



HAL
open science

Nanomatériaux microbicides à base d'oxydes métalliques : Mécanisme d'action et Procédés de mise en forme

Imroi El-Habib

► To cite this version:

Imroi El-Habib. Nanomatériaux microbicides à base d'oxydes métalliques : Mécanisme d'action et Procédés de mise en forme. Génie des procédés. Université Sorbonne Paris Nord (Paris 13), 2024. Français. NNT: . tel-04855332

HAL Id: tel-04855332

<https://theses.hal.science/tel-04855332v1>

Submitted on 24 Dec 2024

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

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

THESE DE DOCTORAT DE L'UNIVERSITE SORBONNE PARIS NORD

Mention **Sciences, Technologie, Santé**

Option **Sciences des Matériaux**

Présentée et soutenue publiquement par

Imroi EL-HABIB

Pour obtenir le titre de

Docteur de l'Université Sorbonne Paris Nord

Nanomatériaux microbicides à base d'oxydes métalliques : Mécanisme d'action et Procédés de mise en forme

Soutenue le **22/10/2024**

Devant le jury composé de

Wilfrid PRELLIER	Directeur de recherche, CNRS	Rapporteur
Damien SEYER	Professeur, CY Cergy Paris Université	Rapporteur
Sophie CASSAGNON	Professeure, Sorbonne Université	Examinatrice
Marie Bénédicte ROMOND	Professeure, Université de Lille	Examinatrice
Alex LEMARCHAND	MCF, Université Sorbonne Paris Nord	Co-encadrant
Christine MIELCAREK	MCF, Ecole de Biologie Industrielle	Co-encadrante
Rabah AZOUANI	MCF HDR, Ecole de Biologie Industrielle	Directeur de thèse
Mamadou TRAORE	MCF HDR, Université Sorbonne Paris Nord	Directeur de thèse
Clémence BERNARD	Directrice générale, Ecole de Biologie Industrielle	Invitée
Sarah DINE	Ingénieure de recherche, Université Sorbonne Paris Nord	Invitée

A mes parents,

En gage de mon amour éternel, de mon respect et de ma profonde estime pour les sacrifices
que vous avez fait pour mon instruction et mon bien être.

Remerciements

Je souhaite tout d'abord exprimer ma profonde gratitude à Mme Clémence Bernard, directrice générale de l'École de Biologie Industrielle, ainsi qu'à M. Khalid Hassouni et M. Dominique Vrel, directeurs successifs du LSPM, pour m'avoir donné l'opportunité de réaliser mes travaux au sein de leurs établissements.

Je tiens également à remercier les membres du jury : le Dr Wilfrid Prellier et le Pr Damien Seyer pour avoir accepté de rapporter mon travail, ainsi que la Pr Sophie Cassaignon et la Pr Marie Bénédicte Romond pour l'avoir examiné.

Mes remerciements vont aussi à feu Dr Fanou Guy Didier, qui m'a fait confiance en me permettant de réaliser mon stage d'ingénieur de 5e année au LSPM, une expérience qui m'a ensuite offert l'opportunité de poursuivre ce sujet en thèse.

Je remercie chaleureusement mon directeur de thèse, Dr Mamadou Traoré, pour sa confiance et sa patience. Un remerciement tout particulier à Dr Rabah Azouani, pour son engagement, son optimisme, ses nombreux conseils et sa grande patience.

Un grand merci aux Drs Christine Mielcarek, Karim Senni et Alex Lemarchand pour m'avoir fait bénéficier de leur expertise, de leur disponibilité et de leurs précieux conseils.

Je suis également reconnaissante envers le Dr Sarah Dine pour avoir partagé son expertise sur les couches minces, ainsi que pour ses nombreux conseils et son soutien, tout comme envers Anne Roynette pour ses connaissances en microbiologie et son soutien. Je tiens également à exprimer ma gratitude au Dr Hassan Maatouk pour ses conseils et son soutien.

Un immense merci à tous ceux de l'EBI qui m'ont apporté leur aide et leurs conseils. Je pense en particulier à Marjorie Lassalle pour ses orientations sur la formulation de peinture, et au Dr Sylvia Imbart pour m'avoir formée à la mesure de la rhéologie des peintures. Merci également à Guilhem, Dr Phuong Le, Dr Houda Morakchi-Goudjil et Dr Chrystel Neff pour leur accueil chaleureux et leur convivialité durant ces trois années. Je tiens également à remercier le Dr Marc Lavarde pour nos échanges enrichissants et ses précieux conseils. Une pensée spéciale au Dr Saad Saba pour son humour et sa bonne humeur contagieuse.

Je n'oublie pas mes collègues doctorants. Merci à Ghina et Daniella pour les bons moments et les rires partagés, ainsi qu'à Yacouba, Ignace et Nourzat. Une pensée particulière pour Camille

Mathieu. Un grand merci à mon cher ami de longue date, Siby Constant, pour son écoute, ses conseils et ses encouragements, ainsi qu'à Fatah pour son soutien constant.

Je tiens également à remercier ma cousine Echat, son mari Wael, mon oncle Assiandi et mes tantes Sitti Widade, Hafsoit et Ghanima pour leur accueil et leur soutien depuis mon arrivée en France. Merci également à mes tantes Echat, Zahara, Farida, ainsi qu'à ma grand-mère Fatima pour leurs conseils et leur soutien.

Un immense merci à mes parents pour leur amour inconditionnel. Merci à mon père, Dr Aboulhoussein Saindou, pour ses conseils et son soutien. Je remercie aussi mon père EL-Habib pour son affection inébranlable, ainsi que ma mère Zoulfat pour sa patience et son amour sans faille. Merci à mes petits frères Kaled et Kayel, ainsi qu'à ma petite sœur Ihssane. J'espère être à la hauteur de mon rôle de grande sœur.

Enfin, j'espère n'avoir oublié personne. Si ton nom n'apparaît pas ici, c'est soit parce que je t'ai oublié, et je m'en excuse, soit parce que je ne t'aime pas... mais je pense qu'il s'agit plutôt de la première option !

Sommaire

Remerciements	i
Sommaire	iii
Liste des figures	x
Liste des tableaux	xvi
Liste des annexes	xviii
Introduction générale	1
Chapitre 1	6
1. Potentiel des nanoparticules en tant qu'agents antimicrobiens	7
2. Enjeux et défis des nanoparticules en tant qu'agents antimicrobiens	8
3. Mécanisme antimicrobien des nanoparticules	9
4. Caractéristiques et propriétés des nanoparticules de ZnO	14
5. Le procédé Sol-Gel	15
5.1. Définition	15
5.2. Mécanisme réactionnel	17
a) Hydrolyse du précurseur	17
b) Condensation	18
c) Nucléation et croissance	18
5.3. Mécanisme réactionnel par voie sol-gel hybride	19
6. Généralités sur les microorganismes	21
6.1. Les bactéries	21
6.2. Les levures	24
7. Qu'est ce qu'un biofilm ?	31
7.1. Substances polymériques extracellulaires	32
7.2. Formation des biofilms	33
7.3. Communication cellulaire (Quorum sensing)	36
7.4. Les antibiofilms	38

8.	Généralité sur les peintures	40
8.1.	Définition	40
8.2.	Constituants d'une peinture et leurs rôles	40
a)	Le liant ou la résine	40
b)	Le solvant	41
c)	Les pigments	41
d)	Les additifs	41
8.3.	Physico-chimie des peintures	42
8.4.	Rhéologie des peintures liquides	43
8.5.	Adhésion et adhérence	44
8.6.	Industrie des peintures et des biocides	44
Chapitre 2		47
1.	Synthèse des nanoparticules de ZnO	48
2.	Elaboration d'une dispersion stable de nanoparticules de ZnO	50
3.	Elaboration et dépôt de couches minces de ZnO par dip-coating	51
4.	Formulation d'une peinture à eau avec des nanoparticules de ZnO	54
5.	Méthodes de caractérisation physico-chimique	54
5.1.	Diffraction des rayons X	55
5.1.1.	Analyse de phase	55
5.1.2.	Analyse des propriétés structurales et microstructurales	56
a)	Loi de Scherrer	56
b)	Méthode de Rietveld	56
5.2.	Microscopie électronique à transmission (MET)	57
5.3.	Microscopie électronique à balayage (MEB)	58
5.4.	Spectroscopie Raman	59
5.5.	Spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier (FTIR)	61
5.6.	Microscopie à force atomique (AFM)	62
6.	Conservation, culture et croissance des microorganismes	63
6.1.	Conservation et culture des microorganismes	63
6.2.	Croissance des microorganismes	64
6.2.1.	Courbe de croissance microbienne	64
6.2.2.	Paramètres de la croissance	66

7.	Mesure de l'activité antimicrobienne des nanoparticules	66
7.1.	Activité antimicrobienne en suspension	66
7.1.1.	La Concentration Minimale Inhibitrice (CMI)	66
7.1.2.	La concentration minimale bactéricide	69
7.1.3.	Cinétique de croissance du microorganisme par mesure de la densité optique	71
7.1.4.	Test Time-Kill	73
7.1.5.	Évaluation de l'effet antibactérien d'alcools par bioluminescence	73
7.2.	Activité antimicrobienne sur support	74
7.2.1.	Norme ISO 7581 :2023	75
7.2.2.	Evaluation de l'activité antibactérienne à l'aide des lames gélosées	76
7.2.3.	Norme ISO 22196 :2011	77
7.2.4.	Méthodologies d'analyse de la lixiviation et de la neutralisation des nanoparticules de ZnO	79
a)	Analyse de la lixiviation de nanoparticules de ZnO par ICP	79
b)	Validation de la neutralisation de l'activité antibactérienne des nanoparticules par l'Eugon LT Sup	79
8.	Analyse de la toxicité des nanoparticules par la méthode au rouge neutre	80
Chapitre 3		82
1.	Activité antibactérienne des alcools de synthèse	83
2.	Synthèse de nanoparticules de ZnO de tailles variables et contrôlées par le procédé sol-gel	84
2.1.	Etude de l'influence des paramètres de synthèse sur la taille des nanoparticules de ZnO	85
2.1.1.	Influence de la longueur de la chaîne carbonée de l'alcool	85
2.1.2.	Influence de la température de synthèse sur la taille des nanoparticules de ZnO	88
2.1.3.	Influence du ratio MEA/Zn ²⁺ (a) sur la taille des nanoparticules de ZnO	90
2.1.4.	Influence du taux d'hydrolyse [H ₂ O]/[Zn ²⁺](h) sur la taille des nanoparticules de ZnO	92
2.1.5.	Influence de la durée de synthèse sur la taille des nanoparticules de ZnO	94
2.2.	Synthèse de nanoparticules de ZnO à faible température	96
2.3.	Caractérisation des échantillons pour l'analyse des propriétés antibactériennes	98

2.3.1. Analyse structurale	98
2.3.2. Spectroscopies vibrationnelles	100
a) Spectroscopie Raman	100
b) Spectroscopie infrarouge à Transformée de Fourier (FTIR)	101
2.3.3. Analyses morphologiques	102
a) Analyse par Microscopie Electronique à Transmission (MET)	102
b) Analyse par Microscopie Electronique à Balayage (MEB)	103
2.4 . Conclusion	103
3. Influence du dispersant sur la stabilité des nanoparticules	104
4. Influence de la taille des nanoparticules de ZnO sur leur activité antibactérienne	106
4.1. Corrélation entre la taille des nanoparticules de ZnO et la concentration minimale inhibitrice (CMI)	107
4.2. Corrélation entre la taille des nanoparticules et la concentration minimale bactéricide (CMB)	108
4.3. Influence de la taille des nanoparticules sur la cinétique de croissance des microorganismes	109
4.3.1. Evolution de la densité optique de <i>P.aeruginosa</i> en présence de nanoparticules de ZnO de différentes tailles	109
4.3.2. Etude comparative des paramètres cinétiques de bactéries en présence de nanoparticules de ZnO de différentes tailles	110
a) Influence sur la période de latence	110
b) Influence sur le taux spécifique de croissance	111
c) Influence sur le pourcentage d'inhibition	112
4.3.3. Influence de la taille des NPs sur l'inhibition de la croissance des bactéries	113
4.4. Synthèse et interprétation des résultats	116
4.5. Conclusion	118
5. Activité antifongique des nanoparticules de ZnO contre <i>Candida albicans</i>	118
5.1. Concentration Minimale Inhibitrice (CMI) des nanoparticules contre <i>C. albicans</i>	118
5.2. Kill-Time test de <i>Candida albicans</i> en contact avec de nanoparticules de ZnO	119
5.3. Conclusion	120
5.4. Activité cytotoxique des nanoparticules de ZnO	121
5.5. Conclusion	122

