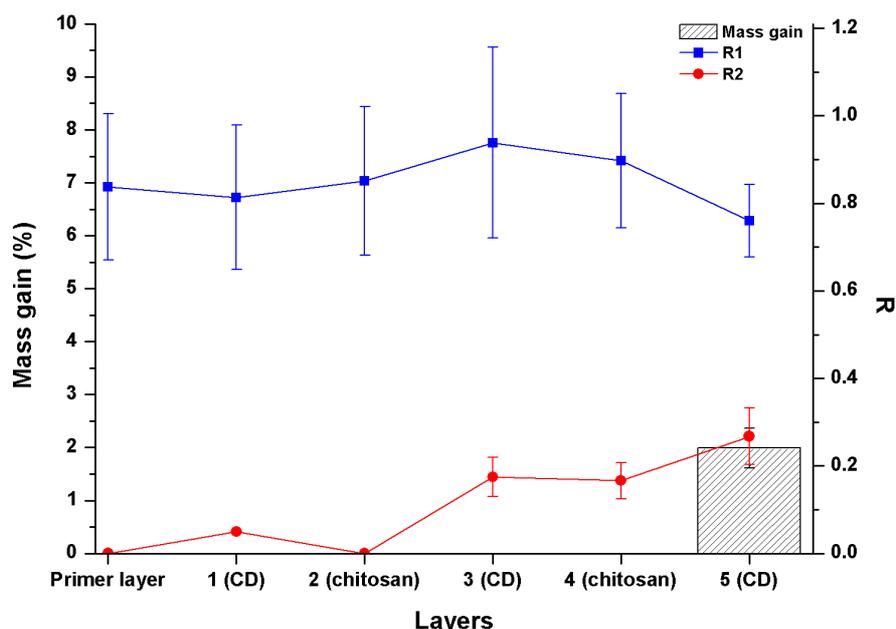


Figure 33. Influence of final mass gain, R_1 and R_2 for the different layer of $[\text{PP/CS/P(CD)}_{\text{LMM7.5}}]_5$

Nous avons comparé les résultats obtenus par cette technique avec ceux obtenus par un procédé en continu, c'est-à-dire sans les phases de séchage entre les immersions successives (**Tableau 21**). Les gains de masse et les valeurs de R_1 et R_2 sont comparables, ce qui signifie que les étapes de séchage ne sont pas indispensables pour élaborer le matériau multi-couches.

Tableau 21. Gain de masse, R_1 et R_2 de l'échantillon [PP/CS/P(CD)_{LMM7.5}]₅ selon 2 méthodes de préparation (concentration du chitosane : 7.5 g.L⁻¹ et concentration du P(CD) : 7.5 g.L⁻¹)

Process	Mass gain (%)	R_1	R_2
Step by step	1.99± 0.37	0.76 ± 0.08	0.27 ± 0.06
Continuous	1.68 ± 0.32	0.66 ± 0.10	0.34 ± 0.06

Les porosités des différents matériaux ont été déterminées (**Figure 34**). Une taille de pore centrée à 119±18 µm a été déterminée pour le masque commercial PP, tandis qu'une distribution centrée à 65±5 µm a été obtenue pour le PP/Chitosan_{7 spray}, et une diminution de la distribution de taille de pore a également été observée pour le matériau multicouche (44±7µm).

Le masque commercial PP présente une porosité de 67.0±0.1%. Le PP/Chitosan_{7 spray} montre une légère diminution de la porosité (63.0±0.5 %) tandis que le [PP/CS/P(CD)]₅ montre une porosité de 70.4±0.9 %. Ces valeurs ne sont pas significatives d'un changement de porosité.

Même si les différentes couches ont obstrué les pores du masque, la porosité reste encore élevée. Nous pouvons supposer que cette modification ne devrait pas affecter de manière notable la capacité de filtration du masque.

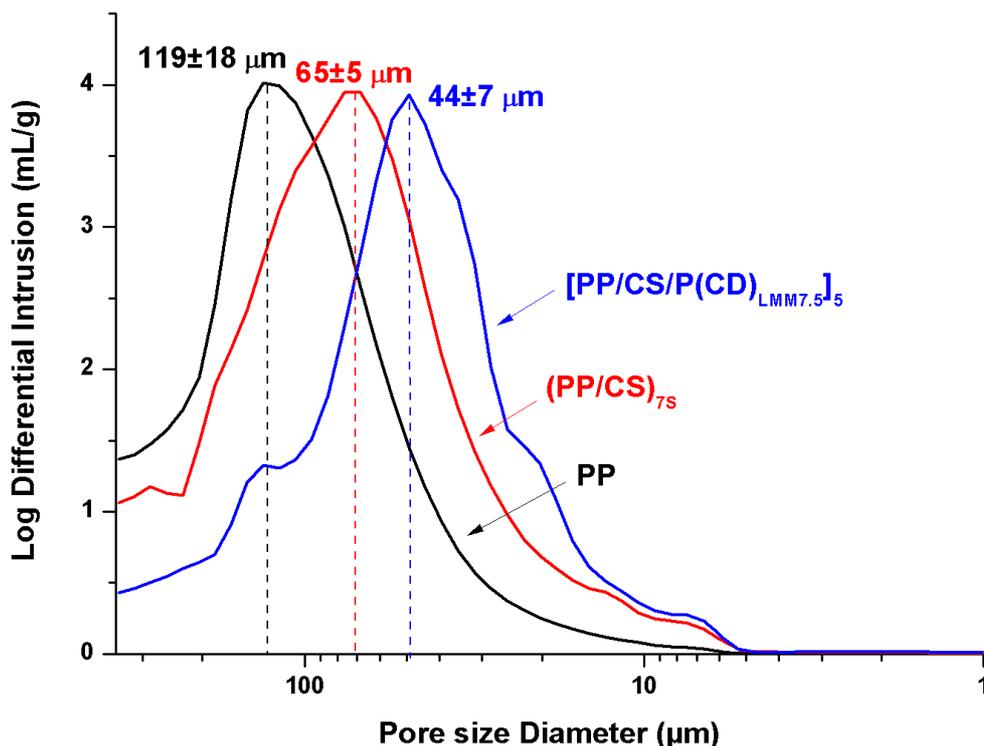


Figure 34. MIP profiles of a PP, (PP/CS)_{7 spray} and [PP/CS/P(CD)_{LMM7.5}]₅

Pour étudier l'influence de la masse molaire du polymère de cyclodextrine P(CD) sur la qualité du dépôt, nous avons utilisé une solution de P(CD)_{HMM} de haute masse molaire à 3 g.L⁻¹. Au-delà de 3 g.L⁻¹, la solution de P(CD)_{HMM} est trop visqueuse et ne s'adapte pas au processus développé. La solution de P(CD)_{HMM} à 3 g.L⁻¹ a une viscosité plus élevée que la solution de P(CD)_{LMM} de faible masse molaire à 7.5 g.L⁻¹. La **Figure 35** compare les valeurs de gain massique, les valeurs de R₁ et R₂ pour les matériaux multicouches préparés avec une solution de P(CD)_{HMM} à 3 g.L⁻¹ et une solution de P(CD)_{LMM} à 7.5 g.L⁻¹. Les résultats montrent des valeurs plus élevées avec l'utilisation d'une solution de P(CD) de haute masse molaire en raison de la viscosité qui est plus élevée. Il est donc préférable d'utiliser un P(CD) de haute masse molaire à faible concentration (3 g.L⁻¹).

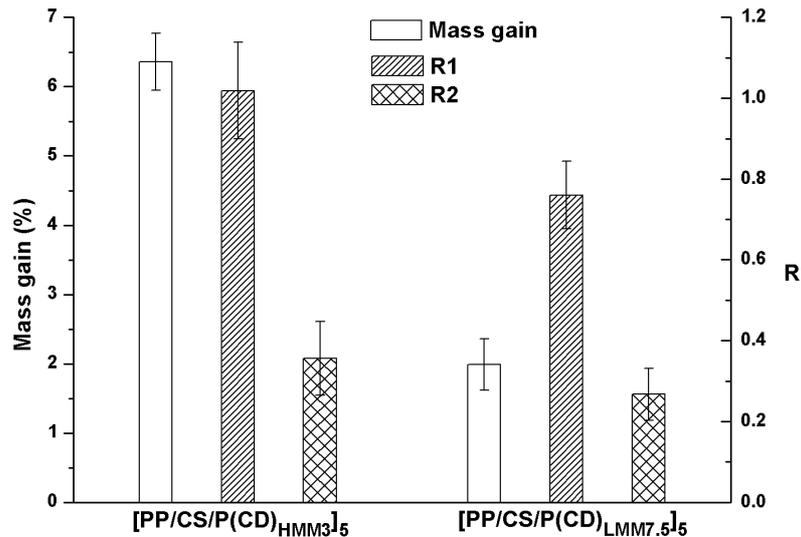
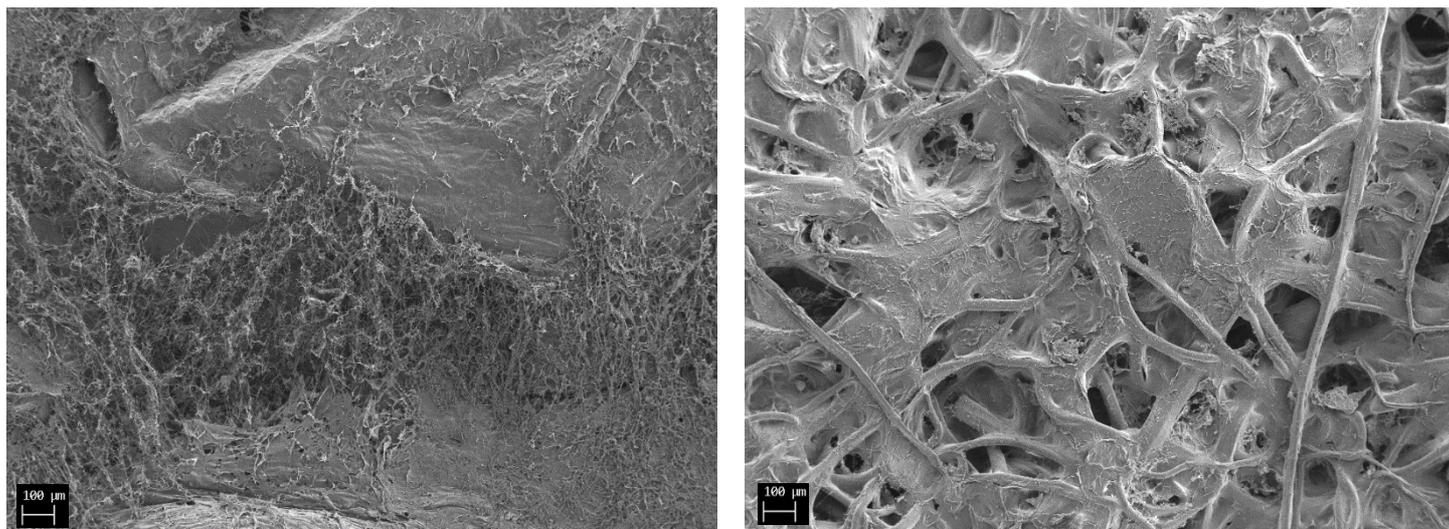


Figure 35. Influence of the molar mass of P(CD) solution on mass gain, R₁ et R₂ of the [PP/CS/P(CD)_{LMM7.5}]₅ and [PP/CS/P(CD)_{HMM3}]₅

Les analyses MEB couplées à l'EDX confirment ces résultats (**Figure 36**). Les images MEB montrent que le P(CD)_{HMM} a complètement recouvert la surface du filtre PP et provoqué l'obstruction des pores, ce qui pourrait être problématique pour l'application envisagée. Pour le P(CD) ayant un degré de substitution DS de 0.89, la composition atomique est de 55% de carbone et 45% d'oxygène. Pour chaque matériau multicouches, une composition atomique moyenne de 7% d'azote, caractéristique du chitosane, a été détectée. On peut l'expliquer soit parce que le P(CD) n'a pas recouvert toute la surface, soit parce que la couche de P(CD) est si mince qu'il est encore possible de détecter le chitosane.



Element	Composition (% at.)
Carbon	58.9±1.1
Oxygen	34.0±1.9
Nitrogen	7.2±0.8

(a)

Element	Composition (% at.)
Carbon	76.4±2.1
Oxygen	15.9±1.0
Nitrogen	7.8±1.1

(b)

Figure 36. SEM images and EDX analyses of [PP/CS/ P(CD)_{HMM3}]₅ (a) and [PP/CS/ P(CD)_{LMM7.5}]₅ (b)

Les meilleures conditions d'élaboration des matériaux multicouches étant mises au point, nous avons préparé les matériaux contenant le carvacrol. Par conséquent, les échantillons [PP/CS/P(CD)_{HMM3}-Carv]₅ et [PP/CS/P(CD)_{LMM7.5}-Carv]₅ ont été préparés dans les mêmes conditions que précédemment, c'est à dire par imprégnation "continue". Les gains de masse et les rapports R_1 et R_2 ont été déterminés par FTIR et rassemblés sur la **Figure 37**. Le gain de masse ainsi que les valeurs de R_1 et R_2 sont plus élevés avec la solution de P(CD)_{HMM3} comme ce qui avait été observé précédemment avec les polymères de CD sans carvacrol. L'influence de la masse molaire sur l'efficacité d'adsorption a déjà été montré dans la littérature²⁵⁻²⁸. Ces deux systèmes ont été étudiés afin de comparer à la fois leurs activités antiradicalaires et antibactériennes.

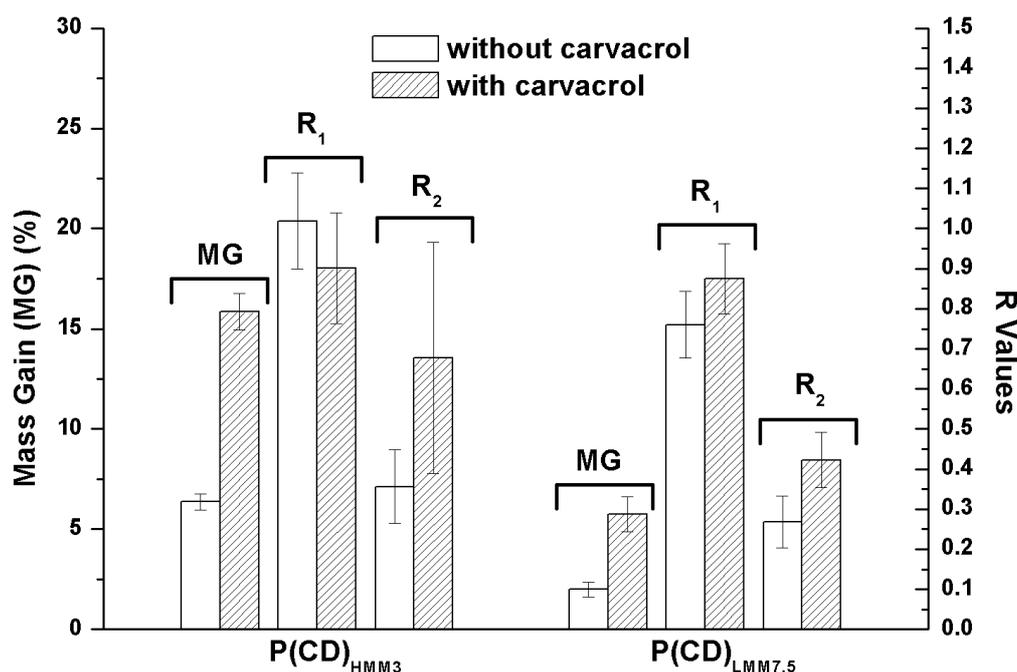


Figure 37. Influence of the concentration of the P(CD)-carv solution and the molar mass on mass gain (MG), R₁ and R₂ of [PP/CS/ P(CD)_{HMM3}-Carv]₅ and [PP/CS/ P(CD)_{LMM7.5}-Carv]₅

III-2-3. Etude des activités antiradicalaires et antibactériennes des matériaux multicouches

La méthode utilisée pour mesurer l'activité antiradicalaire est celle du piégeage des radicaux libres par la DPPH. Sans activité antiradicalaire, les échantillons [PP/CS/P(CD)_{LMM7.5}]₅ ont une couleur pourpre, couleur qui correspond à une absorbance UV-visible maximale à 517 nm. En présence de carvacrol, les matériaux [PP/CS/P(CD)_{HMM3}-Carv]₅ et du [PP/CS/P(CD)_{LMM7.5}-Carv]₅ sont devenus jaunes avec le temps et nous avons observé une diminution importante du pic d'absorption à 517 nm témoin d'une forte activité antiradicalaire.

La **Figure 38** montre l'évolution de l'activité antiradicalaire jusqu'à 21 heures. Le [PP/CS/P(CD)_{LMM7.5}]₅ montre une légère activité antiradicalaire, même sans carvacrol, en raison de l'activité antiradicalaire et de piégeage des radicaux libres du chitosane³⁷. Le [PP/CS/P(CD)_{HMM3}-Carv]₅ est légèrement plus antioxydant que [PP/CS/P(CD)_{LMM7.5}-Carv]₅ très certainement en raison d'un dépôt plus important de polymère. En effet la viscosité de la solution P(CD)-carv à 3 g.L⁻¹ est plus élevée. La forte activité initiale de piégeage des radicaux libres après 1 heure est due à la décomplexation du carvacrol en présence de méthanol alors

que l'augmentation progressive de cette activité entre 1h et 20h est très certainement due à la diffusion du carvacrol dans les différentes couches déposées à la surface du PP.

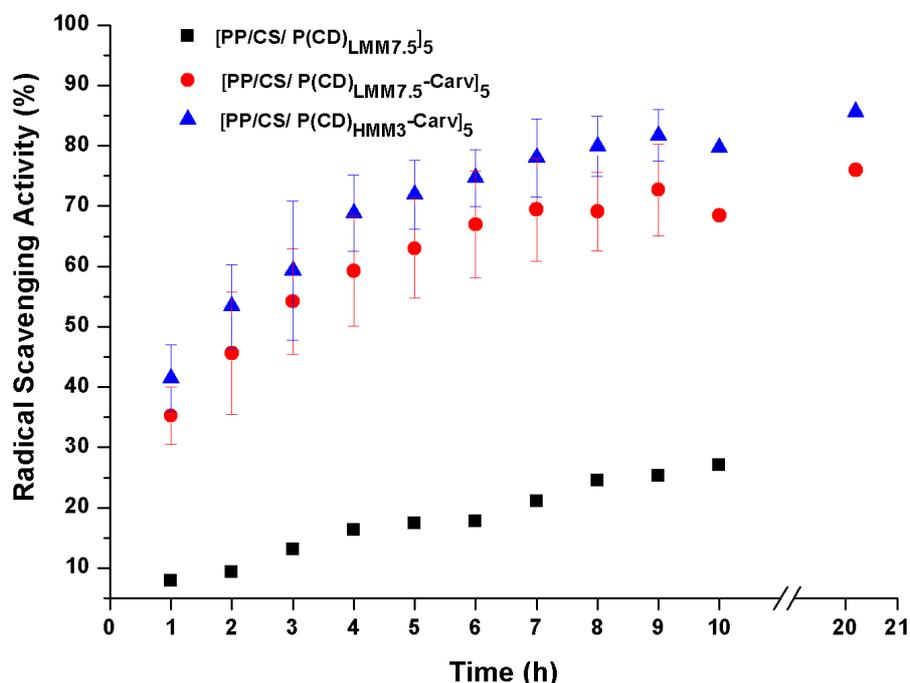


Figure 38. Kinetic study of the Radical Scavenger Activity for [PP/CS/P(CD)_{LMM7.5}]₅, [PP/CS/P(CD)_{HMM3-Carv}]₅ and [PP/CS/P(CD)_{LMM7.5-Carv}]₅

Les propriétés antibactériennes des matériaux multicouches ont été étudiées avec deux souches de bactéries (*E. coli* et *S. aureus*). Les mesures ont été réalisées après 3 heures d'incubation dans la suspension bactérienne. La **Figure 39** montre le nombre de bactéries adhérentes (CFU/cm²) calculé par les post-tests ANOVA et StatAdvisor. Les valeurs CFU/cm² de [PP/CS/P(CD)_{LMM7.5}]₅ sont très inférieures à celles du PP pour les deux bactéries en raison à la fois de la présence de chitosane, connu pour ses propriétés antibactériennes et de la présence du carvacrol.

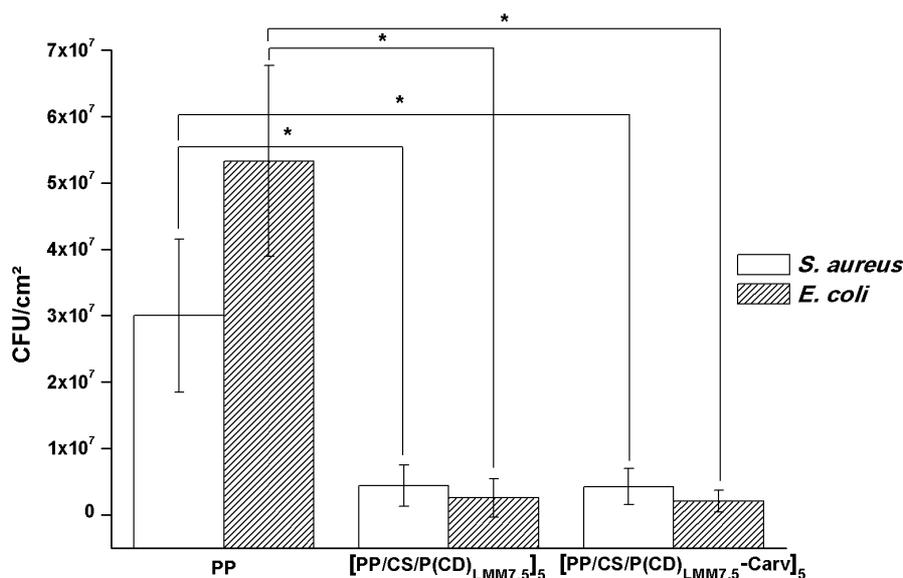


Figure 39. Antibacterial test of PP, [PP/CS/P(CD)_{LMM7.5}]₅ and [PP/CS/P(CD)_{LMM7.5}-Carv]₅

Conclusion

Dans ce chapitre, une stratégie de modification de surface d'un filtre en PP par la méthode de « layer by layer » à base d'un polymère cationique, le chitosane, et un polymère anionique, le P(CD) a été développée. La première étape est d'immobiliser efficacement le chitosane à la surface du PP. La réussite de cette méthode dépend principalement de la bonne adhésion de la couche primaire de chitosane à la surface du filtre. Ainsi, nous avons opté pour une technique de pulvérisation. Cela a permis un gain de masse et une homogénéité beaucoup plus intéressante que la méthode d'imprégnation. La deuxième étape a consisté à imprégner de manière « continue » le matériau successivement dans une solution de P(CD) complexée avec le carvacrol puis de chitosane jusqu'à obtenir un matériau possédant un total de 10 couches. Cette méthode a permis de faire émerger 2 structures : [PP/CS/P(CD)_{HMM3}-Carv]₅ et du [PP/CS/P(CD)_{LMM7.5}-Carv]₅. Néanmoins, parmi ces 2 structures, seule la méthode permettant d'aboutir au matériau [PP/CS/P(CD)_{LMM7.5}-Carv]₅ est conservée. En effet, un P(CD) de masse molaire trop importante engendre une obstruction des pores, visible par MEB, et ne sera donc pas adapté à l'application envisagée. Les propriétés antioxydantes et antibactériennes ont également été étudiées. Les résultats montrent une excellente activité antioxydante et antibactérienne comparées au matériau non modifié. Il semblerait néanmoins que l'ajout de carvacrol n'ait pas d'influence sur les propriétés antibactériennes du matériau. Soit en raison de la diffusion lente du carvacrol au sein du matériau ou de la présence de chitosane en face externe qui possède déjà des propriétés antibactériennes.

Références

- (1) del Hoyo-Gallego, S.; Pérez-Álvarez, L.; Gómez-Galván, F.; Lizundia, E.; Kuritka, I.; Sedlarik, V.; Laza, J. M.; Vila-Vilela, J. L. Construction of Antibacterial Poly(Ethylene Terephthalate) Films via Layer by Layer Assembly of Chitosan and Hyaluronic Acid. *Carbohydr. Polym.* **2016**, *143*, 35–43. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2016.02.008>.
- (2) Chen, C.; Illergård, J.; Wågberg, L.; Ek, M. Effect of Cationic Polyelectrolytes in Contact-Active Antibacterial Layer-by-Layer Functionalization. *Holzforschung* **2017**, *71* (7–8), 649–658. <https://doi.org/10.1515/hf-2016-0184>.
- (3) Goy, R. C.; Britto, D. de; Assis, O. B. G. A Review of the Antimicrobial Activity of Chitosan. *Polímeros* **2009**, *19* (3), 241–247. <https://doi.org/10.1590/S0104-14282009000300013>.
- (4) Vilar Junior, J. C.; Ribeaux, D. R.; Alves da Silva, C. A.; De Campos-Takaki, G. M. Physicochemical and Antibacterial Properties of Chitosan Extracted from Waste Shrimp Shells. *Int. J. Microbiol.* **2016**, *2016*. <https://doi.org/10.1155/2016/5127515>.
- (5) Sagheer, F. A. A.; Al-Sughayer, M. A.; Muslim, S.; Elsabee, M. Z. Extraction and Characterization of Chitin and Chitosan from Marine Sources in Arabian Gulf. *Carbohydr. Polym.* **2009**, *77* (2), 410–419. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2009.01.032>.
- (6) Rabea, E. I.; Badawy, M. E.-T.; Stevens, C. V.; Smaghe, G.; Steurbaut, W. Chitosan as Antimicrobial Agent: Applications and Mode of Action. *Biomacromolecules* **2003**, *4* (6), 1457–1465. <https://doi.org/10.1021/bm034130m>.
- (7) Kong, M.; Chen, X. G.; Xing, K.; Park, H. J. Antimicrobial Properties of Chitosan and Mode of Action: A State of the Art Review. *Int. J. Food Microbiol.* **2010**, *144* (1), 51–63. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2010.09.012>.
- (8) Fu, J.; Ji, J.; Fan, D.; Shen, J. Construction of Antibacterial Multilayer Films Containing Nanosilver via Layer-by-Layer Assembly of Heparin and Chitosan-Silver Ions Complex. *J. Biomed. Mater. Res. A* **2006**, *79A* (3), 665–674. <https://doi.org/10.1002/jbm.a.30819>.
- (9) Chen, C.; Illergård, J.; Wågberg, L.; Ek, M. Effect of Cationic Polyelectrolytes in Contact-Active Antibacterial Layer-by-Layer Functionalization. *Holzforschung* **2017**, *71* (7–8), 649–658. <https://doi.org/10.1515/hf-2016-0184>.
- (10) Fu, J.; Ji, J.; Yuan, W.; Shen, J. Construction of Anti-Adhesive and Antibacterial Multilayer Films via Layer-by-Layer Assembly of Heparin and Chitosan. *Biomaterials* **2005**, *26* (33), 6684–6692. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2005.04.034>.
- (11) Jin, F.; Xiang, Q.; Chen, X.; Peng, X.; Xing, X. An Environmentally Benign Dual Action Antimicrobial: Quaternized Chitosan/Sodium Alga Acid Multilayer Films and Silver Nanoparticles Decorated on Magnetic Nanoparticles. *J. Biomater. Sci. Polym. Ed.* **2016**, *27* (14), 1447–1461. <https://doi.org/10.1080/09205063.2016.1210861>.
- (12) Lv, H.; Chen, Z.; Yang, X.; Cen, L.; Zhang, X.; Gao, P. Layer-by-Layer Self-Assembly of Minocycline-Loaded Chitosan/Alginate Multilayer on Titanium Substrates to Inhibit Biofilm Formation. *J. Dent.* **2014**, *42* (11), 1464–1472. <https://doi.org/10.1016/j.jdent.2014.06.003>.
- (13) Zhong, X.; Song, Y.; Yang, P.; Wang, Y.; Jiang, S.; Zhang, X.; Li, C. Titanium Surface Priming with Phase-Transited Lysozyme to Establish a Silver Nanoparticle-Loaded Chitosan/Hyaluronic Acid Antibacterial Multilayer via Layer-by-Layer Self-Assembly. *PLOS ONE* **2016**, *11* (1), e0146957. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0146957>.
- (14) Kurkov, S. V.; Loftsson, T. Cyclodextrins. *Int. J. Pharm.* **2013**, *453* (1), 167–180. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2012.06.055>.
- (15) Park, E.-S.; Moon, W.-S.; Song, M.-J.; Kim, M.-N.; Chung, K.-H.; Yoon, J.-S. Antimicrobial Activity of Phenol and Benzoic Acid Derivatives. *Int. Biodeterior. Biodegrad.* **2001**, *47* (4), 209–214. [https://doi.org/10.1016/S0964-8305\(01\)00058-0](https://doi.org/10.1016/S0964-8305(01)00058-0).
- (16) Muñoz-Bonilla, A.; Fernández-García, M. Polymeric Materials with Antimicrobial Activity. *Prog. Polym. Sci.* **2012**, *37* (2), 281–339. <https://doi.org/10.1016/j.progpolymsci.2011.08.005>.
- (17) Babili, F. E.; Bouajila, J.; Souchard, J. P.; Bertrand, C.; Bellvert, F.; Fouraste, I.; Moulis, C.; Valentin, A. Oregano: Chemical Analysis and Evaluation of Its Antimalarial, Antioxidant, and Cytotoxic Activities. *J. Food Sci.* **2011**, *76* (3), C512–C518. <https://doi.org/10.1111/j.1750-3841.2011.02109.x>.