6. Conclusion générale	122
Chapitre 4	123
1. Elaboration de films minces nanostructurés de ZnO : Etude de l'influence des paramètres de synthèse sur la microstructure, la morphologie et la rugosité des films	124
1.1. Analyse par microscopie électronique à balayage (MEB)	125
1.2. Analyse structurale et microstructurale des films minces par diffraction des rayons X	126
1.2.1. Influence de la concentration en précurseur	126
a) Cas du propanol	126
b) Cas de l'éthanol	130
1.2.2. Influence du type de solvant	134
1.3. Influence sur la morphologie et la rugosité	136
1.3.1. Influence de la concentration du précurseur	136
a) Cas du propanol	136
b) Cas de l'éthanol	138
1.3.2. Influence du type de solvant	140
1.4. Conclusion	143
2. Mise en place d'un protocole de mesure de l'activité antimicrobienne des surfaces	144
2.1. Validation de la norme ISO 7581 : 2023	144
2.2. Méthode Validation de la méthode des lames gélosées	145
2.3. Validation de la norme ISO 22196 :2011	145
2.4. Analyse de la lixiviation des nanoparticules de ZnO et validation de leur neutralisation	148
a) Estimation de la concentration en ions Zn^{2+} dans une solution d'Eugon LT Sup agité au vortex en présence de films minces de ZnO et de billes	148
b) Validation de la neutralisation de l'activité antibactérienne des nanoparticules par l'Eugon LT Sup	149
2.5. Conclusion	149
3. Etude de l'activité antimicrobienne de couches minces de ZnO : Effet de la microstructure des couches sur leur propriété antimicrobienne	150
3.1. Influence sur l'activité antibactérienne	151
3.2. Influence sur l'activité antifongique contre <i>Candida albicans</i>	154
3.3. Synthèse et analyse des résultats	155

3.4. Conclusion	156
4. Activité antibactérienne de la peinture formulée avec les nanoparticules de ZnO	157
4.1. Conclusion	159
5. Conclusion générale	160
Conclusion générale	161
Perspectives	163
RÉFÉRENCES	166
ANNEXES	196

Liste des figures

Figure 1: Mécanismes antimicrobiens (contre les bactéries et/ou les champignons) de diverses NPs[53]. _____	10
Figure 2: La structure Wurtzite du dioxyde de zinc ZnO. _____	15
Figure 3 : Illustration du processus de transition du sol au gel. _____	16
Figure 4: Aperçu des types de processus réalisables avec la méthode sol-gel et des produits obtenus à partir de chaque processus [84]. _____	17
Figure 5 : Esquisse des équilibres chimiques intervenant dans les solutions initiales. L'hydrolyse et la condensation sont stimulées par la température. Il peut en résulter des groupements condensés solubles ou colloïdaux, qui peuvent être déposés comme précurseurs [92]. _	20
Figure 6 : Structure d'une bactérie [93]. _____	21
Figure 7 : Structure du peptidoglycane [94]._____	22
Figure 8 : Comparaison de la structure pariétale des bactéries a) Gram négatives et b) Gram positives [100]._____	24
Figure 9: Structure de la paroi d'une levure [100]. _____	25
Figure 10: a) Illustration d' <i>Escherichia coli</i> (Centers for Disease Control and Prevention CDC); et b) Culture d' <i>Escherichia coli</i> dans une boîte de Petri (German Center for Infection Research)._____	26
Figure 11: a) Illustration d'une bactérie <i>Pseudomonas aeruginosa</i> et b) Culture de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> sur boîte de Pétri (Science Photo Library). _____	27
Figure 12: a) Image microscopie électronique à balayage (MEB) de <i>Staphylococcus aureus</i> résistantes à la méticilline (SARM) et b) SARM sur une boîte de Pétri (CDC)._____	28
Figure 13: a) Image microphotographie électronique à balayage (MEB) en couleur de cellules du champignon de type levure <i>Candida albicans</i> (Science Photo Library) et b) <i>C. albicans</i> sur gélose [122]._____	30
Figure 14: Schéma synoptique de la structure du biofilm. _____	33
Figure 15: Les différentes étapes de formation d'un biofilm [137]. _____	34
Figure 16: a) Les autoinducteurs de petite taille prédominante impliqués dans le quorum sensing et b) Illustration du quorum sensing. _____	37
Figure 17: a) Cliché microscopie électronique à balayage (MEB) d'un biofilm d' <i>E. coli</i> [150] ; b) Image par microscopie confocale d'un biofilm de <i>P. aeruginosa</i> (PAO1W) formé à la surface d'un dispositif de cathéter urinaire en silicone (Biofilm Image Gallery NBIC) ; c)	

MEB d'un biofilm de <i>S. aureus</i> USA300 (MRSA) sur la peau (Biofilm Image Gallery NBIC) ; d) MEB d'un biofilm de <i>C. albicans</i> [151] et e) "Biofilm fracturé" (Biofilm Image Gallery NBIC).	38
Figure 18: Représentations schématiques des différentes stratégies actuellement utilisées pour concevoir des surfaces nanostructurées avec des propriétés anti-biofilm [157].	39
Figure 19: Comportement rhéologique des peintures [167].	43
Figure 20 : Dispositif expérimental pour la synthèse de nanoparticule de ZnO.	49
Figure 21 : Illustration schématique de synthèse des nanopoudres de ZnO	50
Figure 22 : Dépôt des nanoparticules dans le milieu de culture des microorganismes, sans l'ajout d'un dispersant.	51
Figure 23 : Mécanisme de fixation des nanoparticules sur le substrat.	53
Figure 24 : Image illustrant le procédé d'élaboration de films minces de ZnO.	53
Figure 25 : Films minces de ZnO obtenus : a) 0,1 M Propanol ; b) 0,25 M Propanol et c) 0,4 M Propanol.	54
Figure 26: Illustration de la loi de Bragg sur la diffraction des plans (hkl).	56
Figure 27: Illustration du processus de la transmission électronique.	58
Figure 28: Représentation schématique de l'interaction entre un faisceau d'électrons et la surface d'un échantillon.	59
Figure 29: Transitions énergétiques quantiques dans la diffusion Rayleigh et Raman.	60
Figure 30: Présentation schématique de la technique de l'infrarouge à transformée de Fourier par réflexion totale atténuée (ATR) [193].	62
Figure 31: Schéma du principe de la microscopie à force atomique (AFM) [194].	63
Figure 32: Cinétique de croissance des microorganismes [195].	64
Figure 33: Schéma d'illustration de la détermination d'une CMI par des méthodes de dilution a) Macrodilution, b) Milieu gélifié et c) Microdilution dans une microplaque à 96 puits.	68
Figure 34 : Détermination d'une CMB par la méthode de dénombrement sur plaque de gélose.	70
Figure 35: Interprétation des résultats selon le manuel d'utilisation de [207].	77
Figure 36 : Mesure d'ATP dans des échantillons d'éthanol, de butanol et d'isopropanol en présence de <i>S. aureus</i> , <i>E. coli</i> et <i>P. aeruginosa</i> .	84
Figure 37 : Synthèse de nanopoudres de ZnO à 70°C en utilisant divers alcools, avec un rapport [H ₂ O/Zn ²⁺] de 10 et un ratio MEA/Zn ²⁺ de 1 pendant 22h.	86
Figure 38 : Diffractogrammes DRX de poudres de nanoparticules de ZnO élaborées à différentes températures (MEA/Zn ²⁺ = 1, H ₂ O/Zn ²⁺ = 10, 22 heures, dans le butanol).	88

Figure 39 : Affinement de Rietveld de poudres de nanoparticules de ZnO élaborées à 94°C dans le butanol à un ratio MEA/Zn ²⁺ = 1 ; un taux d'hydrolyse H ₂ O/Zn ²⁺ =10 et une durée d'agitation de 22h.	89
Figure 40 : Diffractogrammes DRX de nanopoudres de ZnO élaborées à différents ratio MEA/Zn ²⁺ (a) (T= 110°C , H ₂ O/Zn ²⁺ = 10, 22 heures, dans le butanol).	91
Figure 41 : Diffractogrammes DRX de nanopoudres de ZnO élaborées à différents taux d'hydrolyse H ₂ O/Zn ²⁺ (h).	93
Figure 42: Diffractogrammes DRX de nanopoudres de ZnO élaborées à différentes durée d'agitation.	95
Figure 43: Diffractogrammes RX des échantillons synthétisés à 80°C, en variant le taux d'hydrolyse H ₂ O/Zn ²⁺ (h), du rapport MEA/Zn ²⁺ (a) et en présence de soude.	96
Figure 44 : Diffractogrammes RX des échantillons de nanoparticule de ZnO de tailles variables.	99
Figure 45: Affinement Rietveld de nanoparticules de ZnO de 22 nm.	99
Figure 46 : Spectre Raman des échantillons de nanoparticules de ZnO de tailles variables.	101
Figure 47 : Spectroscopie infrarouge par transformée de Fourier (FTIR) des nanoparticules de ZnO de 22 nm.	102
Figure 48 : Image MET de nanoparticules de ZnO de 22 nm	103
Figure 49 : Cliché MEB des nanoparticules de ZnO de 35 nm.	103
Figure 50 : Évolution de la stabilité des suspensions de nanoparticules dispersées dans du PAAS au fil du temps. ZnO-1 = 22 nm ; ZnO-2 = 35 nm et ZnO-3 = 66 nm.	105
Figure 51 : Evolution des densités optiques des suspensions de nanoparticules au cours du temps.	105
Figure 52 : Effet de la taille des nanoparticules de ZnO sur la CMI contre <i>E. coli</i> , <i>P. aeruginosa</i> et <i>S. aureus</i> .	108
Figure 53 : Effet de la taille des NPs de ZnO sur leur CMB contre <i>E. coli</i> , <i>P. aeruginosa</i> et <i>S. aureus</i> .	109
Figure 54: Croissance de la densité optique DO ₆₀₀ de <i>P. aeruginosa</i> en contact avec des NPs de ZnO de (a) 22 nm; (b) 35 nm; et (c) 66 nm à différentes concentrations.	110
Figure 55 : Effet de la taille et de la concentration des NPs de ZnO sur les paramètres de croissance d' <i>E. coli</i> , <i>P. aeruginosa</i> et <i>S. aureus</i> : a) Période de latence; b) Taux de croissance spécifique ; et c) Pourcentage d'inhibition.	113
Figure 56 : Influence de la taille des NPs de ZnO à différentes concentrations sur l'inhibition de la croissance des bactéries.	115

Figure 57 : Concentration Minimale Inhibitrice (CMI) de nanoparticules de ZnO contre <i>C. albicans</i> .	119
Figure 58 : Mesure de l'activité antifongique des nanoparticules de ZnO à l'aide du test de mortalité.	120
Figure 59 : Densité optique des fibroblastes dermiques en fonction de la concentration en nanoparticules de ZnO de 22 nm.	121
Figure 60 : Image MEB de couches minces de ZnO a) 0,4 M dans le propanol et b) 0,25 M butanol.	125
Figure 61 : Diffractogrammes DRX de couches minces de ZnO en fonction de la concentration du précurseur de zinc dissout dans le propanol.	127
Figure 62 : Coefficient de texturation des plans réticulaires des couches minces en fonction de la concentration du précurseur de zinc dissous dans le propanol.	128
Figure 63: Affinement de Rietveld de l'échantillon issu d'une solution colloïdale de précurseur à 0,4 M de précurseur dissous dans le propanol.	129
Figure 64: Diffractogrammes DRX de couches minces de ZnO en fonction de la concentration du précurseur de zinc dissout dans l'éthanol.	131
Figure 65: Coefficient de texturation des plans réticulaires des couches minces de ZnO en fonction de la concentration du précurseur de zinc dissout dans l'éthanol.	131
Figure 66: Affinement de Rietveld de l'échantillon issu d'une solution colloïdale de précurseur à 0,25 M de précurseur dissous dans l'éthanol.	133
Figure 67 : Diffractogrammes RX de films minces en fonction du type de solvant.	134
Figure 68 : Evolution du coefficient de texture en fonction du type de solvant.	135
Figure 69 : Image AFM de : a) 0,1 M Propanol ; b) 0,25 M Propanol et c) 0,4 M Propanol.	137
Figure 70: Image AFM: a) 0,1 M Ethanol ; b) 0,25 M Ethanol et c) 0,4 M Ethanol.	139
Figure 71: Image AFM de films provenant de : a) l'éthanol ; b) le propanol et c) le butanol.	142
Figure 72: Schéma synoptique du protocole de mesure de l'activité antimicrobienne des surfaces, basé sur la méthode développée dans ce travail et inspirée de la norme ISO 22196:2011.	148
Figure 73: Activité antibactérienne de films minces de ZnO : a) 0,1 M Propanol ; b) 0,25 M Propanol ; c) 0,25 M Ethanol ; d) 0,25 M Butanol et e) 0,4 M Propanol.	152
Figure 74: Activité antifongique de films minces de ZnO contre <i>C. albicans</i> : a) 0,1 M Propanol ; b) 0,25 M Propanol et c) 0,4 M Propanol.	154
Figure 75: L'efficacité antibactérienne et la taille des différents motifs de surface [306].	155

Figure 76: Film de peinture formulée avec des nanoparticules de ZnO. _____	157
Figure 77: Effet antibactérien d'une peinture formulée avec des nanoparticules de ZnO contre a) <i>S. aureus</i> ; b) <i>E. coli</i> et c) <i>P. aeruginosa</i> . _____	158
Figure 78: Diffractogrammes DRX de couches minces de CuO. _____	164