- (18) Fenaroli's Handbook of Flavor Ingredients, Sixth Edition <https://www.crcpress.com/Fenarolis-Handbook-of-Flavor-Ingredients-Sixth-Edition/Burdock/p/book/9781420090772> (accessed May 4, 2018).
- (19) Arunasree, K. M. Anti-Proliferative Effects of Carvacrol on a Human Metastatic Breast Cancer Cell Line, MDA-MB 231. *Phytomedicine Int. J. Phytother. Phytopharm.* **2010**, *17* (8–9), 581–588. <https://doi.org/10.1016/j.phymed.2009.12.008>.
- (20) Renard, E.; Volet, G.; Amiel, C. Synthesis of a Novel Linear Water-Soluble β -Cyclodextrin Polymer. *Polym. Int.* **2005**, *54* (3), 594–599. <https://doi.org/10.1002/pi.1742>.
- (21) Jouki, M.; Yazdi, F. T.; Mortazavi, S. A.; Koocheki, A. Quince Seed Mucilage Films Incorporated with Oregano Essential Oil: Physical, Thermal, Barrier, Antioxidant and Antibacterial Properties. *Food Hydrocoll.* **2014**, *36*, 9–19. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2013.08.030>.
- (22) Zouari, S.; Ketata, M.; Boudhrioua, N.; Ammar, E. Allium Roseum L. Volatile Compounds Profile and Antioxydant Activity for Chemotype Discrimination – Case Study of the Wild Plant of Sfax (Tunisia). *Ind. Crops Prod.* **2013**, *41*, 172–178. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2012.04.020>.
- (23) Kirby, A. J.; Schmidt, R. J. The Antioxidant Activity of Chinese Herbs for Eczema and of Placebo Herbs--I. *J. Ethnopharmacol.* **1997**, *56* (2), 103–108.
- (24) El Youbi, A. E. H.; Bousta, D.; Jamoussi, B.; Greche, H.; El Mansouri, L.; Benjilali, J.; Soidrou, S. H. Activités antioxydante, apoptotique et antiproliférative de *Tetraena gaetula* (Emb. & Maire) Beier & Thulin et de *Berberis hispanica* Boiss. & Reut. originaires du Maroc. *Phytothérapie* **2012**, *10* (3), 151–160. <https://doi.org/10.1007/s10298-012-0704-3>.
- (25) Bekale, L.; Agudelo, D.; Tajmir-Riahi, H. A. Effect of Polymer Molecular Weight on Chitosan-Protein Interaction. *Colloids Surf. B Biointerfaces* **2015**, *125*, 309–317. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2014.11.037>.
- (26) Gan, Q.; Wang, T. Chitosan Nanoparticle as Protein Delivery Carrier--Systematic Examination of Fabrication Conditions for Efficient Loading and Release. *Colloids Surf. B Biointerfaces* **2007**, *59* (1), 24–34. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2007.04.009>.
- (27) Janes, K. A.; Calvo, P.; Alonso, M. J. Polysaccharide Colloidal Particles as Delivery Systems for Macromolecules. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **2001**, *47* (1), 83–97.
- (28) Sabnis, S.; Block, L. H. Chitosan as an Enabling Excipient for Drug Delivery Systems. I. Molecular Modifications. *Int. J. Biol. Macromol.* **2000**, *27* (3), 181–186.

Chapitre IV : Fonctionnalisation de supports filtrant en polypropylène par de l'acide tannique

Introduction

Ce chapitre présente deux approches permettant la modification des supports en PP avec de l'acide tannique (AT), un polyphénol d'origine naturelle. L'acide tannique est extrait de nombreux végétaux, comme les baies, les agrumes, les céréales, le thé ou les herbes¹ mais aussi des résidus de raisin issus de l'industrie vinicole²⁻⁴. Sa structure chimique est composée de 10 motifs d'acide gallique, un composé organique aromatique de la famille des acides hydroxybenzoïques, possédant une fonction carboxylique et trois groupements phénols (**Tableau 22**). Les nombreux groupements phénols terminaux de l'acide tannique lui confèrent des propriétés antioxydantes⁵⁻⁷, antibactériennes^{5,8,9} et une certaine stabilité thermique¹⁰. L'acide tannique est utilisé dans de nombreuses applications industrielles, la plus connue étant le tannage du cuir, mais également dans des applications telles que les revêtements, les matériaux adsorbants et antibactériens et les nanomatériaux¹¹⁻¹⁵.

Dans cette étude, 2 stratégies ont été mises en place afin de fonctionnaliser un support en polypropylène avec de l'acide tannique afin de rendre le support filtrant antibactérien. La première est l'extrusion réactive du PP avec l'AT en présence (ou non) de peroxyde de dicumyle (DCP) pour greffer directement l'acide tannique sur le PP. La deuxième stratégie consiste à polymériser l'AT au travers d'une couche poreuse de PP que nous avons extraite d'un masque de protection commercial. Dans un premier temps, l'acide tannique natif, ou un dérivé polyméthacrylaté de l'acide tannique, a été réticulé au travers du support filtrant avec ou sans photo-amorceur. Dans cette approche, l'acide tannique se trouve immobilisé de manière physique au travers du mat poreux. Une autre voie a été étudiée en parallèle qui consiste à greffer chimiquement l'acide tannique sur le support filtrant en milieu alcalin. Les stratégies envisagées sont illustrées dans la **Figure 40**.

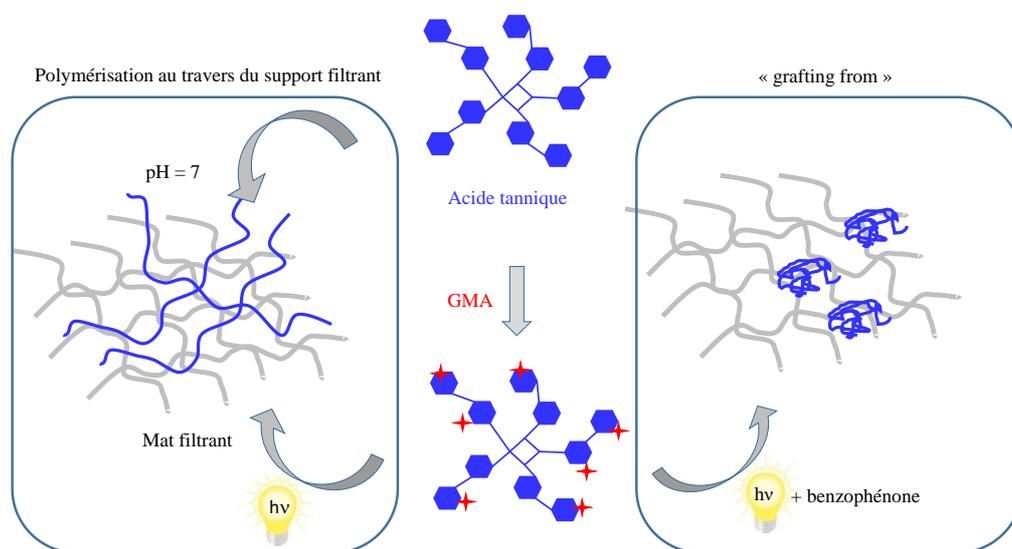


Figure 40. Stratégies d'immobilisation de l'acide tannique sur un mat poreux médian d'un masque commercial

Tableau 22. Structure des molécules réactives

Composés	Structures
Polypropylène (PP)	$\left[\text{CH}_2 - \underset{\text{CH}_3}{\text{CH}} \right]_n$
Acide tannique (AT)	

IV-1. Greffage de l'acide tannique sur un support en PP par extrusion réactive

L'objectif de cette étude est de réaliser par extrusion réactive le couplage de l'AT sur le PP par un mécanisme radicalaire en présence de peroxyde de dicumyle DCP. En présence d'un amorceur radicalaire tel que le DCP on s'attend à obtenir différents types de réaction dont il conviendra de préciser quels sont les mécanismes majoritaires. En effet, les radicaux générés lors de la décomposition du DCP peuvent induire en plus de la réaction de greffage de l'acide tannique souhaitée, des réactions de réticulation ou des coupures de chaînes^{16,17}. Des éprouvettes à base de PP et 10% en masse d'AT en présence (ou non) de 5% DCP ont été

préparées par extrusion-injection. La composition des échantillons préparés est présentée dans le **Tableau 23**.

Tableau 23. Composition des éprouvettes préparées par extrusion-injection

Eprouvettes	PP (% , g/g)	AT (% , g/g)	DCP (% , g/g)
PP ₉₀ AT ₁₀	90	10	0
PP ₈₅ AT ₁₀ DCP ₅	85	10	5

L'analyse par TGA montre que la dégradation de l'acide tannique seul se déroule en deux étapes à des températures supérieures à 150°C avec des pics maximaux à 277°C et 450°C (**Figure 41**). La 1^{ère} étape correspond à une perte de masse de 74% alors que la deuxième correspond à une perte de masse de 20%. Entre 50 et 150°C la perte de masse de 6% correspond au départ de l'eau contenue dans l'acide tannique. La dégradation thermo-oxydative de l'acide tannique est due à des réactions de décarboxylation qui conduisent à la formation dans un premier temps à la formation de CO₂ et de 1,2,3 benzène triol par rupture des liaisons ester. Puis à des températures plus hautes, supérieures à 370°C les réactions d'oxydation génèrent la formation de CO₂ et de CO¹⁷. L'addition d'acide tannique dans le PP permet d'augmenter la résistance thermique du PP car la température correspondant à une perte de masse de 10% (T10%) augmente de 310°C à 347°C en présence de 10% d'acide tannique (**Tableau 24**). Cet effet est moins important lorsque le PP est mis en œuvre en présence de DCP car la température T10% est de 325°C, laissant supposer une modification du PP par rapport à la mise en œuvre sans DCP. Quoiqu'il en soit cette augmentation de température reste significative.

Tableau 24. Caractérisation des matériaux par TGA

Paramètres	Dégradation thermo-oxydante			
	Acide tannique	PP	PP ₉₀ AT ₁₀	PP ₈₅ AT ₁₀ DCP ₅
T de dégradation (°C)	277	410	408	411
T10% (°C)	227	310	347	325
T50% (°C)	293	395	409	407
Résidu à 500°C (%)	0	6.3	3.4	4.7

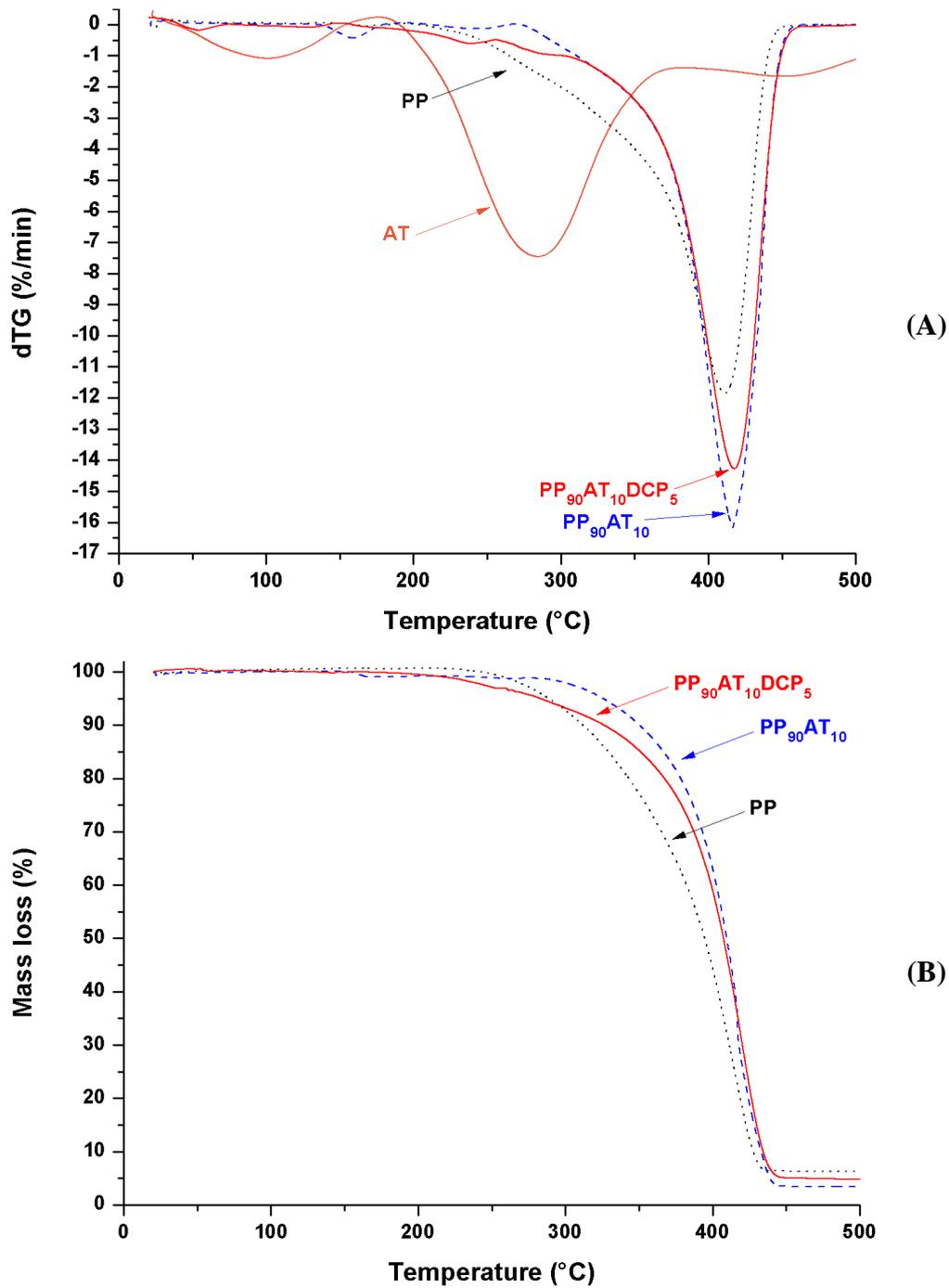


Figure 41. DTG (A) et TGA curves (B) of thermo-oxidative degradation of AT, PP, PP₉₀AT₁₀ et PP₈₅AT₁₅DCP₅

Une fois les éprouvettes PP₉₀AT₁₀ et PP₈₅AT₁₀DCP₅ obtenues par extrusion-injection, les échantillons ont été découpés (1 cm²) puis immergés 120h dans le méthanol afin d'étudier le relargage de l'acide tannique non greffé. La perte de masse a été mesurée par gravimétrie. La **Figure 42B** montre l'évolution de la perte de masse pour les échantillons PP₉₀AT₁₀ et PP₈₅AT₁₀DCP₅.