Liste des tableaux

Tableau 1: Nanomatériaux couramment utilisés en tant qu'agents antimicrobiens, leurs mécanismes d'action et leurs caractéristiques [70].	12
Tableau 2 : Caractéristiques des microorganismes étudiés.	31
Tableau 3: Récapitulatif des conditions de synthèse des échantillons.	52
Tableau 4 : Caractéristiques physico-chimiques des solvants.	86
Tableau 5: Paramètres cristallins des nanoparticules en fonction de la température de synthèse.	90
Tableau 6: Paramètres cristallins des nanoparticules en fonction du ratio MEA/Zn ²⁺ .	92
Tableau 7 : Paramètres cristallins des nanoparticules en fonction du taux d'hydrolyse H ₂ O/Zn ²⁺ .	94
Tableau 8: Paramètres cristallins des nanoparticules en fonction de la durée d'agitation.	95
Tableau 9 : Paramètres cristallins des nanoparticules cristallisées et pures.	97
Tableau 10: Paramètres de synthèse des nanopoudres de ZnO.	98
Tableau 11 : Paramètres cristallographiques des nanoparticules de ZnO obtenues.	100
Tableau 12 : Résultats de l'analyse Rietveld de couches minces de ZnO en fonction de la concentration du précurseur dissous dans le propanol.	129
Tableau 13 : Résultats de l'analyse Rietveld de couches minces de ZnO en fonction de la concentration du précurseur dissous dans l'éthanol.	132
Tableau 14: Résultats de l'analyse Rietveld de couches minces de ZnO en fonction du type d'alcool.	136
Tableau 15: Effet de la concentration du précurseur de zinc sur la rugosité des films de ZnO préparés dans le propanol.	138
Tableau 16: Effet de la concentration du précurseur de zinc sur la rugosité des films de ZnO préparés dans l'éthanol.	140
Tableau 17: Effet du type de solvant sur la rugosité des films de ZnO.	143
Tableau 18: Évaluation de la concentration bactérienne en Log ₁₀ UFC/mL selon la norme ISO 7581 :2023.	144
Tableau 19: Évaluation de la concentration bactérienne en Log ₁₀ UFC/mL selon la méthode des lames gélosées.	145
Tableau 20: Évaluation de la concentration bactérienne en Log ₁₀ UFC/cm ² selon la norme ISO 22196 :2011.	146
Tableau 21: Amélioration du taux de récupération des bactéries <i>E.coli</i> par agitation mécanique.	147

Tableau 22: Validation d'une nouvelle méthode de décrochage de germes conforme à la norme ISO pour <i>S. aureus</i> ; <i>P. aeruginosa</i> et <i>C. albicans</i> . _____	147
Tableau 23: Analyse élémentaire et quantitative par ICP d'une solution d'Eugon LT Sup après avoir été soumis au vortex en présences de billes et de films de ZnO. _____	149
Tableau 24: Validation de la neutralisation des nanoparticules de ZnO lixiviées par l'Eugon LT Sup. _____	149
Tableau 25: Caractéristiques des couches minces de ZnO sélectionnées dans le cadre de l'étude des propriétés antibactérienne _____	151
Tableau 26: Activité antibactérienne (R) de films minces de ZnO en Log ₁₀ UFC/cm ² . ____	153
Tableau 27: Conditions de synthèse et rugosité des échantillons de couches minces étudiées sur le <i>C. albicans</i> . _____	154
Tableau 28: Activité antifongique de films minces de ZnO en Log ₁₀ UFC/cm ² . _____	155
Tableau 29: Activité antibactérienne d'une peinture formulée avec de nanoparticules de ZnO. _____	159
Tableau 30: Activité antifongique de couches minces de CuO contre <i>C. albicans</i> . _____	164

Liste des annexes

Annexe 1 : Pureté des nanoparticules. _____	197
Annexe 2 : Caractéristiques des lames gélosées : Screening des microorganismes présents sur des surfaces à l'aide de lames gélosées contenant un neutralisant. _____	197
Annexe 3 : Stabilité des suspensions de nanoparticules de ZnO de 22 nm dispersées à l'aide du dodécyle sulfate de sodium (SDS). _____	197
Annexe 4 : Validation des témoins sur : a) <i>E. coli</i> ; b) <i>P. aeruginosa</i> ; c) <i>S. aureus</i> et d) <i>C. albicans</i> . _____	198
Annexe 5 : Colonies de <i>Candida albicans</i> en présence des différentes concentrations en NPs de ZnO de 22 nm avant (0 h) et après 48 h d'incubation à 30°C dans le FLUOstar. _____	199
Annexe 6: Diffraction des rayons X de couches minces de ZnO élaborées à partir du butanol avec différentes concentrations en précurseur. _____	199
Annexe 7 : Image AFM : a) 0,1 M Butanol; b) 0,25 M Butanol et c) 0,4 M Butanol. _____	200
Annexe 8: Effet de la concentration du précurseur de zinc sur la rugosité des films de ZnO préparés dans l'éthanol. _____	201
Annexe 9 : Spectres Raman de films minces de ZnO : a) Effet de la concentration en précurseur sur les films préparés à partir du propanol et b) Effet du type de solvant. _____	201

Introduction générale

Introduction générale

Les maladies infectieuses microbiennes constituent un problème de santé mondial majeur, avec un fardeau économique et social de plus en plus lourd [1-2]. La plupart des infections microbiennes potentiellement mortelles sont contractées dans des établissements de soins, tels que les hôpitaux et les unités de soins intensifs, communément appelées infections nosocomiales ou infections associées aux soins de santé (IAS) [2]. Le taux d'incidence des infections nosocomiales (IN) varie de 5 % à 10 % en Europe et en Amérique [3]. Selon le Centre européen de prévention et de contrôle des maladies, chaque année, les hôpitaux européens enregistrent environ 4,5 millions d'infections associées aux soins de santé, dont plus de la moitié pourraient être évitées [4]. Ces infections perturbent chaque étape des procédures médicales, depuis la formulation de diagnostics trompeurs et erronés jusqu'à la réalisation d'opérations chirurgicales préjudiciables et de traitements incomplets et inefficaces [5]. La gravité de ces conditions est exacerbée par la présence d'infections supplémentaires ou secondaires telle que la septicémie [5]. Les défis actuels auxquels sont confrontés les systèmes de soins de santé sont principalement attribués à la résistance à de multiples médicaments (MDR : Multidrug Resistance), qui constitue une grave menace pour la santé publique [6]. Par conséquent, outre la recherche de nouveaux antibiotiques et de processus de biodécontamination dans les hôpitaux, il y a un grand intérêt à étudier des approches alternatives pour développer des méthodes préventives afin de réduire le nombre d'infections de manière significative.

Les nanoparticules (NPs) d'oxydes métalliques sont apparues comme des candidats prometteurs pour prévenir l'émergence d'agents pathogènes résistants [7], en raison de leurs propriétés physicochimiques uniques et de leur rapport surface/volume élevé, qui leur permettent d'exercer divers modes d'action (MOAs) contre les micro-organismes. Le mécanisme d'action des NPs englobe des interactions chimiques, physiques, ainsi que des mécanismes combinés, agissant tous sur les cellules microbiennes. Le mécanisme chimique comprend la libération d'ions et la génération subséquente d'espèces réactives de l'oxygène (ERO) par les NPs [8-10]. Les ions métalliques sont adsorbés sur la membrane cellulaire et interagissent ensuite avec les groupes fonctionnels (-COOH, -NH₂, et -SH) des acides nucléiques, désactivant ainsi les enzymes et provoquant une altération de la structure cellulaire [11]. L'élévation des ERO a de nombreuses conséquences sur les bactéries, notamment la peroxydation des lipides [10]. L'interaction physique implique des interactions

directes entre les NPs et les micro-organismes. Les NPs peuvent interagir physiquement avec les parois cellulaires bactériennes, causant des dommages structurels qui entraînent la lyse cellulaire. Le mécanisme combiné repose sur des interactions électrostatiques entre les NPs et la membrane cellulaire. Cette interaction électrostatique peut entraîner une dépolarisation de la membrane bactérienne, provoquant une perte potentielle de la membrane et une rupture de la cellule. Les NPs peuvent également être internalisées par endocytose, absorption non spécifique, diffusion à travers la membrane et adsorption [12-13]. Par conséquent, les NPs d'oxydes métalliques sont prometteuses en tant qu'agents antimicrobiens [14-15], grâce à leur capacité à utiliser des mécanismes d'action multiples pour lutter contre la résistance microbienne. Dans ce contexte, l'oxyde de zinc (ZnO) est de plus en plus prisé en raison de sa biocompatibilité, de sa synthèse facile, de sa stabilité chimique, de sa grande abondance, de son coût abordable et de ses propriétés antimicrobiennes [16-18].

Ce travail s'inscrit dans le contexte de la lutte contre les infections nosocomiales, en proposant une stratégie visant à prévenir la propagation des infections par l'élaboration de surfaces antimicrobiennes à base de ZnO. L'influence de la taille des NPs de ZnO a d'abord été étudiée contre *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* et *Staphylococcus aureus*. L'activité antimicrobienne a également été testée contre la levure *Candida albicans*. Ces quatre micro-organismes ont été sélectionnés car ils sont parmi les principaux responsables des infections nosocomiales. Les NPs ont été synthétisées par la méthode sol-gel en raison de son faible coût et sa grande adaptabilité [19]. Elles ont été extraites sous forme de poudre pour s'affranchir de l'influence des solvants sur leur activité antimicrobienne. Un procédé de synthèse contrôlé a permis d'obtenir des NPs de tailles variables. Les poudres de NPs ont été redispersées dans un solvant aqueux dépourvu d'activité antimicrobienne, et leur stabilité a été évaluée en amont, un facteur crucial pour garantir une efficacité optimale [20]. L'innocuité des NPs a également été évaluée sur des cellules dermiques humaines, un aspect fondamental pour envisager leur introduction sur le marché des agents antimicrobiens.

L'étude a ensuite porté sur l'évaluation de l'activité antimicrobienne des NPs de ZnO sous forme de couches minces. Une analyse approfondie a été réalisée pour examiner l'influence de la microstructure, de la morphologie et de la rugosité des couches sur leur efficacité antimicrobienne, établissant ainsi la relation entre les propriétés de surface et leurs performances.

Avant de mesurer l'activité antimicrobienne des couches minces, une validation rigoureuse du protocole utilisé a été réalisée, conformément aux normes ISO 75081 :2024 et ISO 22196 : 2011, ainsi qu'à une méthode semi-quantitative utilisant des lames gélosées en laboratoire. Cette étape était essentielle pour garantir des mesures précises, reproductibles et fiables, tout en assurant que la méthode réponde aux exigences des applications industrielles.

Enfin, la dernière phase de cette recherche a consisté à formuler une peinture aqueuse contenant des NPs de ZnO, et à évaluer l'activité antibactérienne des films de peinture déposés par la méthode de dip-coating.

Le premier chapitre concerne une synthèse bibliographique qui donne les notions importantes relatives au procédé d'élaboration des matériaux à savoir le procédé sol-gel, les propriétés et caractéristique du ZnO, Nous dressons un état de connaissance des applications industriels des NPs en tant qu'agents antimicrobiens, ainsi que la formulation de peinture et la formation de biofilms.

Le deuxième chapitre présente les différentes méthodes de synthèse, de caractérisation et d'évaluation des propriétés des nanomatériaux synthétisés, ainsi que de leur activité antimicrobienne. Il aborde les procédés de synthèse par la méthode sol-gel, les techniques d'analyse spectroscopique (Raman, FTIR, UV-Visible), les techniques de microscopie (MEB, TEM, AFM) et de caractérisation structurale (DRX). En outre, il détaille les méthodes de mesure de la concentration minimale inhibitrice et bactéricide (MIC et MBC) par microdilution, le test de survie bactérienne (Time-Kill Test), les protocoles de mesure de l'activité biocide des surfaces, ainsi que l'analyse de la cytotoxicité.

Le troisième chapitre examine l'effet de la taille des NPs de ZnO en suspension sur leur activité antimicrobienne ainsi que sur leur toxicité vis-à-vis des cellules dermiques humaines. Cette section débute par une analyse de l'activité antibactérienne des solvants utilisés dans le procédé sol-gel, suivie d'une étude de l'influence de divers paramètres de synthèse sur la taille des NPs. L'impact de la taille des NPs de ZnO sur la cinétique de croissance bactérienne est ensuite discuté en détail. Une étude sur l'activité antifongique des NPs est également abordée.

Le quatrième et dernier chapitre est consacré à l'étude de l'activité antimicrobienne des films de ZnO, ainsi que d'une peinture formulée avec des NPs de ZnO. L'influence de la concentration du précurseur et du solvant de synthèse sur la microstructure, la morphologie et la rugosité des films de ZnO est présentée. L'activité antifongique des films de ZnO est

également étudiée. Une étude sur la mise en place d'un protocole de mesure de l'activité antimicrobienne de surface est également présentée.

Enfin, une conclusion générale terminera ce document présentant les résultats essentiels de l'étude, ainsi que les perspectives possibles.