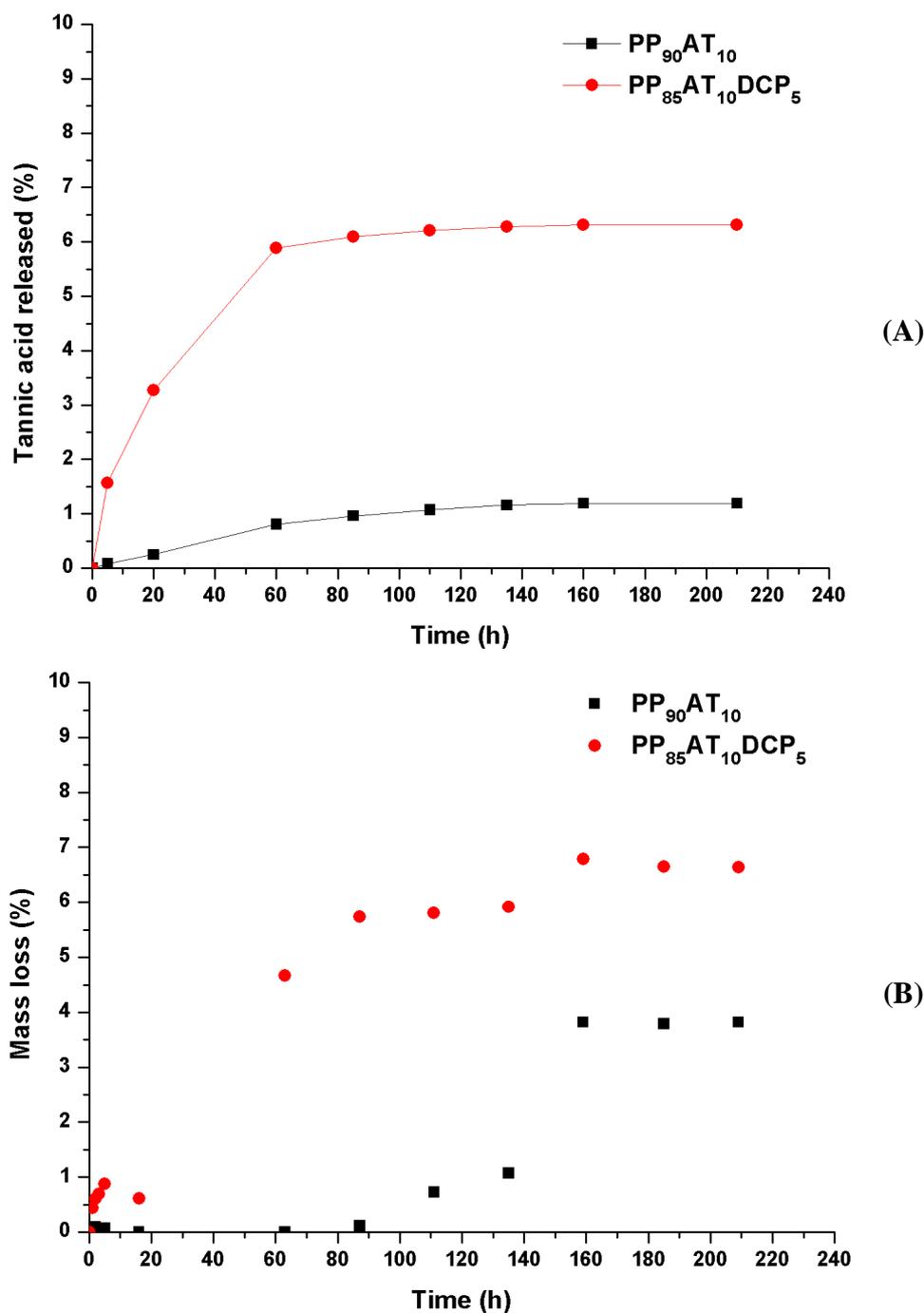


Figure 42. Pourcentage d'acide tannique libéré (déterminé par spectroscopie UV-visible) (A) et perte de masse (déterminée par gravimétrie) au cours de l'immersion des échantillons dans le méthanol (B).

Une coloration de la solution est observée au cours du temps (**Figure 43**). Cette couleur est caractéristique de l'acide tannique. Nous avons mis au point une méthode de dosage de l'acide tannique en solution par spectrophotométrie UV-visible en établissant une courbe d'étalonnage (**Figure 44**) afin de déterminer la concentration en acide tannique dans la solution. Connaissant la masse totale de nos échantillons nous avons ensuite calculé le pourcentage massique d'acide tannique libéré (**Figure 42A**).

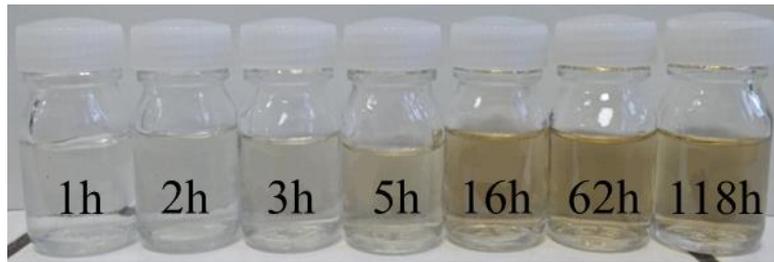


Figure 43. Coloring of the solution according to the extraction time in methanol (PP₈₅AT₁₀DCP₅ specimens)

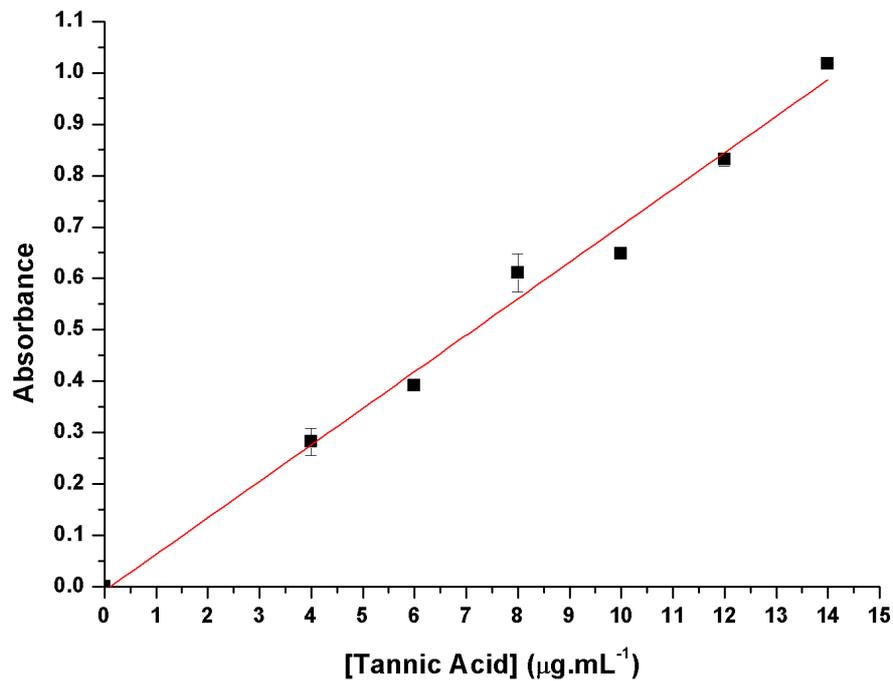


Figure 44. Courbe d'étalonnage de l'acide tannique dans le méthanol

Les profils de libération de l'acide tannique, déterminés par spectroscopie UV-visible, sont différents pour les 2 échantillons. La libération de l'acide tannique (**Figure 42a**), commence dès le début de l'immersion mais de façon beaucoup plus lente pour le PP₉₀AT₁₀. La teneur maximale libérée est également plus faible et n'atteint que 1% pour le PP₉₀AT₁₀ alors qu'elle est de 6.2% pour le PP₈₅AT₁₀DCP₅ au bout de 100 heures. Ce même phénomène est observé pour la perte de masse par gravimétrie. Le PP₈₅AT₁₀DCP₅ perd 6 % de masse alors que le PP₉₀AT₁₀ perd moins de 1% de perte de masse au bout de 100 heures. La perte de masse du PP₉₀AT₁₀ présente deux phases distinctes au cours du temps avec une période d'induction de 80 heures durant laquelle il n'y a quasiment pas de perte de masse puis une perte de masse plus importante atteignant 4%. Comme nous avons introduit 10% d'acide tannique dans les échantillons, il reste très certainement de l'acide tannique piégé ou greffé dans les éprouvettes

même après 220 heures d'extraction dans le méthanol. Les éprouvettes ont été analysées par FTIR/ATR pour mettre en évidence la présence d'acide tannique en surface dans les échantillons. Les pics caractéristiques de l'acide tannique sont les fonctions O-H (3287 cm^{-1}) les fonctions C=O (1698 cm^{-1}) et les C=C aromatiques à 1606 cm^{-1} . La **Figure 45** montre les spectres FTIR du PP, de l'acide tannique, du PP₉₀AT₁₀ et du PP₈₅AT₁₀DCP₅.

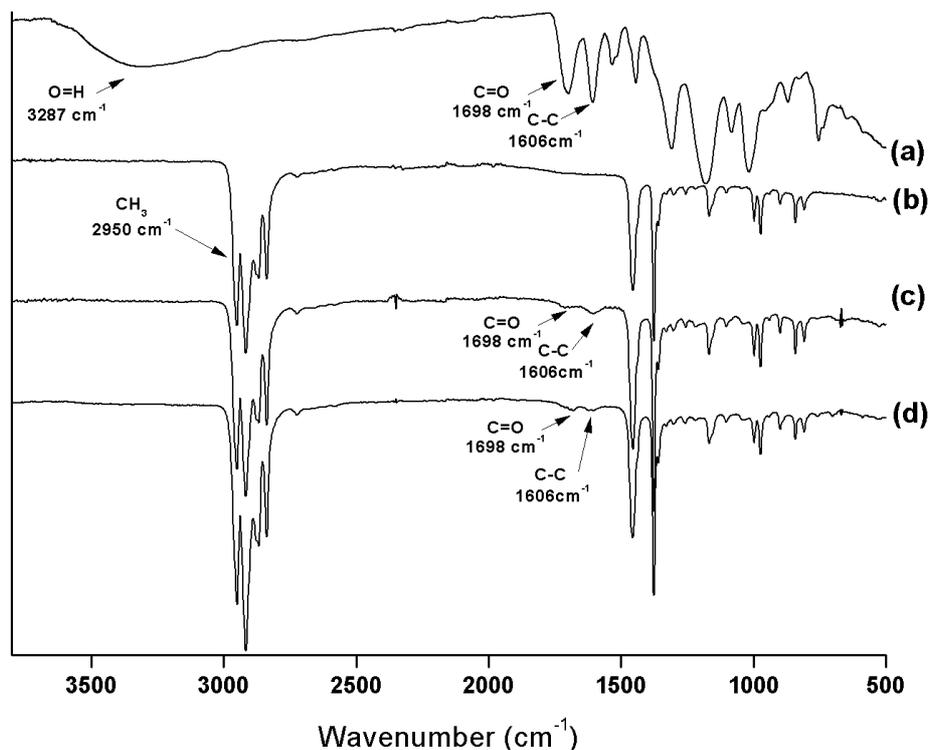


Figure 45. Spectres FTIR de l'acide tannique (a), du PP (b), du PP₉₀AT₁₀ (c) et du PP₈₅AT₁₀DCP₅ (d)

Pour chaque échantillon les rapports R_3 des intensités des bandes d'absorption correspondant aux pics situés respectivement à 1698 cm^{-1} , significatif de la présence d'acide tannique et à 2950 cm^{-1} caractéristiques du PP ont été calculés pour les échantillons initiaux et au bout de 120 et 210 heures d'immersion.

$$R_3 = \frac{I_{1698}}{I_{2950}}$$

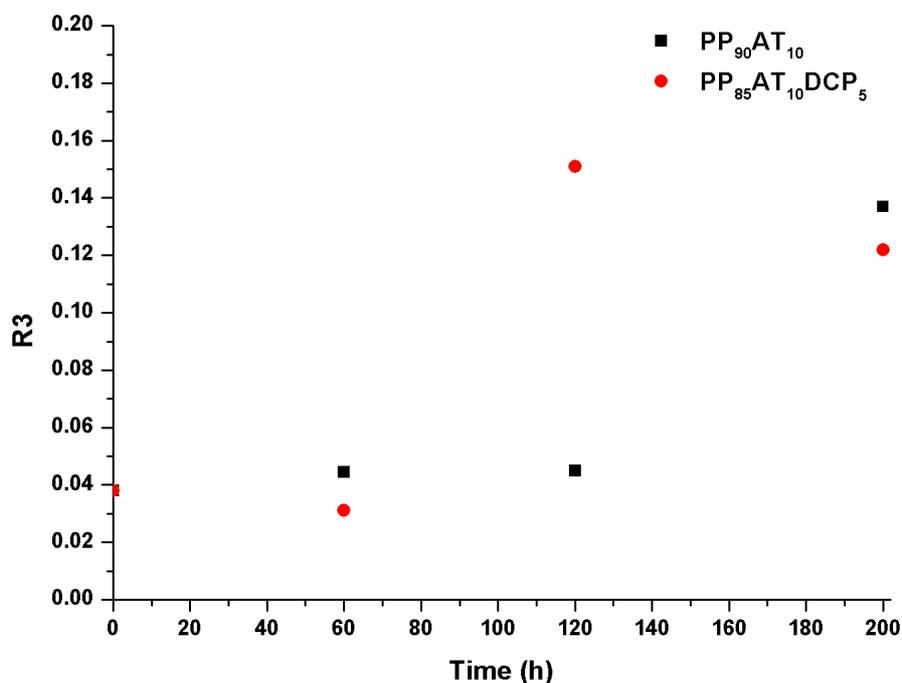


Figure 46. Evolution du rapport R3 en fonction du temps d'immersion dans le méthanol

Les résultats montrent que les deux échantillons présentent la même quantité d'acide tannique en surface avant immersion. Pour l'échantillon PP₉₀AT₁₀, la quantité d'acide tannique reste constante jusqu'à 120 heures puis augmente considérablement au bout de 210 heures (**Figure 46**). On peut faire l'hypothèse que l'acide tannique piégé au cœur de l'échantillon peut diffuser vers la surface. Pour l'échantillon PP₈₅AT₁₀DCP₅ la migration de l'acide tannique serait plus rapide et commencerait après 60 heures d'immersion.

En tenant compte des résultats obtenus par UV, gravimétrie et FTIR nous pouvons en conclure que les comportements des échantillons PP₉₀AT₁₀ et PP₈₅AT₁₀DCP₅ sont différents. La diffusion et la libération de l'acide tannique est plus importante dans le PP₈₅AT₁₀DCP₅. Pour expliquer ce phénomène nous pouvons faire l'hypothèse que les radicaux générés lors de la décomposition de l'acide tannique ont eu pour conséquence de couper des chaînes de PP, conduisant ainsi à une libération de l'acide tannique plus importante que dans le cas du PP₉₀AT₁₀.