Chapitre 1

Etude bibliographique

Ce chapitre est une revue bibliographique non exhaustive sur les thèmes centraux de notre étude. Celle-ci vise à combattre les infections nosocomiales à travers l'utilisation de nanoparticules antimicrobiennes, spécifiquement celles d'oxyde de zinc (ZnO). Nous analysons le potentiel et les défis associés aux nanoparticules, examinant leur mécanisme antimicrobien, leurs caractéristiques et propriétés spécifiques. Le procédé Sol-Gel utilisé pour leur synthèse est également abordé, ainsi que les différents microorganismes étudiés, leurs biofilms, et la formulation de peintures.

1. Potentiel des nanoparticules en tant qu'agents antimicrobiens

Les nanomatériaux ont émergé comme des agents microbicides prometteurs dans divers domaines en raison de leur activité microbicide. Leur rapport surface/volume élevé, combiné à leurs propriétés physico-chimiques uniques, leur permet d'exercer divers modes d'action (MOA) contre les micro-organismes, les rendant uniques en tant qu'agents antimicrobiens. Cette capacité exceptionnelle des NPs à inhiber la croissance des microorganismes a ouvert la voie à de nombreuses applications innovantes dans les domaines de la lutte contre les infections, de la désinfection et de la préservation des matériaux. Les classes représentatives de nanomatériaux pour l'application antimicrobienne comprennent les NPs à base de métaux, les nanomatériaux à base de carbone, les polymères, les nanocomposites, les nanoémulsions, les liposomes et les nanomatériaux intelligents [21]. Selon des rapports récents, les nanomatériaux à base de carbone, tels que les fullerènes, les nanotubes de carbone (NTC), en particulier les nanotubes de carbone à paroi simple (SWCNT), et les NPs d'oxyde de graphène (GO), présentent des propriétés antimicrobiennes intéressantes [22]. L'un des mécanismes principaux implique le contact direct des micro-organismes avec ces nanostructures de carbone, ce qui altère sérieusement l'intégrité de leur membrane cellulaire, leurs processus métaboliques et leur morphologie [23]. Les NPs métalliques peuvent être bactéricides, bactériostatiques en fonction de leur taille, de leur méthode de calottage et de leur concentration [24]. Les nanomatériaux à base d'argent représentent les agents antimicrobiens métalliques les plus reconnus [21, 24]. Ils sont employés pour favoriser la cicatrisation des plaies, que ce soit sous forme solide ou en solution saline pour le nettoyage des lésions cutanées. Actuellement, on peut trouver des pansements spécialement imprégnés de AgNO_3 [25]. Plusieurs NPs métalliques (Ag, Zn, Cu) et d'oxydes métalliques (ZnO, CuO, MgO, TiO_2) sont largement utilisés dans les applications biomédicales pour leurs propriétés bactéricides [26]. Par exemple, les NPs d'argent, associées

aux nanotubes de titane, sont intégrées dans les implants orthopédiques pour leur action antibactérienne [27].

2. Enjeux et défis des nanoparticules en tant qu'agents antimicrobiens

Bien que les NPs offrent un potentiel prometteur en tant qu'agents antimicrobiens, des préoccupations croissantes subsistent quant à leur innocuité, notamment en ce qui concerne leurs effets sur la santé humaine et l'environnement. Par exemple, il a été signalé que les NPs d'Ag et de TiO₂ peuvent altérer des cellules humaines [28 - 33].

En général, la toxicité d'un matériau de taille nanométrique dépend principalement du type de NPs, de leur concentration, de la durée de l'exposition, ainsi que des propriétés physico-chimiques des particules telles que leur taille, leur forme, leur surface, leur charge superficielle, et les groupes présents en surface. D'autres facteurs tels que l'agrégation, le mode d'interaction avec les cellules, la libération d'ions par les NPs, leur dissolution, leur structure cristalline, leur hydrophobicité, leur bande interdite, le pH du milieu, le revêtement de surface et la fonctionnalisation peuvent également influencer leur prise en charge cellulaire et entraîner des effets indésirables [31]. La couverture de surface est également un élément déterminant [32]. Les NPs d'oxyde de fer super paramagnétiques revêtues sont relativement non toxiques par rapport à leurs homologues nus. Gupta et al. [33] ont démontré que les NPs revêtues de PEG étaient biocompatibles [34].

Les NPs de ZnO, en particulier, ont suscité un intérêt considérable en raison de leur biocompatibilité relativement élevée et de leur application potentielle en tant qu'agent antimicrobien. Des études ont montré que les NPs de ZnO sont biocompatibles avec des cellules humaines, ce qui signifie qu'elles peuvent interagir avec les cellules sans causer de dommages significatifs ou d'effets toxiques [35-38]. Le zinc est un cofacteur important dans divers mécanismes cellulaires et joue un rôle important dans le maintien de l'homéostasie cellulaire ; par conséquent, le ZnO peut présenter une biocompatibilité. Le ZnO administré peut être facilement biodégradé ou peut participer au cycle nutritionnel actif de l'organisme [40, 41]. Selon la Food And Drug Administration (FDA), le ZnO est classé « généralement reconnu comme sûr » lorsqu'il est utilisé comme filtre UV conformément aux directives cosmétiques [39]. Cette classification atteste de son utilisation sécuritaire dans les produits de protection solaire et les cosmétiques, soulignant ainsi sa tolérance par les tissus biologiques humains.

Cependant, l'effet toxique de ces NPs sur l'environnement a également été signalé [40]. L'étude menée par Brunner et ses collègues [41] a révélé que presque toutes les cellules humaines et de rongeurs sont décédées après avoir été exposées à des concentrations de NPs de ZnO supérieures à 15 ppm [42].

Des NPs de ZnO de taille contrôlée et à surface fonctionnalisée ont été développées pour minimiser leur toxicité potentielle. De plus, les avancées dans la nanotechnologie ont permis de créer des revêtements spécifiques qui améliorent la biocompatibilité des NPs de ZnO, les rendant plus sûres pour une utilisation dans divers contextes, y compris en médecine.

Malgré leur relative biocompatibilité, l'utilisation des NPs de ZnO et d'autres nanomatériaux suscite toujours des préoccupations. Selon le rapport du Comité Scientifique sur la Sécurité des Consommateurs (SCCS) de la Commission européenne (2012), les Nps de ZnO constituent un risque limité pour les consommateurs lorsqu'elles sont présentes à une concentration de l'ordre de 25 % [43]. Elles sont également intégrées dans les filtres solaires. Les organismes de réglementation tels que l'Agence de protection de l'environnement aux États-Unis et la Communauté européenne ont pris des mesures pour gérer les risques associés aux NPs, bien qu'il n'existe pas encore de réglementation officielle spécifique sur leur sécurité [39]. Par conséquent, il est essentiel de procéder à une évaluation continue de leur innocuité afin d'assurer leur utilisation responsable dans divers secteurs, tout en minimisant les risques pour la santé humaine et l'environnement.

3. Mécanisme antimicrobien des nanoparticules

Les NPs antimicrobiennes, en raison de leur petite taille et de leur grande surface spécifique, ont la capacité de pénétrer les membranes cellulaires des micro-organismes tels que les bactéries et les champignons. Leurs mécanismes antimicrobiens sont de mieux en mieux compris et sont résumés sur la **Figure 1**. En général, ces mécanismes peuvent être divisés en destruction par contact direct et indirect. La destruction par contact indirect implique l'ionisation et la libération d'espèces réactives à oxygène (ERO).

En ce qui concerne la destruction par contact direct, elle peut impliquer des interactions telles que l'attraction électrostatique, les forces de van der Waals, les interactions récepteur-ligand, les interactions hydrophobes et l'adsorption [44-48]. À l'intérieur de la cellule, les NPs interfèrent avec les biomolécules ou les structures intracellulaires comme les protéines, les organites, les lysosomes et l'ADN, soit par des interactions directes, soit par la génération d'ions ou d'espèces réactives à oxygène ERO [49]. Cela entraîne des modifications de l'activité

métabolique des microorganismes, dans la perméabilité et l'intégrité des cellules, conduisant ultimement à la mort cellulaire.

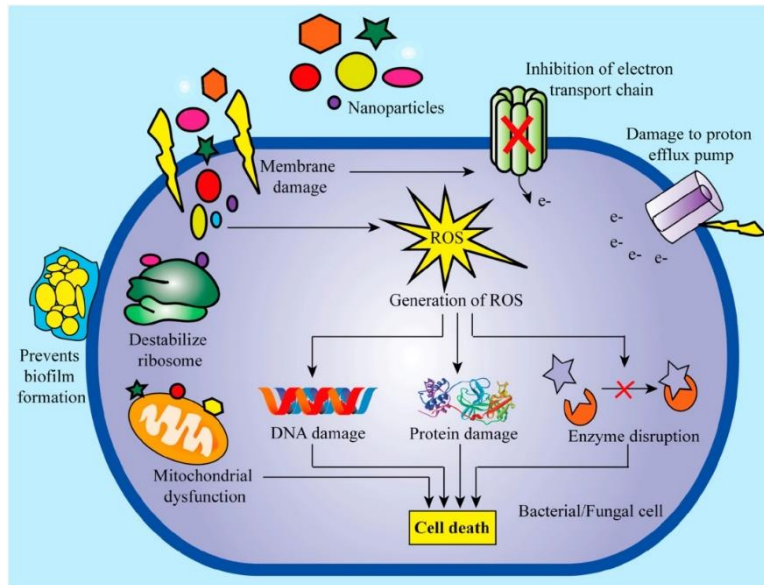


Figure 1: Mécanismes antimicrobiens (contre les bactéries et/ou les champignons) de diverses NPs[50].

Les principaux mécanismes antimicrobiens indirects des NPs peuvent être résumés par la production de peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) induisant un stress oxydatif et la libération d'ions. La production du peroxyde d'hydrogène peut être expliquée de la manière suivante. Les trous (h^+) et les électrons (e^-) provenant respectivement de la bande de valence (VB) et de la bande de conduction (CB) interagissent avec les composés de la surface des NPs. Plus précisément, les trous (h^+) réagissent avec les molécules d'eau provenant du milieu de culture des microorganismes pour générer des radicaux $\bullet OH$ et des ions H^+ . Pendant ce temps, les électrons (e^-) convertissent l'oxygène dissous dans le milieu en anions radicaux superoxyde ($\bullet O_2^-$), qui réagissent ensuite avec les ions H^+ pour produire des radicaux hydroperoxyde ($HO_2\bullet$). Ces radicaux hydroperoxyde réagissent ensuite avec les ions hydrogène H^+ pour former des molécules de H_2O_2 . Le peroxyde d'hydrogène H_2O_2 a la capacité de pénétrer les membranes cellulaires et d'éliminer les bactéries [51, 52]. Dans la littérature, de nombreuses études ont démontré l'activité biocide des ERO [53-55]. Les ERO sont généralement considérés comme des métabolites secondaires qui se forment au cours de processus biochimiques spécifiques au sein des micro-organismes, notamment ceux se produisant dans la chaîne respiratoire. Normalement, la production et l'élimination des ERO sont étroitement régulées. Cependant, en cas de déséquilibre entre leur production et leur dégradation, un état appelé stress oxydatif peut

survenir, entraînant des dommages cellulaires [56]. Les principaux effets toxiques des ERO comprennent la détérioration des membranes cellulaires par la peroxydation des lipides, la dénaturation de l'ADN et l'oxydation des protéines [57]. L'oxydation des lipides de la membrane cellulaire dégrade son intégrité. Cette perte de l'intégrité conduit à la fuite de molécules vitales et d'ions, y compris des substances essentielles telles que les protéines et les enzymes, cruciales pour les fonctions métaboliques de la cellule. Le déséquilibre métabolique conduit finalement à la mort cellulaire. De nombreux auteurs ont démontré les dommages causés aux cellules d'*E. coli* au contact des NPs de ZnO [58-61].

La libération des ERO n'est pas la seule cause des dommages membranaires ; cela peut également résulter d'interactions électrostatiques ou de dommages mécaniques [62]. À un pH faiblement alcalin ou neutre, les membranes bactériennes acquièrent une charge négative en raison de la dissociation des groupes carboxyliques dans les molécules bactériennes. En fonction du potentiel zêta des NPs de ZnO, qui dépend de plusieurs facteurs tels que la couverture de surface, une interaction électrostatique entre les NPs de ZnO et les cellules bactériennes peut se produire, entraînant une dépolarisation de la charge de surface de la membrane cellulaire des bactéries. Cette altération peut compromettre l'intégrité structurelle et la perméabilité de la membrane bactérienne, conduisant à leur mort [63].

La libération d'ions métalliques et leur activité antimicrobienne est également exploré dans la littérature [64-66]. Cependant les chercheurs n'arrivent pas à statuer sur leur importance sur le mécanisme antimicrobienne des NPs [64, 66].

Le mode d'action antimicrobienne des NPs peut être une combinaison de tous ces mécanismes. Il dépend du type de NPs et de microorganismes.