Si on veut une libération plus rapide de l'acide tannique des supports en PP la présence de DCP est une bonne solution. Nous sommes ici dans des conditions d'extraction favorables car l'acide tannique est très soluble dans le méthanol. Cependant c'est une méthode d'extraction peu appropriée dans le cadre d'une utilisation des masques de PP comme système de filtration de l'air ambiant. Même dans ces conditions un peu extrêmes nous pouvons constater que de l'acide tannique reste encore dans le PP ce qui laisse supposer une action plus longue en absence de méthanol.

Activité antioxydante

La méthode utilisée pour mesurer l'activité antioxydante est celle du piégeage des radicaux libres par la DPPH. Sans présence d'acide tannique, la solution contenant le PP a une couleur pourpre, qui correspond à une absorbance UV-visible à 517 nm. En présence d'acide tannique, les solutions contenant les éprouvettes PP₉₀AT₁₀ et PP₈₅AT₁₀DCP₅ sont devenues jaunes et on observe une baisse importante du pic d'absorption à 517 nm (**Tableau 25**). Hormis la solution contenant le PP, toutes les solutions ont montré un RSA aux alentours de 95%, ce qui montre que même après 210h d'extraction, tout l'acide tannique n'a pas été extrait et que les échantillons continuent à présenter une activité antioxydante importante.

Tableau 25. Radical Scavenger Activity (RSA) pour les différents échantillons

Samples	Extraction time (h)	RSA (%)
PP	0	14.8±2.3
PP ₉₀ AT ₁₀	0	95.1±0.0
PP ₉₀ AT ₁₀	60	95.1±0.0
PP ₉₀ AT ₁₀	120	96.2±3.4
PP ₉₀ AT ₁₀	210	94.3±1.1
PP ₈₅ AT ₁₀ DCP ₅	0	95.1±0.0
PP ₈₅ AT ₁₀ DCP ₅	60	95.1±0.0
PP ₈₅ AT ₁₀ DCP ₅	120	94.1±0.9
PP ₈₅ AT ₁₀ DCP ₅	210	95.1±0.0

IV-2. Réticulation de l'acide tannique au travers du support médian

IV-2-1. Réticulation de l'acide tannique en milieu alcalin

L'objectif de cette étude est d'immobiliser de l'acide tannique à la surface d'une couche de masque de protection en PP par une méthode simple, économique et écologique. Il est reconnu que l'oxydation des polyphénols végétaux conduit à la formation d'espèces de masses molaires plus élevées¹⁸ responsables du brunissement des fruits et légumes riches en composés phénoliques. Ces réactions d'auto-oxydation peuvent conduire à la formation de revêtement comme cela a été montré dans plusieurs publications^{15,19}. Ces revêtements se forment à pH basique en présence d'oxygène. Certains auteurs, font souvent le parallèle avec la polymérisation de la dopamine, cependant dans ce cas des fonctions amine interviennent *via* une addition de Mickael. Le mécanisme de l'oligomérisation des polyphénols végétaux est

encore mal connu mais est à l'origine de la formation de ces revêtements qui sont stables en raison d'une diminution de solubilité. Nous avons cherché à valoriser les propriétés d'auto-oxydation de l'acide tannique pour fonctionnaliser un mat poreux commercial. Nous avons fait l'hypothèse que la formation de ces oligomères pourrait conduire à une fonctionnalisation physique du mat poreux en supposant que ces oligomères se forment au travers de ce maillage et seraient immobilisés tel un réseau semi-interpénétré.

Les mats de PP commerciaux poreux ont été immergés dans une solution tampon bis-tris (**Figure 47**) et d'acide tannique de 25 mL. Le pH de la solution a été ajusté à 7 avec une solution d'HCl à 0.1N. Après 88h d'imprégnation sous forte agitation, les échantillons sont séchés sous vide à 70°C pendant 1h. Après un rinçage de 24 heures dans de l'eau distillée, les échantillons sont séchés sous vide dans les mêmes conditions. A titre de comparaison, des échantillons ont été imprégnés dans une solution aqueuse témoin contenant uniquement de l'acide tannique (1 mg.mL⁻¹).

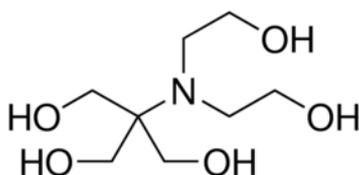


Figure 47. Formule chimique du bis-tris méthane

Les échantillons ont été étudiés par FTIR afin de suivre la présence de l'acide tannique avant et après rinçage à l'eau. La **Figure 48** montre le spectre du mat natif en polypropylène (a), le spectre après immersion dans la solution acide tannique/bis-tris (c) et le spectre après 24h de rinçage dans l'eau (d). Après immersion dans la solution d'acide tannique/bis-tris, on observe la présence d'acide tannique en surface résultant de l'enchevêtrement et réticulation de l'acide tannique au travers du maillage du mat en polypropylène.

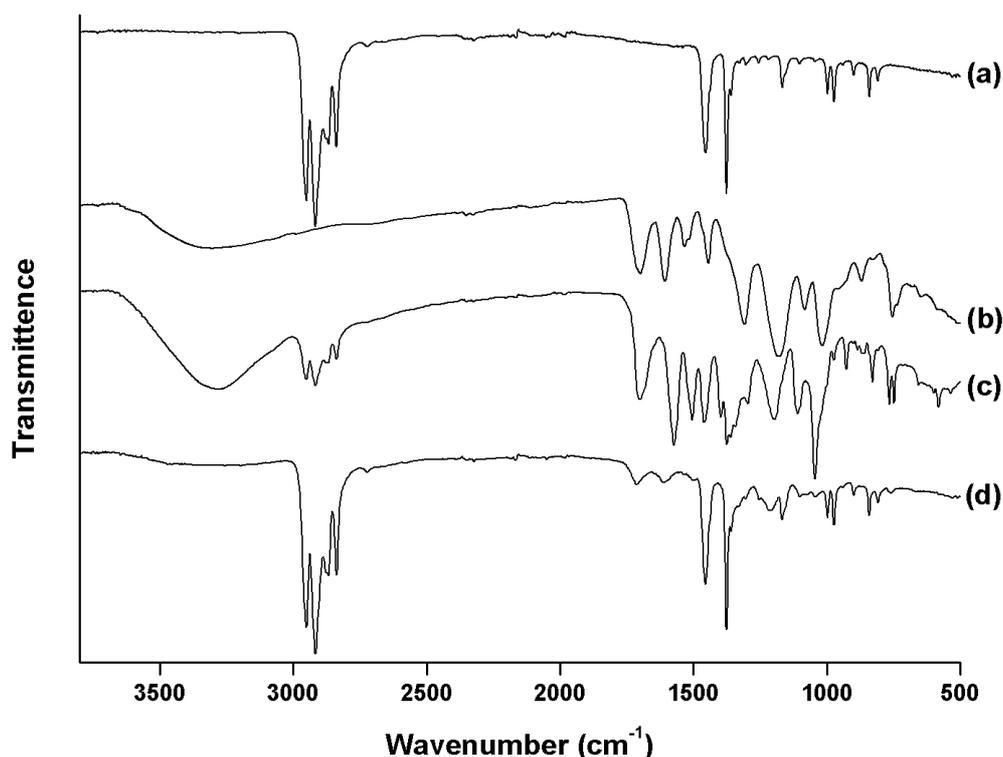


Figure 48. FTIR spectra of PP (a), AT (b), PP after immersion 88h in bis-tris/tannic acid solution (c) and after 24h of washing in water (d)

Les mêmes analyses ont été effectuées sur les échantillons témoins immergés dans la solution d'acide tannique sans bis-tris (**Figure 49**). Après imprégnation du mât dans l'acide tannique (c), les pics caractéristiques de l'acide tannique sont visibles mais beaucoup moins que lors de l'imprégnation dans la solution d'AT/bis-tris. Cela s'explique par le fait que le PP est hydrophobe et l'AT hydrophile donc l'acide tannique seul ne se fixe pas bien. Après 24h de rinçage, on n'observe plus de traces de l'acide tannique sur le mât (d). Les valeurs des rapports R_3 (**Tableau 26**) confirment bien la présence des enchevêtrements de l'acide tannique au travers du maillage du mât en polypropylène en milieu alcalin.

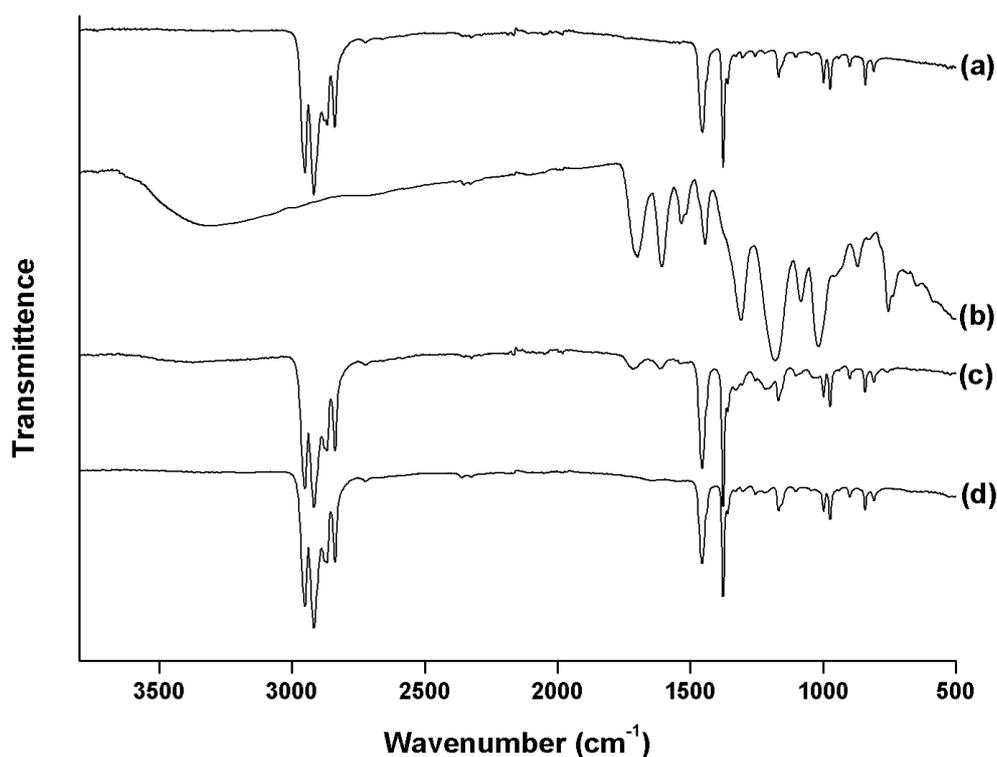


Figure 49. FTIR spectra of PP (a), tannic acid (b), PP after immersion 88h in tannic acid solution (c) and after 24h of washing in water (d)

Tableau 26. Valeurs du rapport R_3 déterminés par FTIR pour les échantillons imprégnés dans un solution d'acide tannique avec ou sans bis-tris (influence du rinçage à l'eau)

Polymerization of tannic acid	
	R_3
No washing	1.11
Washing	0.14
Adsorption of tannic acid	
No washing	0.10
Washing	0.04

Comme précédemment, on mesure l'activité antiradicalaire après 24h de rinçage à l'eau. Sans présence d'acide tannique, la solution contenant le PP ainsi que le film sur lequel a été adsorbé l'acide tannique ont une couleur pourpre correspondant à une absorbance UV-visible à 517 nm. En présence d'acide tannique, l'échantillon sur lequel l'acide tannique a été polymérisé est devenu jaune et on observe une baisse importante du pic d'absorption à 517 nm (**Tableau 27**). Le mât de PP imprégné dans la solution d'acide tannique contenant du bis-tris montre une activité antioxydante importante de 82.7%, ce qui confirme la polymérisation de l'acide tannique au travers du mât en PP, contrairement à l'échantillon sur lequel l'acide tannique a été

adsorbé qui montre une activité antioxydante de seulement 5.6%. Dans ce cas, la majorité de l'acide tannique a été extrait après le rinçage à l'eau.

Tableau 27. Radical Scavenger Activity (RSA) pour les différents échantillons

Samples	Method	RSA (%)
PP	-	10.0±1.5
PP+AT	Adsorption	5.6±3.1
PP+AT	Polymerization	82.7±10.3

IV-2-2. Réticulation d'un dérivé polyméthacrylaté de l'acide tannique

Nous avons synthétisé un dérivé polyméthacrylaté de l'acide tannique par réaction du méthacrylate de glycidyle (GMA) avec l'acide tannique. La réaction d'ouverture de la fonction époxyde par les fonctions phénol de l'acide tannique est catalysée par la triphénylphosphine (**Figure 50**). La réaction se déroule à reflux dans un mélange acétate d'éthyle/butylacétate (40/60).

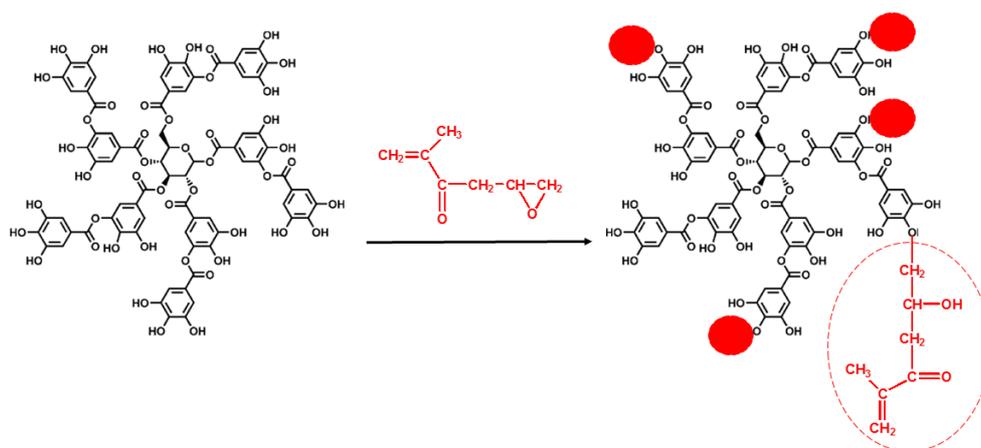


Figure 50. Synthèse de l'acide tannique polyméthacrylaté (AT-MA)

Deux dérivés ont été synthétisés en faisant varier le ratio d'acide tannique/GMA. Deux taux de substitution ont été préparés correspondant à 5 et 10 équivalents de méthacrylate par fonctions phénol dans le mélange réactionnel. La structure chimique des dérivés synthétisés a été déterminée par FTIR et RMN. Le spectre FTIR (**Figure 51**) montre clairement, la présence des doubles liaisons à 945 et 814 cm^{-1} . Ces bandes sont absentes du spectre de l'acide tannique. La bande à 1637 cm^{-1} est plus difficile à détecter car elle se superpose à celle de la bande des C=C aromatique très intense de l'acide tannique natif à 1606 cm^{-1} . Les bandes à 907 et 842 cm^{-1} qui correspondent au groupement époxyde du GMA sont absentes du spectre FTIR ce qui confirme le succès de la réaction. On notera la présence d'une bande large centrée à 3400 cm^{-1} qui

démontre qu'il reste des fonctions phénol, ce qui est cohérent avec le ratio des réactifs utilisé. La présence de ces fonctions phénol est indispensable à l'activité antibactérienne recherchée.

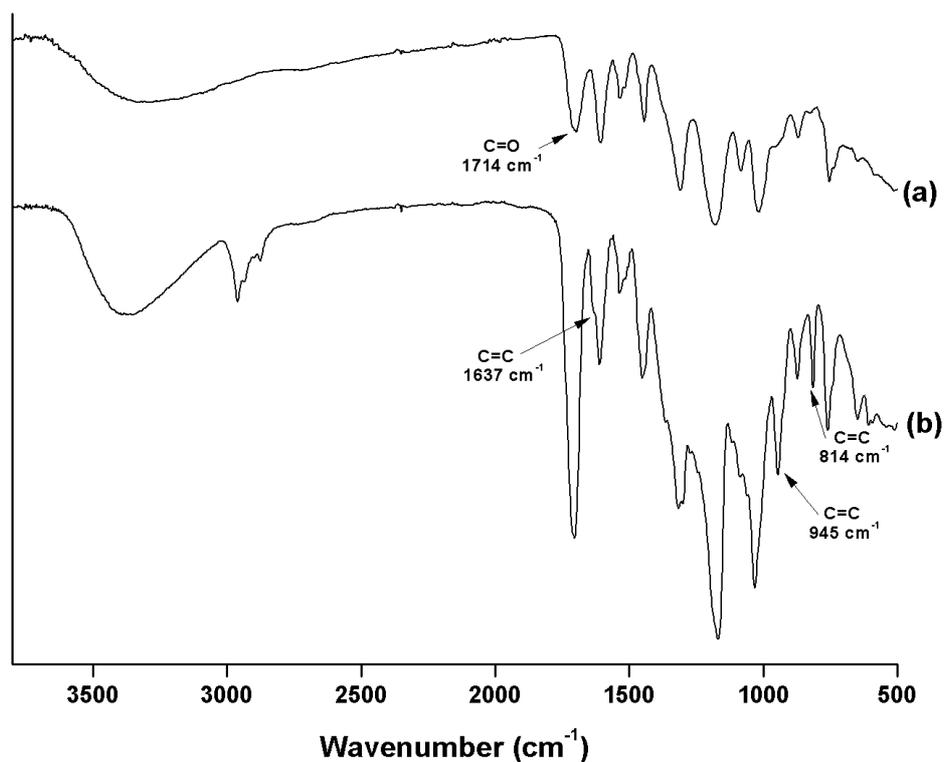


Figure 51. Spectres FTIR de l'acide tannique (a) et du dérivé AT-MA (b)

Le spectre RMN permet de calculer le taux de substitution de l'acide tannique (**Figure 52**). Le calcul du rapport des intégrations des protons aromatiques entre 6.7 et 7.25 ppm et des protons méthine (f) permet de calculer un taux de substitution de 10.55 et de 8.18 pour les dérivés préparés avec 10 et 5 équivalents GMA par fonctions phénol. Ce résultat montre que la réaction est quantitative et qu'il est facile de contrôler le taux de substitution de l'acide tannique.

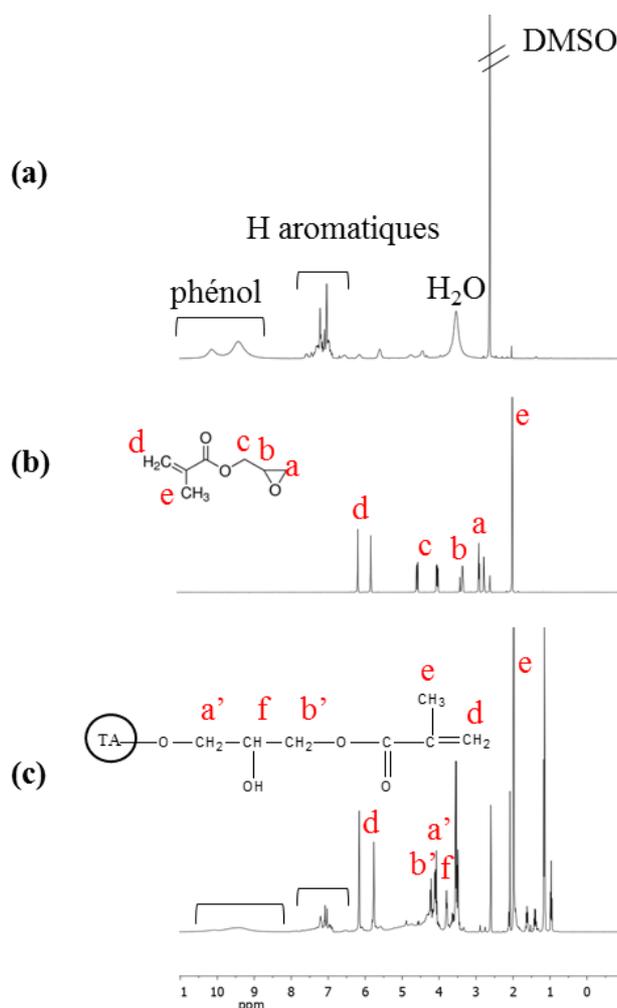


Figure 52. Spectres RMN ^1H dans le DMSO de l'acide tannique (a), du GMA (b) et d'un échantillon AT-MA (c) préparé avec 10 équivalents de GEMA par fonction phénol

Ces dérivés ont ensuite été polymérisés au travers du dispositif filtrant (support médian). Le procédé est relativement simple à mettre en œuvre, puisqu'il consiste à imprégner des échantillons (1.5 cm^2) dans une solution d'acide tannique fonctionnalisé en présence ou non de 2,2-diméthoxyphényl-acétophénone (DMPA) comme photoamorceur (**Figure 53**). Les mats sont ensuite irradiés sur les deux faces puis extraits dans le méthanol afin d'éliminer l'acide tannique non polymérisé au travers du mat poreux.

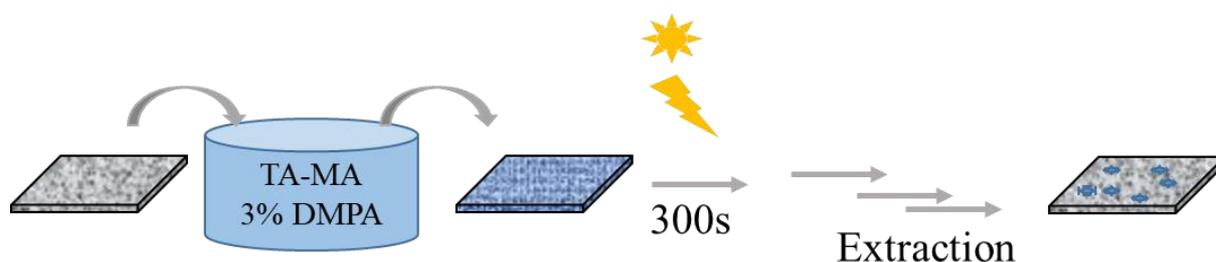


Figure 53. Schéma du procédé de réticulation des dérivés d'acide tannique méthacrylatés (AT-MA) au travers du support médian.

Les résultats obtenus pour les deux dérivés AT-MA ont été comparés. Les spectres FTIR des mats après irradiation et extraction montrent clairement la présence d'acide tannique (**Figure 54**). La bande à 1714 cm^{-1} est caractéristique de la fonction ester présente à la fois dans l'acide tannique et dans le dérivé polyméthacrylaté. La présence de motifs d'acide tannique démontre que les dérivés polyfonctionnels ont conduit à la formation d'un réseau qui se trouve immobilisé physiquement au travers du mat fibreux. Le calcul du rapport R (**Equation 5**) entre la bande ester caractéristique de l'acide tannique et la bande du polypropylène à 2950 cm^{-1} permet de comparer les différents essais réalisés.

$$R = \frac{I_{1714}}{I_{2950}} \quad \text{Equation 5}$$

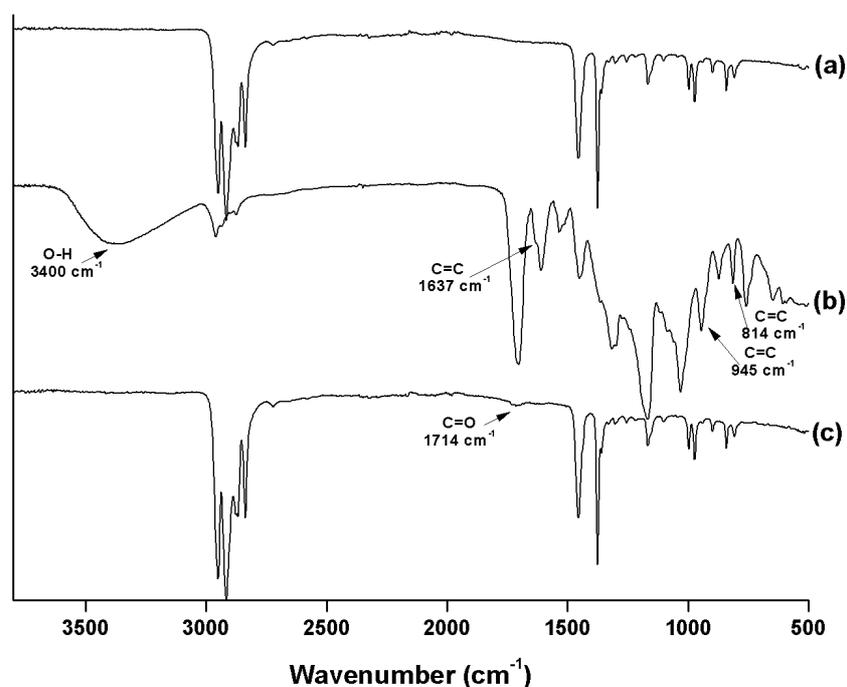


Figure 54. Spectres FTIR du mat en PP (a), du dérivé AT-MA (b) et de l'échantillon réticulé n°5 (c)

Tableau 28. Conditions de polymérisation des dérivés AT-MA et valeurs du rapport R

n°	AT-MA (eq MA mol.)	[AT-MA] (g.L ⁻¹)	DMPA % (g/g)	R
1	5	30	0	-
2	5	30	3	0.010 ± 0.002
3	10	30	0	0.031 ± 0.006
4	10	30	3	0.025 ± 0.008
5	10	85	3	0.041 ± 0.017

Les résultats (**Tableau 28**) montrent que le dérivé avec 10 motifs méthacrylate conduit à une fonctionnalisation plus importante du mat poreux, ce qui est conforme à ce qui est attendu. La présence du photoamorceur ne semble pas nécessaire, ce qui peut s'expliquer par la réactivité élevée des fonctions méthacrylate. L'augmentation de la concentration en dérivé AT-MA favorise la réaction de polymérisation mais le revêtement présente une hétérogénéité plus importante. Sur l'échantillon n°5, deux extractions supplémentaires ont été réalisées afin de s'assurer du piégeage par réticulation au travers du mat poreux. Pour les revêtements réalisés avec une concentration en AT-MA de 30 g.L⁻¹, il n'est pas possible de déterminer un gain de masse par gravimétrie. Une concentration de 85 g.L⁻¹ conduit à un gain de masse moyen de 5%. L'ensemble de ces résultats préliminaires semblent démontrer que la réticulation du dérivé AT-MA avec 10 motifs méthacrylate par acide tannique ne nécessite pas la présence de photoamorceur. La concentration optimale du dérivé d'acide tannique reste cependant à optimiser afin d'obtenir un revêtement plus homogène.

IV-3. Greffage de l'acide tannique sur le mat poreux en présence de benzophénone

Pour cette approche, nous avons transposé une méthode développée au sein du laboratoire, pour greffer des chaînes poly(2-hydroxyéthylméthacrylate) PHEMA sur des films de polyesters biosourcés²⁰. L'intérêt de cette méthode de fonctionnalisation repose sur un procédé en deux étapes (**Figure 55**).

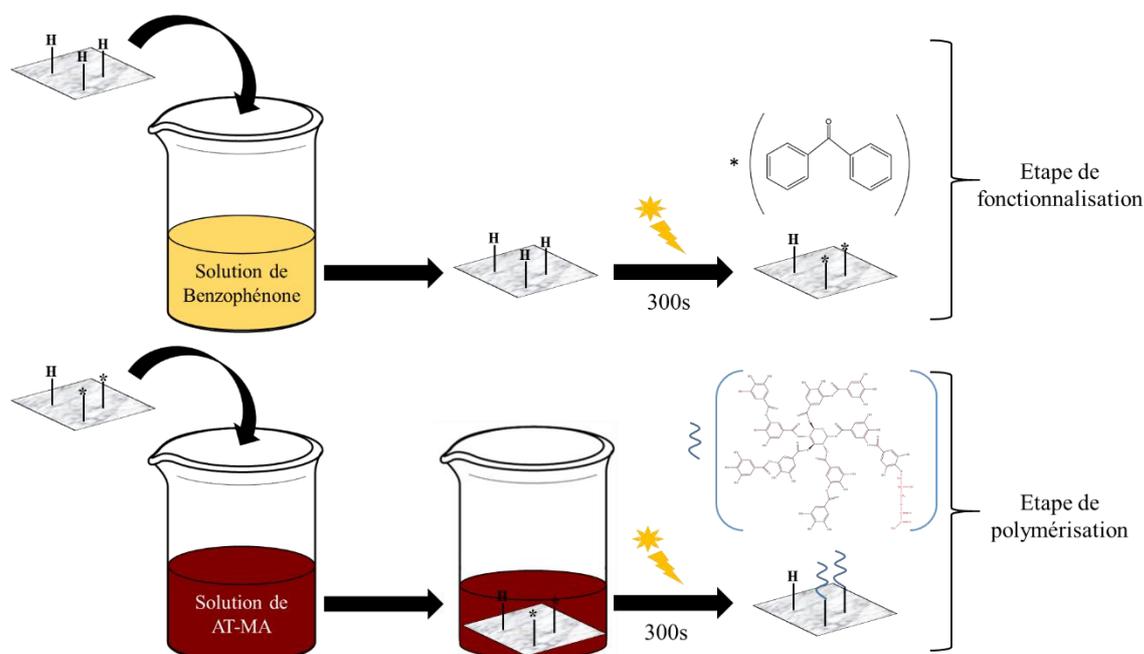


Figure 55. Procédé de greffage des dérivés AT-MA en surface du filtre poreux médian

La première étape consiste à irradier un mat pré-imprégné par une solution de benzophénone. Sous irradiation UV, l'état triplet de la benzophénone peut extraire des atomes d'hydrogène du polypropylène générant ainsi un radical. En absence de monomère, le radical formé peut réagir avec le radical semi-pinacol par recombinaison. Ces liaisons photo-labiles sont mobilisées lors d'une seconde étape, lorsque le mat fonctionnalisé est immergé dans un minimum de solution d'AT-MA et à nouveau irradié. L'intérêt de ce processus en deux étapes est l'absence d'homopolymérisation du dérivé AT-MA car le radical semi-pinacol n'amorce pas la polymérisation. Seuls les radicaux formés à la surface du mat pourront amorcer la polymérisation des dérivés AT-MA. Compte tenu des résultats obtenus dans le chapitre précédent, seul le dérivé AT-MA avec 10 motifs méthacrylate ont été étudiés, pour les mêmes concentrations à savoir 30 et 85 g.L⁻¹.