Le **Tableau 1** présente une liste non exhaustive de NPs ayant des propriétés antimicrobiennes, ainsi que leurs mécanismes d'action, tels qu'évoqués dans la littérature.

Tableau 1: Nanomatériaux couramment utilisés en tant qu'agents antimicrobiens, leurs mécanismes d'action et leurs caractéristiques [67].

Type de NPs	Mécanismes proposés	Facteur influençant l'activité antimicrobienne
Ag	Libération d'ions ; induction de cavités et d'espaces dans la membrane bactérienne ; interaction avec des groupes disulfures ou sulfhydryles d'enzymes entraînant la perturbation des processus métaboliques. L'ADN perd sa capacité de réplication et le cycle cellulaire s'arrête à la phase G ₂ /M en raison des dommages à l'ADN (dans le cas d'Ag ₂ O)	Taille et forme des particules.
ZnO	Génération d'ERO à la surface des particules ; libération d'ions zinc, dysfonctionnement membranaire ; et internalisation des NPs dans la cellule.	Taille et concentration des particules.
TiO₂	Stress oxydatif par la génération de ERO ; peroxydation des lipides entraînant une augmentation de la fluidité membranaire et une perturbation de l'intégrité cellulaire.	Structure cristalline, forme et taille.
Si	Influence sur les fonctions cellulaires telles que la différenciation cellulaire, l'adhésion et la propagation.	Taille et forme des particules.

CuO	Passage des nanoparticules à travers la membrane cellulaire des bactéries, puis endommagement des enzymes vitales des bactéries.	Taille des particules et concentration.
MgO et CaO	Endommagement de la membrane cellulaire, entraînant la fuite du contenu intracellulaire et la mort des cellules bactériennes.	Taille des particules, pH et concentration.

La section suivante examine les caractéristiques et propriétés du matériau étudié dans cette recherche, à savoir l'oxyde de zinc (ZnO)

4. Caractéristiques et propriétés des nanoparticules de ZnO

Le ZnO est un semi-conducteur II-VI de type n avec une large bande interdite de 3,3 eV et une énergie de liaison excitonique élevée de 60 meV, ce qui le rend essentiel pour les applications optoélectroniques et photovoltaïques. Sa large bande interdite dans l'UV lui confère également des propriétés de conductivité électrique et d'absorption, le rendant également efficace comme écran anti-UV. Sa haute mobilité électronique le rend avantageux dans les dispositifs électroniques où le transport rapide des charges est nécessaire. Il est utilisé comme photocatalyseur en raison de sa capacité à générer des paires électron-trou sous irradiation lumineuse, qui réagissent avec l'oxygène et l'eau pour produire des radicaux oxydants hautement réactifs capables de décomposer les polluants organiques [68]. Ses propriétés photoélectriques en font également un candidat potentiel pour des applications en tant qu'agent bactériostatique sous lumière visible [69]. Les NPs de ZnO sont efficaces contre les bactéries à Gram positif et à Gram négatif, ainsi que contre les spores thermophiles et barophiles [70]. En raison de leur coût abordable, les NPs de ZnO font partie des NPs d'oxydes métalliques les plus importantes dans les applications biologiques [71]. L'obtention de matériaux de ZnO à l'échelle nanométrique améliore leur performance dans divers domaines [72-74], notamment en tant qu'agents antibactériens.

Le ZnO est connu pour son activité antimicrobienne à l'échelle nanométrique et micrométrique. Néanmoins, son activité est plus importante à des tailles nanométriques [75]. Pasquet et al. [76] ont constaté que la meilleure activité antimicrobienne contre *E. coli* et *P. aeruginosa* était en présence de cristaux de ZnO plus petits. Álvarez et al. [77] ont montré que plus la taille des NPs de ZnO est petite, plus l'inhibition est élevée pour toutes les souches pathogènes étudiées: *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, ainsi que pour les pathogènes dentaires : *Streptococcus mutans*, *Streptococcus sanguinis*, *Porphyromonas gingivalis* et *Prevotella intermedia*, en raison de leur surface spécifique élevée.

L'augmentation de la surface spécifique rend les NPs de ZnO plus réactives, ce qui se traduit par une forte concentration de particules de surface capables d'interagir avec les électrons et les trous. Cette caractéristique offre davantage de sites où les charges électriques peuvent s'accumuler, entraînant une charge électrique de surface élevée et de fortes interactions électrostatiques entre les NPs de ZnO et les membranes bactériennes. En outre, la taille des NPs (de 1 à 100 nm) est comparable à celle des globules de protéines (2 à 10 nm), au diamètre de l'hélice d'ADN (2 nm) et à l'épaisseur des membranes cellulaires (10 nm) [12]. La diminution

de leur taille leur permet ainsi de pénétrer dans les cellules et les organites cellulaires. Le ZnO présente trois (3) structures cristallines : la wurtzite, la blende et le sel gemme ou rocksalt.

La structure wurtzite, celle obtenue dans les conditions ambiantes, est également celle produite dans le cadre de cette thèse. Elle possède un espacement de réseau $a = 0.325$ nm et $c = 0.521$ nm. Le ratio $c/a \sim 1.6$ est proche de la valeur idéale qui est de 1,633. Chaque atome de zinc est entouré par quatre atomes d'oxygène pour former des tétraèdres et inversement [78]. C'est une structure thermodynamiquement stable dans les conditions de pression et de températures normales. Les autres structures, le zinc blende et le rocksalt, se forment dans des conditions particulières. En effet, le zinc blende est stabilisé par des techniques de croissance et le rocksalt s'obtient à haute pression. La **Figure 2** présente la structure cristalline Wurtzite de l'oxyde de zinc ZnO.

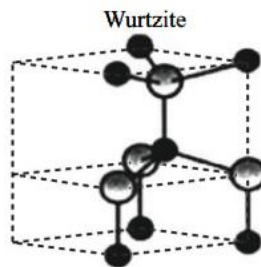


Figure 2: La structure Wurtzite de l'oxyde de zinc ZnO.

5. Le procédé Sol-Gel

5.1. Définition

Le procédé Sol-Gel (SG), une contraction des termes « Solution-Gélification », se définit comme le processus permettant la formation d'un solide à partir d'une solution homogène de précurseurs, en passant par l'intermédiaire d'un sol ou d'un gel. Un sol désigne une suspension de particules colloïdales (de 1 à 1000 nm) dans un liquide, tandis qu'un gel correspond à un réseau inorganique semi-rigide, interconnecté dans une phase liquide continue. Les précurseurs, sous forme de sels métalliques ou d'alcoxydes métalliques de formule générale $M(OR)_n$ (où M représente un métal de valence n et R un groupe alkyle organique C_nH_{2n+1}), initient la réaction chimique. Des réactions d'hydrolyse et de condensation conduisent alors à la formation d'un sol stable et transparent. Ce sol subit ensuite une polymérisation progressive des particules colloïdales vieilles, aboutissant à la formation d'un gel tridimensionnel (Voir **Figure 3**).

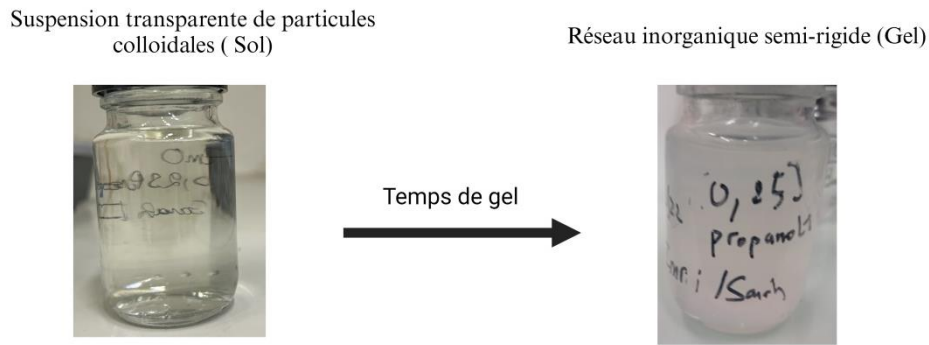


Figure 3 : Illustration du processus de transition du sol au gel.

En raison de sa simplicité, de la possibilité d'obtenir des particules cristallisées à relativement basse température et du contrôle de la composition, le processus sol-gel traditionnel est souvent préféré par rapport à d'autres méthodes chimiques comme la synthèse en phase vapeur chimique [79, 80].

Les procédés sol-gel sont variés, et cette diversité est illustrée par la **Figure 4** de Bokov et al. [81]. Les différentes méthodes de fabrication du procédé sol-gel permettent aux industries de créer des matériaux allant des poudres ultra-fines et des nanocristallites aux fibres céramiques ou en verre, aux films minces de qualité optique, aux céramiques et verres monolithiques, aux aérogels fortement poreux, et aux membranes inorganiques. Le procédé sol-gel, en tant que voie de chimie en phase liquide à basse température et à faible coût, est largement exploité pour la synthèse d'oxydes métalliques et de nanocomposites à base d'oxydes métalliques [82]. Parmi les produits dérivés du procédé sol-gel, les films minces et les revêtements représentent la catégorie la plus importante [83].

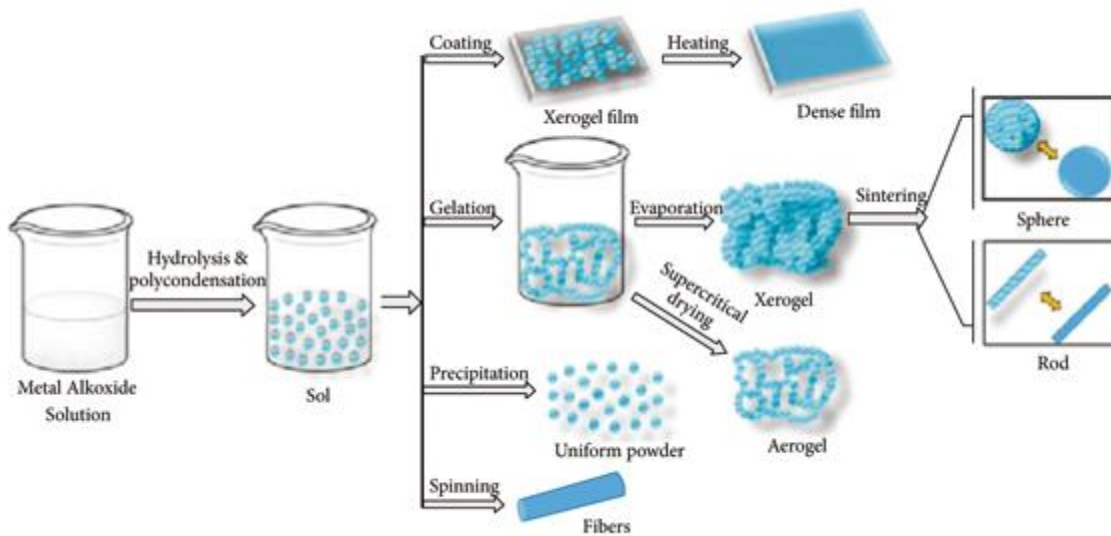


Figure 4: Aperçu des types de processus réalisables avec la méthode sol-gel et des produits obtenus à partir de chaque processus [81].

Le procédé sol-gel aqueux, utilisant de l'eau comme phase liquide, implique l'utilisation de sels métalliques MX_n tels que chlorures, nitrates, oxychlorures, etc., tandis que le sol-gel non aqueux, avec une phase liquide organique, fait intervenir les alcoxydes métalliques, les acétates, etc. La méthode sol-gel utilisée dans cette étude est une méthode hybride consistant à dissoudre des sels métalliques hydratés dans un alcool.

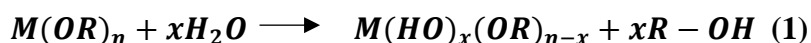
Le paragraphe suivant présente brièvement le mécanisme réactionnel général avant d'aborder plus en détail le mécanisme spécifique de la méthode appliquée dans cette recherche.

5.2.Mécanisme réactionnel

Le procédé sol-gel présente une similitude avec celui de la polymérisation. La première étape consiste à dissoudre le précurseur dans un solvant aqueux ou organique, éventuellement facilitée par l'ajout d'un agent complexant du cation métallique impliqué [84]. Ensuite, les réactions d'hydrolyse et de condensation se déroulent.

a) Hydrolyse du précurseur

Dans la réaction d'hydrolyse, le groupe alcoxyde OR du précurseur est remplacé par un groupe hydroxyle OH . La formule réactionnelle est la suivante :



b) Condensation

La condensation pour former des liaisons M–O–M peut se faire par libération d'une molécule d'eau H₂O (oxalation), équation (2), ou par libération d'une molécule d'alcool ROH (alkoxolation), équation (3) .

Durant le processus d'oxolation, les liaisons M – OH se condensent entre elles, engendrant la formation de liaisons de type métal-oxygène-métal (M – O – M) tout en libérant de l'eau.