La caractérisation des mats poreux a été effectuée par gravimétrie et FTIR. Les spectres FTIR montrent clairement la présence de motifs d'acide tannique, avec une bande à 1714 cm⁻¹ (**Figure 56**), correspondant aux fonctions ester de l'acide tannique et à 1637 cm⁻¹, on voit clairement la bande correspondant aux liaisons C=C des noyaux aromatiques. La présence de la benzophénone est également visible par la bande caractéristique à 700 cm⁻¹ qui correspond à la bande de déformation des C-H aromatique hors plan de l'anneau de la benzophénone²¹. En effet, selon le mécanisme décrit dans la littérature, la terminaison se fait par recombinaison des

radicaux semi-pinacol issus de la photolyse de la liaison entre le polypropylène et le motif semi pinacol formé lors de la première étape²².

Le **Tableau 29** montre que dans le cas d'une concentration à 30 g.L⁻¹, les résultats sont assez hétérogènes. Certaines zones du mat sont dépourvues d'acide tannique. Avec une concentration de 85 g.L⁻¹. Le greffage de l'acide tannique est significatif car le rapport R calculé est supérieur à celui obtenu par réticulation du dérivé AT-MA au travers du mat.

Tableau 29. Conditions de polymérisation des dérivés AT-MA (10 eq) et valeurs du rapport R déterminés par FTIR et les gains de masse GM

n°	[AT-MA] (g.L ⁻¹)	R	GM (%)
7	30	0.0373 ± 0.027	< 1%
8	85	0.0750 ± 0.016	2.1

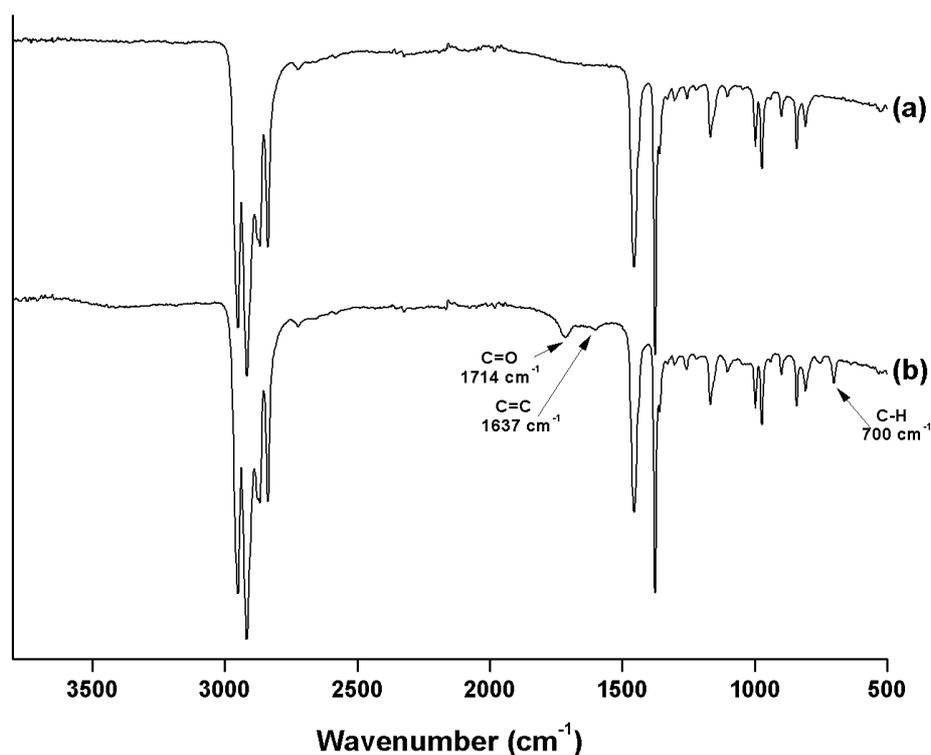


Figure 56. Spectres d'un mat fibreux natif (a) et du greffage de l'acide tannique en présence de benzophénone (N° 8 après 3 extractions) (b)

Conclusion

Ces deux approches de réticulation et de « grafting from » d'un dérivé de l'acide tannique ont permis de fonctionnaliser de manière relativement simple un mat fibreux de polypropylène. Cette étude nécessite d'être poursuivie par l'évaluation de l'activité antiradicalaire et de

l'activité antibactérienne. Faute de temps, nous n'avons pas pu mener à terme cette étude. Il serait également très intéressant de coupler aux dérivés AT-MA un dérivé de cyclodextrine monofonctionnel portant un groupe acrylate. Les cavités cyclodextrines pourraient ainsi être immobilisées dans le réseau ou en surface ce qui permettrait d'augmenter l'activité du support filtrant par encapsulation de molécules antimicrobiennes dans la cavité de la cyclodextrine.

IV-4. Partie expérimentale : matériel et méthodes

Matériaux. Le polypropylène (isotactique, masse molaire : 250 000 g.mol⁻¹), l'acide tannique, le méthanol, le 2,2-diphényl-1-picrylhydrazyle (DPPH) et tous les solvants ont été achetés chez Sigma-Aldrich et utilisés sans purification préalable.

Extrusion réactive du polypropylène avec l'acide tannique. Les granulés de PP ont d'abord été broyés à l'aide d'un cryo-broyeur. La poudre de PP récupérée a été mélangée à l'AT dans une extrudeuse bi-vis (Minilab Thermo Scientific Haake) en présence (ou non) de 5% peroxyde de dicumyle (DCP). L'extrusion a été réalisée à 185°C avec une vitesse de rotation de vis de 90 trs/min pendant 1 min. Après recirculation, la matière fondue a été transférée à l'aide d'un ensemble cylindre-piston préchauffé et a été injectée dans l'unité de micro-injection (MiniJet Thermo Scientific Haake) à une pression d'injection de 300 bar (Pi) pendant 30 secondes. Une pression de maintien de 300 bar (Pm) a été appliquée encore pendant 30 secondes. Les éprouvettes contenant le PP et l'AT ont été réalisées avec une proportion massique de 90/10 et les éprouvettes contenant le PP, l'AT et le DCP ont été réalisées avec une proportion massique de 85/10/5. La quantité de DCP reste constante et égale à 5% de la masse totale.

Synthèse du dérivé polyméthacrylaté de l'acide tannique. Dans un ballon de 50 mL, 1,5 g d'acide tannique et 18 mg de triphénylphosphine sont ajoutés dans 2 mL d'un mélange de solvants (acétate d'éthyle/butylacétate (60/40)). Puis 5 équivalents de glycidylméthacrylate par rapport aux fonctions phénol (600 µL) sont additionnés à la suspension. L'ensemble est placé sous atmosphère d'argon et le mélange est porté au reflux à 100°C durant 48h. Après arrêt du chauffage, le solvant est évaporé sous vide et le produit est séché une nuit sous rampe à vide.

Polymérisation des dérivés polyméthacrylatés (AT-MA) au travers d'un mat filtrant median. Un échantillon de mat poreux médian (1,5x1,5 cm) est immergé dans 2mL d'une solution de TA-MA à 30 ou 86 g.L⁻¹. Selon le procédé, 3% g/g de DMPA peuvent-être ajoutés à la solution. Les échantillons sont laissés immergés durant 2 h à T° ambiante. Le mat est ensuite

extrait de la solution, puis irradié sous UV durant 300 secondes à une intensité maximale (38 mW.cm^2) sur chaque face. L'échantillon est placé à une distance de 11 cm du guide d'ondes. Le dispositif d'irradiation est un appareil Lightningcure LC8 (L8251) de chez Hamamatsu équipé d'une lampe xénon-mercure (200 W) couplé à un guide d'ondes flexible. Après irradiation le mat est placé dans 20mL de méthanol et agité durant 1h. L'extraction est réalisée au moins trois fois pour chaque échantillon.

Greffage du dérivé AT-MA en présence de benzophénone. Un échantillon de mat poreux médian (1,5x1,5 cm) est immergé dans 2mL d'une solution de Benzophénone dans l'acétone (36 g.L^{-1}). Les échantillons sont immergés durant 2 h à T° ambiante et à l'obscurité. Le mat est ensuite extrait de la solution, puis irradié sous UV durant 300 secondes à une intensité maximale (38 mW.cm^2) sur chaque face. L'échantillon est placé à une distance de 11 cm du guide d'ondes. Immédiatement après irradiation, le mat est immergé dans 1 mL d'une solution d'AT-MA dans le méthanol à 86 g.L^{-1} préalablement dégazée par bullage d'argon.

Le dispositif d'irradiation est un appareil Lightningcure LC8 (L8251) de chez Hamamatsu équipé d'une lampe xénon-mercure (200 W) couplé à un guide d'ondes flexible. Après irradiation le mat est placé dans 20mL de méthanol et agité durant 1h. L'extraction est réalisée au moins trois fois pour chaque échantillon.

Analyse gravimétrique. La variation de masse (Δm) des échantillons est calculée à l'aide de l'Equation 6.

$$\Delta m = \frac{m_f - m_i}{m_i} \times 100 \quad \text{Equation 6}$$

où m_i et m_f correspondent respectivement à la masse avant et après l'étape de séchage.

Libération de l'acide tannique. La libération d'acide tannique a été déterminée par spectroscopie UV-visible à 276 nm (à l'aide du spectrophotomètre Varian Cary 50 Bio UV-Visible contrôlé par le logiciel CaryWinUV). La courbe d'étalonnage a été tracée en utilisant une concentration d'acide tannique allant de 4 à $14 \mu\text{g.mL}^{-1}$.

Etude de la formation du revêtement d'acide tannique. Le revêtement en acide tannique a été réalisé à partir d'une solution tampon bis-tris de 25 mL (100 mM bis-tris soit 523.3 mg et 600 mM NaCl soit 874.3 mg) et d'acide tannique (1 mg.mL^{-1} soit 26.5 mg). Le pH de la solution est au départ de 8.18 et a ensuite été ajusté à 7 avec une solution d'HCl à 0.1N. Les supports

utilisés sont des morceaux de polypropylène commercial (150 mg) provenant d'une couche interne des masques de protection FFP3 de la marque SupAir.

Analyse thermogravimétrique. Les caractéristiques thermiques et de décomposition des matériaux ont été déterminées par des analyses thermo-gravimétriques (ATG) sur un appareil Setaram Setsys Evolution 16, avec une plage de température de 20 à 800 °C et une vitesse de chauffe de 10 °C/min sous un débit d'air.

Résonance magnétique nucléaire (RMN). Les spectres de résonance magnétique nucléaire du proton ^1H ont été effectués sur un spectromètre Bruker Avance 400. Ces spectres ont été effectués dans du DMSO deutéré (DMSO-d₆) à 25°C.

Spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier (FT-IR). Les spectres d'absorption infrarouge ont été enregistrés de 4000 à 500 cm^{-1} sur un spectromètre Bruker Tensor 27 en mode réflexion totale atténuée (ATR) en effectuant 32 scans. Les transmissions reportées sont exprimées en nombre d'onde (cm^{-1}).

Activité antiradicalaire. L'activité antiradicalaire des réseaux a été déterminée selon la méthode DPPH (2,2-diphényl-1-picrylhydrazyl) ²³⁻²⁶. Environ 50 mg d'échantillons ont été immergés dans 3 mL d'une solution de DPPH à 0,1 mM avec du méthanol. Cette solution a ensuite été laissée dans l'obscurité pendant 60 minutes à température ambiante. Le RSA (« Radical Scavenging Activity ») a été mesurée à l'aide d'un spectrophotomètre UV-Visible Varian Cary 50 Bio contrôlé par le logiciel CaryWinUV. La solution de DPPH est bien connue pour avoir un maximum d'absorption à 517 nm. L'activité antioxydante a donc été déterminée en observant la diminution de l'absorbance à cette longueur d'onde. La RSA a été calculée selon **Equation 7**.

$$\text{Radical Scavenging Activity (\%)} = \left(\frac{A_{\text{réf}} - A_s}{A_{\text{réf}}} \right) \times 100 \quad \text{Equation 7}$$

où $A_{\text{réf}}$ correspond à l'absorbance de la solution de 0,1 mM de DPPH sans échantillon et A_s correspond à l'absorbance de la solution de 0,1 mM de DPPH contenant les échantillons et analysée à 517 nm.

Références

- (1) *Fruit and Vegetable Phytochemicals: Chemistry, Nutritional Value and Stability*, 1 edition.; Rosa, L. A. de la, Alvarez-Parrilla, E., Gonzalez-Aguilar, G. A., Eds.; Wiley-Blackwell: Ames, Iowa, 2010.
- (2) Cerruti, P.; Santagata, G.; Gomez d'Ayala, G.; Ambrogi, V.; Carfagna, C.; Malinconico, M.; Persico, P. Effect of a Natural Polyphenolic Extract on the Properties of a Biodegradable Starch-Based Polymer. *Polym. Degrad. Stab.* **2011**, *96* (5), 839–846. <https://doi.org/10.1016/j.polymdegradstab.2011.02.003>.
- (3) Makris, D. P.; Boskou, G.; Andrikopoulos, N. K. Polyphenolic Content and in Vitro Antioxidant Characteristics of Wine Industry and Other Agri-Food Solid Waste Extracts. *J. Food Compos. Anal.* **2007**, *20* (2), 125–132. <https://doi.org/10.1016/j.jfca.2006.04.010>.
- (4) Cruz, J. M.; Domínguez, H.; Parajó, J. C. Assessment of the Production of Antioxidants from Winemaking Waste Solids. *J. Agric. Food Chem.* **2004**, *52* (18), 5612–5620. <https://doi.org/10.1021/jf049376c>.
- (5) Kim, T. J.; Silva, J. L.; Kim, M. K.; Jung, Y. S. Enhanced Antioxidant Capacity and Antimicrobial Activity of Tannic Acid by Thermal Processing. *Food Chem.* **2010**, *118* (3), 740–746. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2009.05.060>.
- (6) Gülçin, İ.; Huyut, Z.; Elmastaş, M.; Aboul-Enein, H. Y. Radical Scavenging and Antioxidant Activity of Tannic Acid. *Arab. J. Chem.* **2010**, *3* (1), 43–53. <https://doi.org/10.1016/j.arabjc.2009.12.008>.
- (7) Pulido, R.; Bravo, L.; Saura-Calixto, F. Antioxidant Activity of Dietary Polyphenols As Determined by a Modified Ferric Reducing/Antioxidant Power Assay. *J. Agric. Food Chem.* **2000**, *48* (8), 3396–3402. <https://doi.org/10.1021/jf9913458>.
- (8) Akiyama, H.; Fujii, K.; Yamasaki, O.; Oono, T.; Iwatsuki, K. Antibacterial Action of Several Tannins against Staphylococcus Aureus. *J. Antimicrob. Chemother.* **2001**, *48* (4), 487–491. <https://doi.org/10.1093/jac/48.4.487>.
- (9) Hamburger, M. O.; Cordell, G. A. A Direct Bioautographic Tlc Assay for Compounds Possessing Antibacterial Activity. *J. Nat. Prod.* **1987**, *50* (1), 19–22. <https://doi.org/10.1021/np50049a003>.
- (10) Auriemma, M.; Piscitelli, A.; Pasquino, R.; Cerruti, P.; Malinconico, M.; Grizzuti, N. Blending Poly(3-Hydroxybutyrate) with Tannic Acid: Influence of a Polyphenolic Natural Additive on the Rheological and Thermal Behavior. *Eur. Polym. J.* **2015**, *63*, 123–131. <https://doi.org/10.1016/j.eurpolymj.2014.12.021>.
- (11) Liu, R.; Zhu, J.; Luo, J.; Liu, X. Synthesis and Application of Novel UV-Curable Hyperbranched Methacrylates from Renewable Natural Tannic Acid. *Prog. Org. Coat.* **2014**, *77* (1), 30–37. <https://doi.org/10.1016/j.porgcoat.2013.07.015>.
- (12) Luo, J.; Lai, J.; Zhang, N.; Liu, Y.; Liu, R.; Liu, X. Tannic Acid Induced Self-Assembly of Three-Dimensional Graphene with Good Adsorption and Antibacterial Properties. *ACS Sustain. Chem. Eng.* **2016**, *4* (3), 1404–1413. <https://doi.org/10.1021/acssuschemeng.5b01407>.
- (13) Shin, M.; Kim, K.; Shim, W.; Yang, J. W.; Lee, H. Tannic Acid as a Degradable Mucoadhesive Compound. *ACS Biomater. Sci. Eng.* **2016**, *2* (4), 687–696. <https://doi.org/10.1021/acsbiomaterials.6b00051>.
- (14) Rivero, S.; García, M. A.; Pinotti, A. Crosslinking Capacity of Tannic Acid in Plasticized Chitosan Films. *Carbohydr. Polym.* **2010**, *82* (2), 270–276. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2010.04.048>.
- (15) Pan, L.; Wang, H.; Wu, C.; Liao, C.; Li, L. Tannic-Acid-Coated Polypropylene Membrane as a Separator for Lithium-Ion Batteries. *ACS Appl. Mater. Interfaces* **2015**, *7* (29), 16003–16010. <https://doi.org/10.1021/acsmi.5b04245>.
- (16) Svoboda, P.; Poongavalappil, S.; Theravalappil, R.; Svobodova, D.; Mokrejs, P. Effect of Octene Content on Peroxide Crosslinking of Ethylene–Octene Copolymers. *Polym. Int.* **2013**, *62* (2), 184–189. <https://doi.org/10.1002/pi.4277>.
- (17) Xia, Z.; Singh, A.; Kiratitanavit, W.; Mosurkal, R.; Kumar, J.; Nagarajan, R. Unraveling the Mechanism of Thermal and Thermo-Oxidative Degradation of Tannic Acid. *Thermochim. Acta* **2015**, *605*, 77–85. <https://doi.org/10.1016/j.tca.2015.02.016>.

- (18) Drynan, J. W.; Clifford, M. N.; Obuchowicz, J.; Kuhnert, N. The Chemistry of Low Molecular Weight Black Tea Polyphenols. *Nat. Prod. Rep.* **2010**, *27* (3), 417–462. <https://doi.org/10.1039/B912523J>.
- (19) Sileika, T. S.; Barrett, D. G.; Zhang, R.; Lau, K. H. A.; Messersmith, P. B. Colorless Multifunctional Coatings Inspired by Polyphenols Found in Tea, Chocolate, and Wine. *Angew. Chem. Int. Ed Engl.* **2013**, *52* (41), 10766–10770. <https://doi.org/10.1002/anie.201304922>.
- (20) Lao, H.-K.; Renard, E.; Langlois, V.; Vallée-Rehel, K.; Linossier, I. Surface Functionalization of PHBV by HEMA Grafting via UV Treatment: Comparison with Thermal Free Radical Polymerization. *J. Appl. Polym. Sci.* **2010**, *116* (1), 288–297. <https://doi.org/10.1002/app.31507>.
- (21) Grigoriu, A.-M.; Luca, C.; Grigoriu, A. CYCLODEXTRINS APPLICATIONS IN THE TEXTILE INDUSTRY. 11.
- (22) Muftuoglu, A. E.; Tasdelen, M. A.; Yagci, Y. Photografting of Polymeric Materials. In *Photochemistry and Photophysics of Polymer Materials*; John Wiley & Sons, Ltd, 2010; pp 509–539. <https://doi.org/10.1002/9780470594179.ch13>.
- (23) Jouki, M.; Yazdi, F. T.; Mortazavi, S. A.; Koocheki, A. Quince Seed Mucilage Films Incorporated with Oregano Essential Oil: Physical, Thermal, Barrier, Antioxidant and Antibacterial Properties. *Food Hydrocoll.* **2014**, *36*, 9–19. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2013.08.030>.
- (24) Zouari, S.; Ketata, M.; Boudhrioua, N.; Ammar, E. Allium Roseum L. Volatile Compounds Profile and Antioxydant Activity for Chemotype Discrimination – Case Study of the Wild Plant of Sfax (Tunisia). *Ind. Crops Prod.* **2013**, *41*, 172–178. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2012.04.020>.
- (25) Kirby, A. J.; Schmidt, R. J. The Antioxidant Activity of Chinese Herbs for Eczema and of Placebo Herbs--I. *J. Ethnopharmacol.* **1997**, *56* (2), 103–108.
- (26) El Youbi, A. E. H.; Bousta, D.; Jamoussi, B.; Greche, H.; El Mansouri, L.; Benjilali, J.; Soidrou, S. H. Activités antioxydante, apoptotique et antiproliférative de *Tetraena gaetula* (Emb. & Maire) Beier & Thulin et de *Berberis hispanica* Boiss. & Reut. originaires du Maroc. *Phytothérapie* **2012**, *10* (3), 151–160. <https://doi.org/10.1007/s10298-012-0704-3>.

Conclusion Générale

Conclusion générale

Ces travaux ont pour objet l'élaboration de nouvelles structures poreuses non tissées antibactériennes. Pour cela nous avons proposé différentes stratégies : l'une a consisté à élaborer des mats poreux par electrospinning en utilisant un polymère biosourcé et biocompatible et l'autre voie consistait à modifier un support fibreux provenant d'un masque de protection respiratoire commercial de type FFP3.

L'étude bibliographique a permis de sélectionner des molécules naturelles présentant une bonne activité antibactérienne et compatible avec le design des structures que nous avons envisagées. A l'issue de cette étude nous avons retenu 6 molécules : l'acide gallique, le carvacrol, l'eugénol, le géraniol, le linalol et l'acide tannique. Pour protéger ces molécules bioactives et permettre une diffusion contrôlée nous avons choisi de les encapsuler dans les cavités de la cyclodextrine en utilisant le concept de complexation hôte-invité. La taille de l'acide tannique ne permet pas de l'encapsuler dans la cyclodextrine et c'est la raison pour laquelle nous avons envisagé d'autres structures pour l'incorporer dans des mats poreux.

Nous avons montré par des tests biologiques que parmi ces 6 molécules le carvacrol présentait la plus faible concentration minimale d'inhibition. Des mats poreux à base de PHAs, biopolyesters biosourcés et biocompatibles ont donc été préparés par electrospinning en mélange avec des complexes d'inclusion CD-carvacrol. Pour augmenter la concentration en carvacrol nous avons utilisé non seulement de la cyclodextrine mais également des polymères de cyclodextrine. Comme le polymère de cyclodextrine est soluble dans l'eau nous avons protégé cette couche de polymère par deux couches hydrophobes externes de PHA. Les tests vis-à-vis des bactéries *E. coli* et *S. aureus* montrent une bonne activité antibactérienne de ces nouveaux supports.

Pour modifier les masques de protection commerciaux nous nous sommes basés sur la méthode des assemblages par interactions ioniques en superposant de façon alternative les couches de polymères cationiques et les polymères anioniques à la surface du filtre médian en polypropylène. Le chitosane a été choisi à la fois pour ses propriétés antibactériennes et la présence des charges positives. Le polymère anionique, dérivé du polymère de cyclodextrine présente l'avantage de pouvoir encapsuler le carvacrol. L'élaboration de ce type de matériau nécessite 2 étapes : une première étape consiste à déposer un « primaire d'adhésion » à base de chitosan par pulvérisation. Nous avons ensuite déposé successivement plusieurs couches de

polymères de cyclodextrine P(CD) complexé avec le carvacrol alterné avec des couches de chitosane. Après avoir caractérisé ce matériau, nous avons pu faire émerger une structure [PP/CS/P(CD)_{LMM7.5}-Carv]₅ ayant de bonnes propriétés antioxydantes et antibactériennes. Cette technique simple pourrait être utilisée pour la préparation et la fabrication de matériaux multifonctionnels à une échelle industrielle. L'aspect écologique est également important puisque les étapes d'imprégnation ont été réalisées en milieu aqueux et que la concentration des agents biocides a été optimisée pour éviter une libération excessive de molécules bioactives.

Une autre approche a consisté à modifier des supports en PP avec de l'acide tannique, un polyphénol d'origine naturelle. Les nombreux groupements phénols terminaux de l'acide tannique lui confèrent des propriétés antioxydantes et antibactériennes. Dans cette étude, 2 stratégies ont été mises en place afin de fonctionnaliser le PP avec de l'acide tannique. La première est l'extrusion réactive du PP avec l'AT en présence (ou non) de peroxyde de dicumyle (DCP) pour greffer directement l'acide tannique sur le PP. La deuxième stratégie consiste à polymériser l'AT au travers d'une couche poreuse de PP extraite d'un masque de protection commercial, afin de permettre l'immobilisation physique de l'AT à la surface du mat fibreux en PP. La réticulation des dérivés méthacrylés de l'acide tannique au travers du mat de PP a été réalisée soit en milieu basique ou en présence de photoamorceurs. L'utilisation de photoamorceurs permet à la fois de réticuler et de greffer les dérivés d'acide tannique. Des études complémentaires seraient à poursuivre pour préciser la structure chimique du réseau obtenu. Ces matériaux ont montré de bonnes propriétés antioxydantes. L'originalité de cette technique repose sur le greffage covalent par un procédé propre, éco-compatible des molécules naturelles bioactives. La photochimie est une méthode de choix et le fil conducteur de notre approche a été de centrer nos efforts sur le contrôle de la fonctionnalisation par voie photochimique pour les nombreux avantages qu'elle apporte : des conditions "douces", le respect de l'environnement, un gain de temps, le contrôle spatial de la polymérisation. Néanmoins, faute de temps, l'évaluation de l'activité antiradicalaire et de l'activité antibactérienne n'ont pas pu être menées à termes. Une autre perspective de ce travail consisterait à coupler les dérivés AT-MA avec un dérivé de cyclodextrine monofonctionnel portant un groupe acrylate. Les cavités cyclodextrines pourraient ainsi être immobilisées dans le réseau ou en surface ce qui permettrait d'augmenter l'activité des filtres par encapsulation des molécules antimicrobiennes.

Annexe 1

MASQUE PLIABLE A USAGE UNIQUE AVEC SOUPAPE FFP3D NR

Réf. 23305

FICHE TECHNIQUE



DIMENSIONS

Masque (mm)	Largeur de la partie inférieure : 85 Largeur de la partie supérieure : 200 Hauteur : 87
Pince-nez (mm)	90 x 9 x 0.5 (L x l x E)
Élastique (mm)	560 x 0.7 x 6 (L x E x l)
Soupape (mm)	41 x 11 (D x h)

DESCRIPTIF GENERAL ET MATIERES

- Masque de protection à usage unique de type FFP3D NR SL
- Pliable à soupape
- Couche extérieure, intérieure et support en polypropylène
- Média filtrant en feutre à grande efficacité de filtration (polypropylène) électrostatique
- Pince-nez en fil de fer entouré de polyéthylène
- Élastique en gomme naturelle
- Boîtier de la soupape en polypropylène et membrane en gomme synthétique

AVANTAGES SPECIFIQUES

- Test allergénique
- Soupape d'expiration
- Résistant
- Ininflammable

PRINCIPAUX DOMAINES D'UTILISATION

- Protection contre les aérosols solides et liquides aux toxicités faibles pour des concentrations jusqu'à 50 fois la VL
- Ne pas utiliser dans des environnements dans lesquels la concentration d'oxygène est inférieure à 17 % Vol.
- Industrie textile, artisanat, métallurgie, exploitation minière, travaux publics souterrains, menuiserie, soudure, fonte, découpage de métaux, hôpitaux, laboratoires, contrôles médicaux, industrie pharmaceutique, traitement des déchets toxiques, fabrication de batteries (Ni-Cad)
- Contre le carbonate de calcium, le kaolin, le ciment, la cellulose, le soufre, le coton, la farine, le charbon, les métaux ferreux, les huiles végétales, le bois, les fibres de verre, le plastique, le quartz, le cuivre, l'aluminium, les bactéries, les champignons, les tuberculoses micro-bactériens, le chrome, le manganèse, le nickel, le platine, la strychnine, les poussières et fumées de métaux, les virus et les enzymes.
- Interventions en milieu amianté Niveau 1 (prélèvements, visites d'inspection)

CONDITIONNEMENT

- Emballage individuel
- Carton de 240 masques
- Sachet de 20 masques
- Boîte distributrice pré-découpée

NORMALISATION

Ce masque est conforme au modèle de l'équipement de protection individuelle ayant fait l'objet de

L'attestation CE de type 59765

Délivrée par **BSI (organisme n° 0086)**

Ce masque est conforme à l'avis du J.O. français 135 du 12 juin 2004.

EN 149 : 2001+A1 2009



EUROPROTECTION - 420, rue de la Dombes - 01700 MIRIBEL - FRANCE