Lors de l'alkoxolation, les liaisons M – OH condensent avec les liaisons M – OR, créant ainsi des liaisons de type métal-oxygène-métal (M – O – M) et libérant de l'alcool ROH.



c) Nucléation et croissance

La nucléation est le processus de formation d'une nouvelle phase au sein d'une phase existante [86]. Dans le cas de la cristallisation, elle marque le début de la formation d'un cristal à partir d'une solution, d'un liquide ou d'une vapeur. Un petit groupe d'ions, d'atomes ou de molécules s'assemble selon un motif spécifique d'un solide cristallin, créant ainsi un noyau. Ce noyau sert de point d'ancrage sur lequel d'autres particules viennent se fixer, favorisant la croissance progressive du cristal. La croissance se manifeste par l'augmentation dimensionnelle et la maturation progressive de ces particules au fil du temps. Le contrôle de la nucléation est crucial pour réguler le nombre, la taille, la perfection, le polymorphisme et d'autres caractéristiques des matériaux cristallins [87].

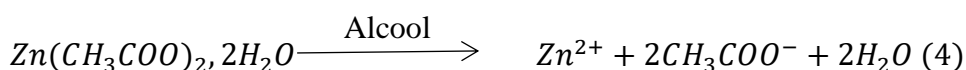
Les paramètres qui influencent la structure, la morphologie et la taille des particules élaborées à partir de cette méthode comprennent la température, le type de solvant, le pH, le rapport d'hydrolyse, le rapport de concentration de l'alkoxyde par rapport à celui de l'eau, ainsi que la nature et la concentration en alcoxyde.

Les additifs tels que les alkanolamines et les acides carboxyliques sont souvent utilisés pour améliorer la solubilité et la stabilité des sels métalliques dans les milieux alcooliques. Par exemple, l'acétate de zinc dihydraté a une solubilité limitée dans des alcools comme l'éthanol et le 2-propanol en l'absence d'autres agents ou de chauffage. Les additifs forment des complexes stables qui empêchent la précipitation rapide des hydroxydes métalliques et facilitent la formation de dispersions ou de solutions homogènes.

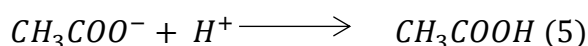
5.3. Mécanisme réactionnel par voie sol-gel hybride

Les nanoparticules de ZnO préparées dans cette étude résultent d'un procédé sol-gel inspiré de Znaïdi et al. [88], avec quelques légères modifications. Ce procédé implique la dissolution d'un précurseur de zinc, l'acétate de zinc dihydraté, à 60°C, dans un solvant organique. La monoéthanolamine (MEA) y est utilisée comme agent chélateur et base faible pour modérer les réactions d'hydrolyse et de condensation. La solution obtenue est une solution transparente de composés intermédiaires. Le mécanisme réactionnel proposé est le suivant (Voir **Figure 5**) :

- **Dissolution initiale du précurseur** : L'acétate de zinc dihydraté se dissout partiellement dans l'alcool, libérant des ions zinc et des ions acétate.

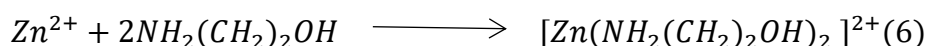


- **Attaque nucléophile** : Un ion acétate est attaqué par un ion hydrogène provenant de l'eau.



- **Formation de complexes stables** :

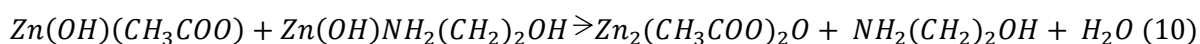
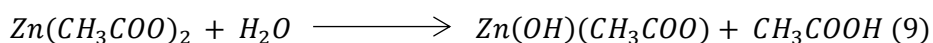
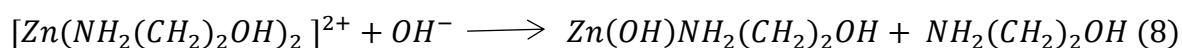
- *Interaction du MEA comme ligand bidentate avec les ions Zn^{2+}* : Les atomes d'azote et d'oxygène du MEA, possédant des doublets d'électrons non liants, agissent comme des nucléophiles et se lient au cation zinc par des liaisons de coordination.



- *Interaction des ions acétate avec les ions Zn^{2+}* : Les ions zinc interagissent avec les ions acétate pour former un complexe stable de zinc-acétate.



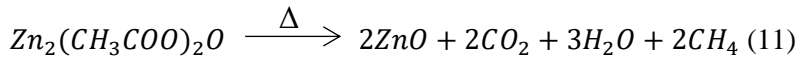
- **Hydrolyse et condensation** : Le MEA, en tant que base faible, augmente légèrement le pH (6) pour former de faibles quantités d'ions OH^- qui pourrait initier des processus d'hydrolyse des complexes et de condensation pour former des espèces Zn-oxo acétate.



À cette étape, la formation de ZnO n'est pas thermodynamiquement favorable et nécessite un apport d'énergie qui peut être d'origine thermique, chimique, ou une combinaison des deux.

Pour la préparation de films minces, l'énergie est d'origine thermique : les films sont traités à la température de cristallisation du ZnO (300-500°C). Pour la préparation de poudres de nanoparticules, une légère modification de la méthode précédemment décrite est réalisée, combinant un traitement chimique et thermique. De l'eau est ajoutée à une température relativement basse pour accélérer les réactions d'hydrolyse-condensation, tandis que la haute température déshydrate les composés, formant ainsi des poudres de ZnO.

- **Formation de couches minces de ZnO par décomposition thermique :**



- **Formation de nanopoudres de ZnO par hydrolyse et déshydratation :**

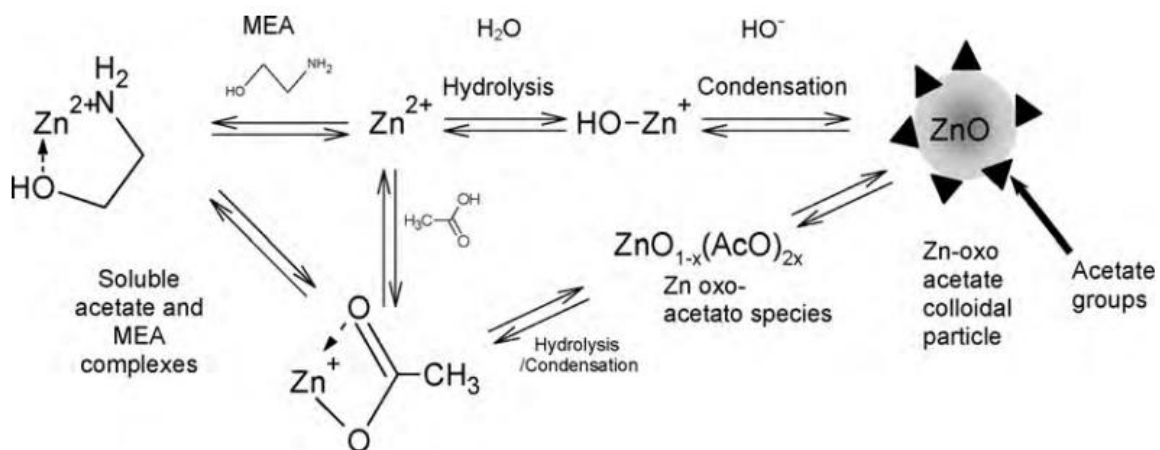
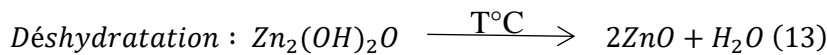
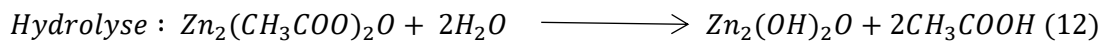


Figure 5 : Esquisse des équilibres chimiques intervenant dans les solutions initiales. L'hydrolyse et la condensation sont stimulées par la température. Il peut en résulter des groupements condensés solubles ou colloïdaux, qui peuvent être déposés comme précurseurs [89].

La partie suivante aborde les généralités concernant les différents microorganismes étudiées dans cette recherche.

6. Généralités sur les microorganismes

6.1. Les bactéries

Les bactéries, en tant qu'organismes procaryote unicellulaires, se caractérisent par leur petite taille et une morphologie variable, exhibant des caractéristiques distinctes. Leur dimension s'étend généralement de 1 à 10 μm . Elles renferment approximativement 70% d'eau. Le poids sec d'une bactérie est constitué de 55% de protéines, 10% de lipides, 3% de lipopolysaccharides, 3% de peptidoglycane, 40% de ribosomes, 20% d'ARN et 3% d'ADN. La composition de leur structure inclus le chromosome, la membrane nucléaire, le cytoplasme, la paroi... ; et d'autres éléments facultatifs tels que les plasmides, la capsule, les pilli.

La **Figure 6** présente la structure d'une bactérie.

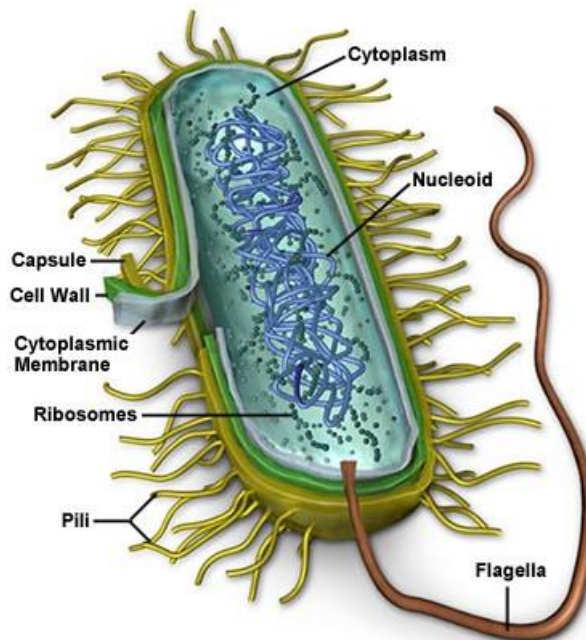


Figure 6 : Structure d'une bactérie [90].

L'architecture et la composition de la structure pariétale joue un rôle crucial pour la viabilité, la virulence et l'intégrité mécanique de la bactérie. La paroi, un réseau de polymère constitue la principale barrière protectrice de la bactérie. Le peptidoglycane (PG), également connu sous le nom de mucopeptide, constitue le polymère de base de la paroi et est présent chez toutes les bactéries, à l'exception des mycoplasmes. Cette structure tridimensionnelle est composée d'unités linéaires répétitives de disaccharide N-acétylglucosamine lié à l'acide N-acétylmuramique. Les disaccharides sont liés entre eux par des chaînes d'acides aminés pentapeptidiques souvent flexibles comme le montre la **Figure 7**.

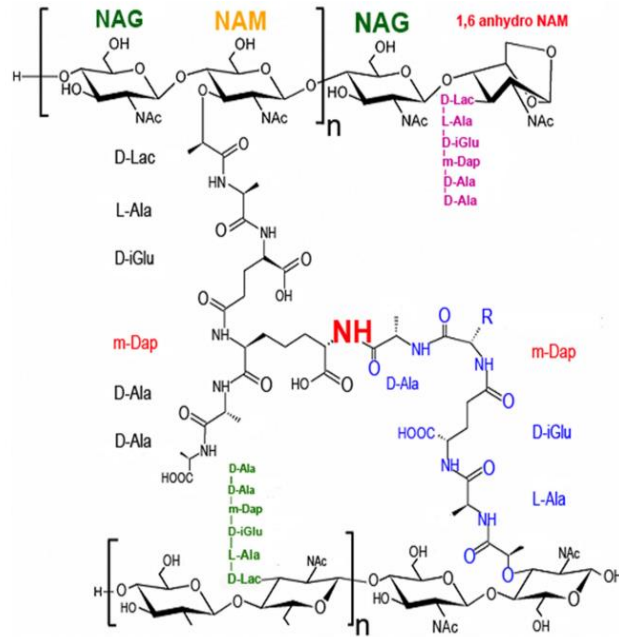


Figure 7 : Structure du peptidoglycane [91].

Le peptidoglycane est le facteur déterminant qui assure la préservation de l'intégrité de la paroi bactérienne, conférant aux bactéries la capacité de résister à la forte pression osmotique interne, tout en jouant un rôle essentiel dans la division cellulaire. L'homéostasie lipidique de la membrane joue également un rôle crucial dans la viabilité des bactéries, car sa composition influence sa viscosité, module sa perméabilité, et affecte le transport des solutés ainsi que les interactions protéiques [92].

Les bactéries sont classées en deux groupes distincts grâce à la coloration de Gram. La classification des bactéries par la coloration de Gram repose sur des différences phénotypiques liées à l'épaisseur de leur paroi cellulaire, qui présente des compositions distinctes en glycosaminopeptide et en lipoprotéines. La paroi cellulaire des bactéries Gram-positives se distingue de celle des Gram-négatives par l'absence de membrane externe et la présence d'une couche épaisse de peptidoglycane entourant la membrane plasmique [92, 93]. En effet, les bactéries Gram-positives possèdent une couche de peptidoglycane 10 à 15 fois plus épaisse que celles Gram-négatives. Les bactéries Gram-négatives, plus complexes, présentent une membrane externe au-delà de la couche de peptidoglycane, composée de lipopolysaccharides (endotoxine), de lipoprotéines et de phospholipides [94].

Gram (+)

La membrane cytoplasmique des bactéries Gram-positives se compose d'une bicouche lipidique dont la composition peut varier considérablement, mais qui inclut généralement des quantités significatives de phosphatidylglycérol et de cardiolipine. Elle est enveloppée de plusieurs couches de PG, formant une coque protectrice d'une épaisseur de 30 à 100 nm [92]. L'enveloppe cellulaire des Gram positives est caractérisée par une richesse en acides téichoïques (AT), se répartissant en deux classes principales : les acides lipotéichoïques (ALT), ancrés à un lipide intégré dans la membrane cellulaire, et les acides muramiques téichoïques (AMT), attachés de manière covalente au PG. La suppression simultanée des acides téichoïques est mortelle car l'un ne peut compenser l'autre. La perte de l'AMT a été observée entraîner une colonisation et une infection réduites de *S. aureus* dans des expériences in vivo, notamment dans le modèle d'endocardite du lapin [91]. D'autres fonctions majeures des acides téichoïques ont été établies, notamment leur capacité à protéger contre le stress environnemental. Elles médient la formation de biofilm et la liaison aux dispositifs médicaux [91].

Gram (-)

La membrane externe est une bicouche lipidique complexe. Elle présente une asymétrie avec des phospholipides (PL) sur sa couche interne et une trame de polymères de lipopolysaccharides (LPS) sur sa couche externe. La charge négative globale de l'enveloppe des bactéries Gram-négatives est attribuée à la nature fortement chargée des LPS. Les LPS représentent le composant principal de la membrane externe des bactéries à Gram négatif, occupant une place cruciale dans le développement de la résistance aux médicaments, le transport et la configuration des protéines extracellulaires, l'absorption des nutriments, ainsi que dans diverses cascades de transduction de signaux [95]. Les fortes interactions latérales entre les LPS, ainsi que leurs chaînes acyles saturées, stabilisent la membrane externe, ce qui limite le passage de molécules hydrophobes. La membrane externe est donc perméable aux petites molécules solubles dans l'eau. On estime que les propriétés biochimiques de la membrane externe confèrent des propriétés mécaniques à celle-ci, jouant ainsi un rôle crucial dans la viabilité des bactéries Gram-négatives [96].

La paroi des Gram-négatif est une monocouche fine d'épaisseur <10 nm. La **Figure 8** est une comparaison entre la structure de l'enveloppe des bactéries Gram-négatives et celles des Gram-positives.

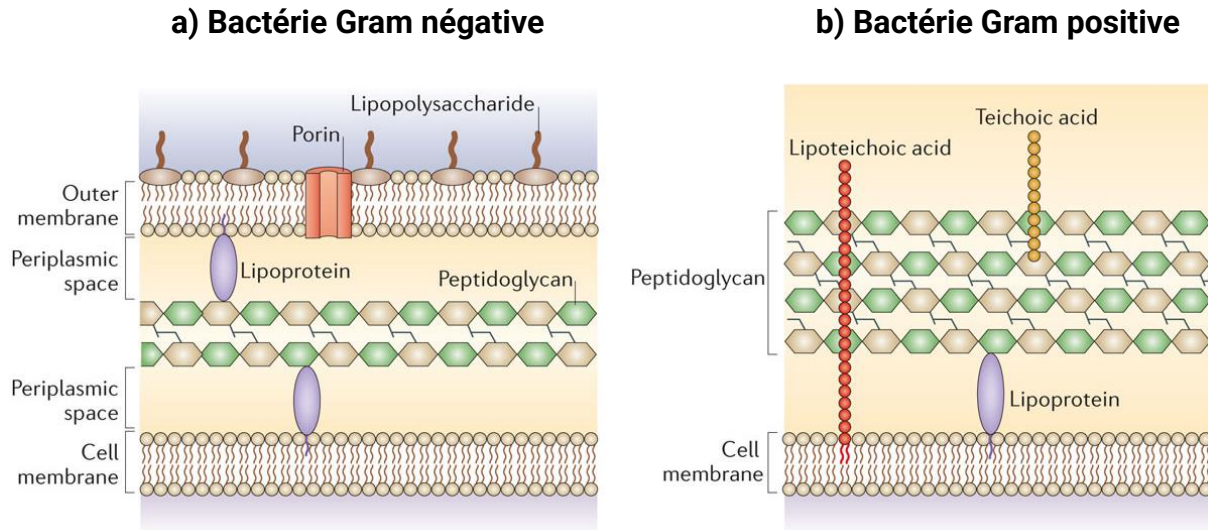


Figure 8 : Comparaison de la structure pariétale des bactéries a) Gram négatives et b) Gram positives [97].

6.2. Les levures

Les levures sont des organismes eucaryotes unicellulaires. À la différence des cellules procaryotes, leurs cellules eucaryotes possèdent un noyau délimité par une membrane, qui renferme l'information génétique, et contiennent des mitochondries, jouant un rôle dans la respiration aérobie et la production d'ATP.

Le genre de levure le plus commun est le genre *Saccharomyces*, utilisé dans la fermentation de la bière. Cependant, d'autres genres de levures existent, notamment *Candida*, possédant un pouvoir pathogène pour l'homme.

Les levures adoptent une forme ovale et sont de taille plus importante que les bactéries, mesurant environ de 4 à 40 μm . Leur membrane cellulaire est également plus rigide comparée à celle des bactéries [98].

La structure d'une cellule de levure comprend une paroi cellulaire, un cytoplasme granulaire, une vacuole proéminente et un noyau. La paroi cellulaire, constituée de chitine associée à d'autres composés chimiques, forme une barrière fine et délicate. Elle protège la levure des agressions physico-chimiques du milieu extérieur.

Chez les eucaryotes, la paroi cellulaire est un ensemble diversifié d'organites, mais en général, elle est composée d'un composant fibrillaire (protéine ou polysaccharide) et d'une matrice amorphe réticulée (généralement une glycoprotéine) [99].

Le composant fibrillaire présente une conformation hélicoïdale de β 1,3-glucane, avec une longueur maximale de 600 nm, soit 1/10 de la circonférence de la cellule [100]. Cette triple hélice de polysaccharides mesure un diamètre de 10 à 30 nm, et chaque brin est ramifié par des groupes 6-hydroxy (β 1,6-glucane) [99, 100]. Les chaînes latérales ont un diamètre de 0,5 à 1 nm. Ces polysaccharides ont une fonction structurale. Le glucane subit une transglycosylation avec la chitine. À la couche la plus externe de l'enveloppe cellulaire des levures se trouvent les manoprotéines, des polypeptides fortement glycosylés (glycoprotéines) qui sont réticulés avec le glucane. Les manoprotéines sont liées entre elles par des ponts disulfures ou par des interactions hydrophobes, assurant ainsi une fonction importante pour la perméabilité de la paroi cellulaire [101-104]. La structure de la paroi d'une levure est présentée sur la **Figure 9**.

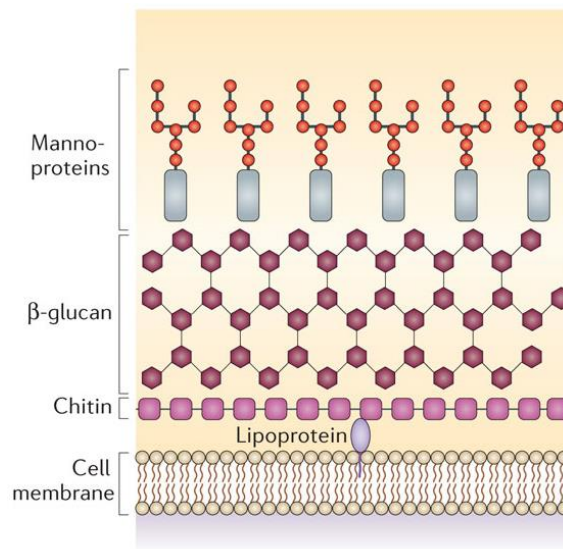


Figure 9: Structure de la paroi d'une levure [97].

Cette étude se concentre sur l'analyse de quatre (4) microorganismes, comprenant deux bactéries à Gram négatif, *Escherichia coli* (ATCC 8739) et *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 9027), une bactérie à Gram positif, *Staphylococcus aureus* (ATCC 6538), et une levure, *Candida albicans* (ATCC 10231). Les caractéristiques de ces microorganismes sont abordés dans les sections suivantes.

▪ *Escherichia coli*

Le genre *Escherichia* appartient à la famille des *Enterobacteriaceae*. Il regroupe cinq espèces (*E. coli*, *E. fergusonii*, *E. hermannii*, *E. albertii* et *E. vulneris*) avec des caractéristiques biochimiques particulières permettant de les distinguer. *E. coli* a la particularité de constituer l'espèce prédominante du microbiote aérobie du côlon à des taux de $10^6 - 10^7$

bactéries/Gramme de selles chez l'homme. Son acquisition a lieu dès les premières heures de la vie puis par voie orale à partir de l'alimentation.

E. coli est un colibacille c'est-à-dire un bacille à Gram négatif. Certaines souches possèdent des flagelles et peuvent se déplacer. Des capsules et des *fimbriae* peuvent également être observés chez certaines souches. Leur croissance est optimale à 37°C. Sur gélose de dénombrement standard, leur croissance donne des colonies blanches, grisâtres, humides, lisses, opaques ou translucides [105, 106].

La majorité des souches *E. coli* sont des commensaux du tube digestif qui nous protègent de l'implantation des bactéries pathogènes (flore de barrière). Cependant, certaines souches sont capables de provoquer des infections chez l'être humain. Ces infections sont classées en deux catégories : infections intestinales (diarrhées) et infections extra-intestinales (infections urinaires, bactériémies, méningites néonatales). Le type le plus dangereux d'infection à *E. coli* qui provoque une intoxication chez les humains est dû à *E. coli* O157. Ce germe produit différentes toxines dont la Shiga-toxine (Centers for Disease Control and Prevention CDC).

La **Figure 10** illustre la morphologie des *E. coli* ainsi que les colonies de ces bactéries sur une gélose nutritive utilisée pour le dénombrement.

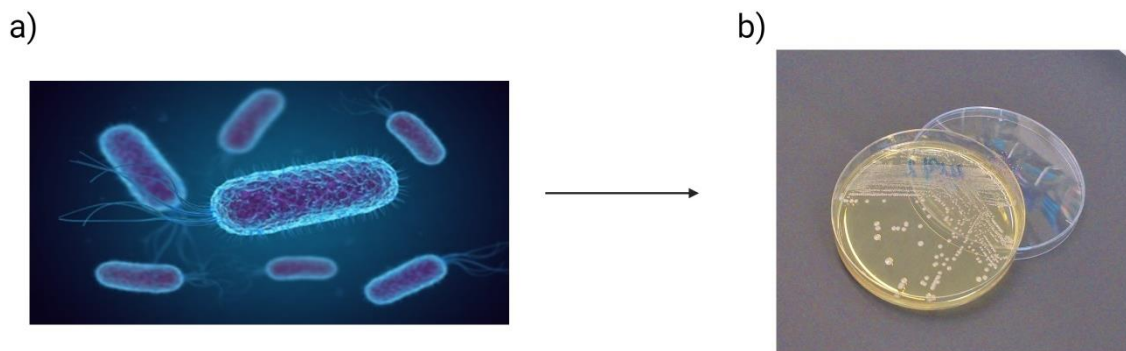


Figure 10: a) Illustration d'*Escherichia coli* (Centers for Disease Control and Prevention CDC); et b) Culture d'*Escherichia coli* dans une boîte de Petri (German Center for Infection Research).

▪ *Pseudomonas aeruginosa*

Pseudomonas aeruginosa est une bactérie à Gram négatif du genre des *Pseudomonas* appartenant à la famille des *Pseudomonadaceas*. Il est aussi appelé bacille pyocyanique en raison de sa coloration bleu-vert caractéristique due à la synthèse des pigments de pyocyanine et de pyoverdine et de son odeur aromatique (seringat). *Pseudomonas aeruginosa* est une bactérie non sporulante, non capsulée sous forme de bâtonnet ou légèrement courbée. Elle est

mobile grâce à la présence d'un flagelle monotriche polaire. Son métabolisme est assez versatile. Il peut utiliser une variété de sucres simples et complexes, d'alcools et d'acides aminés comme seule source de carbone. Son métabolisme respiratoire est aérobic mais peut utiliser le nitrate NO_3 comme source d'oxygène dans les milieux dépourvus d' O_2 . Sa température optimale de croissance est de 37°C mais est capable de croître au-delà de 42°C .

Le *P.aeruginosa* est rencontré dans l'environnement mais peut également être commensale. C'est une bactérie opportuniste à l'origine d'une incidence de 0.4% dans les hôpitaux américains selon la CDC. Il est le quatrième agent pathogène nosocomial le plus communément isolé et représente 10.1% de toutes les infections nosocomiales [105].

La **Figure 11** illustre la morphologie des *P. aeruginosa* ainsi que les colonies de ces bactéries sur une gélose nutritive utilisée pour le dénombrement.

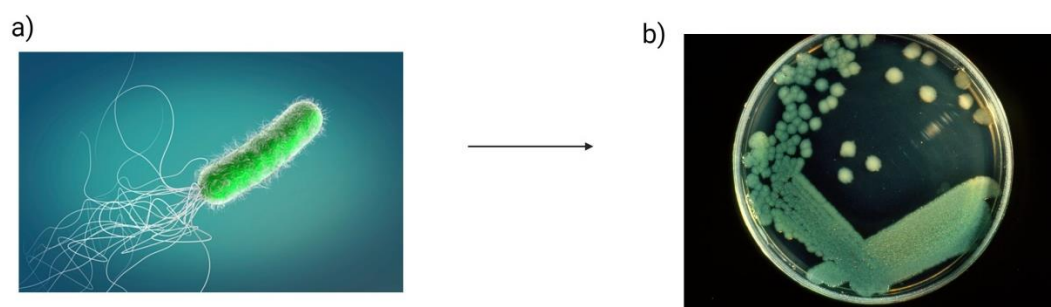


Figure 11: a) Illustration d'une bactérie *Pseudomonas aeruginosa* et b) Culture de *Pseudomonas aeruginosa* sur boîte de Pétri (Science Photo Library).

Par ailleurs, il convient de noter que *Pseudomonas aeruginosa* a récemment subi un changement de taxonomie et est désormais nommé *Pseudomonas paraeruginosa* [107]. Cependant, dans ce document, nous continuons à utiliser son ancienne dénomination, *P. aeruginosa*.

▪ *Staphylococcus aureus*

Les staphylocoques sont des bactéries ubiquitaires présentes dans la flore résidente de la peau de l'homme et des animaux et de façon transitoire dans les autres flores. Ils ont été observés pour la première fois au microscope en 1878 par Louis Pasteur et ses collaborateurs sous forme d'« amas de grains » dans des pus de furoncles et d'ostéomyélites. Certaines de ces espèces sont présentes chez l'homme et chez l'animal tandis que d'autres sont rencontrées plus particulièrement chez l'homme. *S. aureus* existe principalement chez l'homme mais elle est

également retrouvée dans l'environnement et les animaux. C'est une bactérie commensale de la peau et de la muqueuse dont la niche principale est la fosse nasale.

Elle produit des caroténoïdes lui conférant sa couleur dorée qui lui est caractéristique. Son aspect en culture est de blanche à dorée. *S. aureus* est une bactérie à coagulase positive. Elle est peu exigeante (anaérobie facultative) et se cultive à 37°C. « *staphyle* » signifie grappe de raisin en grec. Les *staphylocoques* ont la forme d'une cocci regroupés en amas et ayant une structure semblable à celle du raisin.

S. aureus est l'espèce la plus rencontrée en pathologie humaine. Elle est responsable d'infections suppuratives très diverses, superficielles ou profondes. Elle est classiquement à l'origine d'infections cutané muqueuses comme des folliculites, panaris, impétigos, ou des infections invasives comme les dermo hypodermes nécrosantes, bactériémies ou infections ostéo-articulaires. L'organisme à Gram positif multirésistant le plus fréquemment associé aux infections nosocomiales est *S. aureus* résistant à la méthicilline (SARM).

La **Figure 12** illustre la morphologie des *S. aureus* ainsi que les colonies de ces bactéries sur une gélose nutritive utilisée pour le dénombrement.

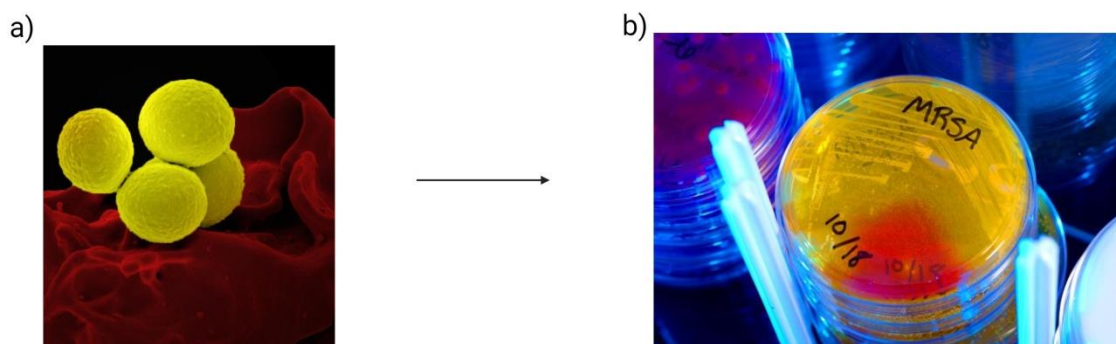


Figure 12: a) Image microscopie électronique à balayage (MEB) de *Staphylococcus aureus* résistantes à la méticilline (SARM) et b) SARM sur une boîte de Pétri (CDC).

▪ *Candida albicans*

Candida albicans, levure aérobie, non capsulée et non pigmentée, se caractérise par la distribution de son matériel génétique en huit chromosomes. Cette levure diploïde se reproduit de manière asexuée par bourgeonnement multilatéral à partir d'une cellule mère, le blastospore, formant ainsi des colonies de teinte blanche crémeuse [108]. *C. albicans* est fréquemment présente dans la flore endogène digestive et vaginale. Les conditions optimales pour son développement se retrouvent dans la muqueuse buccale, avec un milieu humide, un pH neutre

(pH=7), l'absence de lumière et une température comprise entre 30 et 37°C. *C. albicans* montre une résistance dans le milieu extérieur [109].

L'espèce *Candida albicans*, faisant partie du genre *Candida* et de la classe *Saccharomycotina*, partage une divergence évolutive d'environ 840 millions d'années avec la levure *Saccharomyces cerevisiae*, largement utilisée dans la fermentation de la bière [110]. Il est un pathogène fongique opportuniste chez l'homme. Bien qu'il soit normalement présent dans notre flore intestinale, *C. albicans* a la capacité de coloniser presque tous les tissus et organes humains, provoquant ainsi des infections graves et invasives [111]. Il adopte plusieurs formes morphologiques, telles que des blastospores, des pseudo-hyphes et des hyphes [112]. Cette plasticité morphologique (dimorphisme) est considérée comme un élément central de la pathogénicité de *C. albicans*. La transition réversible de la levure aux hyphes est largement reconnue comme une arme cruciale dans l'arsenal de *C. albicans* [113].

Les espèces de *Candida* se classent au quatrième rang des agents infectieux les plus courants, responsables de 6,2 % des infections humaines [114, 115]. Parmi celles-ci, *C. albicans* est considérée comme le plus couramment rencontré, provoquant environ 50 à 90 % des infections à *candidose* [116]. Elle est responsable d'environ 700 000 décès par an [117]. La nécessité de lutter contre ces infections, en particulier celles causées par *C. albicans*, est devenue une priorité en raison de l'augmentation des infections graves et de l'émergence de nouveaux troubles associés à *Candida* [118]. *C. albicans* a la capacité de provoquer des infections dans divers environnements physiologiques, tels que la peau, la bouche, ainsi que les voies gastro-intestinales et génito-urinaires. Comparée aux autres espèces de *Candida*, il peut produire des biofilms plus denses [116].

La **Figure 13** illustre la morphologie des *C. albicans* ainsi que les colonies de ces bactéries sur une gélose nutritive utilisée pour le dénombrement.

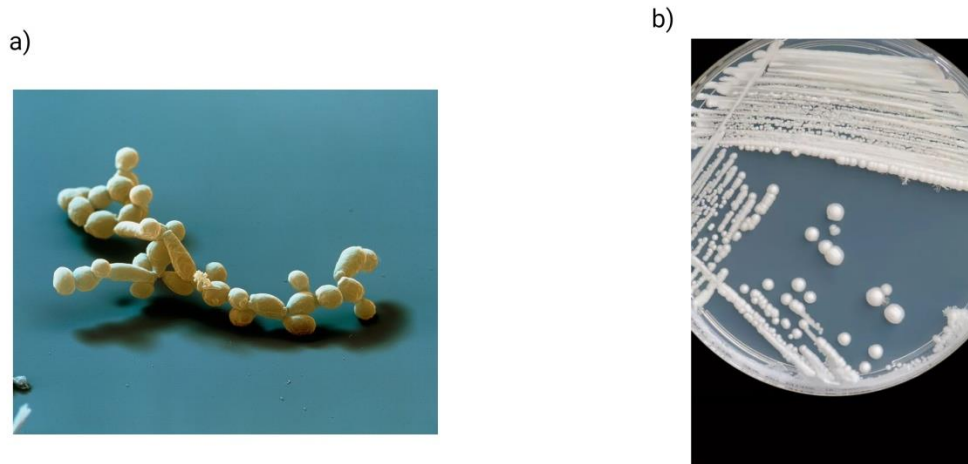


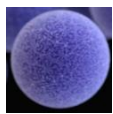



Figure 13: a) Image microphotographie électronique à balayage (MEB) en couleur de cellules du champignon de type levure *Candida albicans* (Science Photo Library) et b) *C. albicans* sur gélose [119].

Le **Tableau 2** résume certaines caractéristiques des microorganismes étudiés dans le cadre de cette étude.

Tableau 2 : Caractéristiques des microorganismes étudiés.

Type de microorganismes	Dimensions	Forme	Composition de la paroi	Présence de membrane externe	Taille du génome
<i>E. coli</i>	L : 1-2 μm l : 0,5 μm	Bâtonnet 	Epaisseur du peptidoglycane = 4 nm.	Oui. Epaisseur = 7 nm	4,5-5,5 Mb
<i>P. aeruginosa</i>	L : 1-5 μm l : 0,5-1 μm	Bâtonnet 	Epaisseur du peptidoglycane = 3 nm.	Oui. Epaisseur = 7 nm	5,5-7 Mb
<i>S. aureus</i>	D : 0,5-1,5 μm	Ronde 	Epaisseur du peptidoglycane = 20-30 nm	Non	2.8 Mb
<i>C. albicans</i>	D : 3-8 μm	Arrondie à ovale 	Epaisseur du glucane = 60-70 nm	Oui. Epaisseur de l'enveloppe protéique externe = 100 nm	16 Mb

L : Longueur ; l : Largeur ; D : diamètre et Mb : Mégabase

La partie suivante traite de manière non exhaustive des biofilms, en abordant leur mécanisme de formation ainsi que les différentes méthodes de prévention.

7. Qu'est ce qu'un biofilm ?

Le biofilm représente une structure complexe de l'agent pathogène, souvent dotée d'une résistance aux produits chimiques étrangers. Ces agrégats microbiens peuvent être de 10 à 10 000 fois moins sensibles aux agents antimicrobiens que l'organisme lui-même en suspension [24]. La formation du biofilm résulte d'un processus systématique complexe, englobant le transport et l'adsorption de particules organiques et inorganiques, ainsi que de microorganismes sur une surface humide. Ensuite, intervient la production d'EPS (Exopolysaccharides) et de biopolymères, jouant un rôle crucial dans le processus de fixation du biofilm [120]. Ces ensembles vivants exhibent une diversité notable dans leur structure et

composition, une variabilité issue précisément de ce processus complexe. Ceci est influencé par divers facteurs tels que les caractéristiques du lieu de formation du biofilm, les conditions environnementales (nutriments, oxygène, surface d'adhésion, stress environnemental, température et pH), ainsi que par les molécules présentes initialement sur la surface. À l'intérieur du biofilm, les bactéries se développent à l'abri des stress environnementaux tels que la dessiccation, les attaques du système immunitaire, l'ingestion par des protozoaires et les agents antimicrobiens [121].

Les biofilms constituent un enjeu majeur dans les industries et les hôpitaux. Selon Agro-media, les biofilms sont responsables de 40% des toxi-infections alimentaires et de 60% des infections nosocomiales en France [122].

Dans les hôpitaux, les biofilms se forment souvent dans les équipements médicaux, tels que les tubes en plastique flexible utilisés dans les cathéters ou les tubes utilisés pour aider les patients à respirer.

7.1. Substances polymériques extracellulaires

Les substances polymériques extracellulaires ou exopolysaccharides bactériens (EPS) sont des biopolymères de poids moléculaire élevé souvent sécrétés par les cellules dans l'environnement extracellulaire [123]. Ces biopolymères jouent un rôle crucial dans la formation et le maintien de l'intégrité structurale du biofilm. Les EPS de la matrice des biofilms sont constitués d'un ou plusieurs des éléments suivants : polysaccharides extracellulaires, ADN et protéines [124].

À l'intérieur de celui-ci, les EPS sont responsables de la cohésion entre les cellules et de leur adhésion au support. Autrement dit, les EPS peuvent être considérés comme étant la colonne vertébrale d'un biofilm prototrophe : il s'agit d'un élément indispensable au développement d'un biofilm puisqu'ils assurent une intégrité structurale et fonctionnelle et sont essentielles de par leurs propriétés physico-chimiques et biologiques [125]. Selon Flemming et al. [126], si les biofilms peuvent être décrits comme une "ville de microorganismes", les EPS représentent alors les "maisons des cellules dans un biofilm".

Les EPS remplissent différentes fonctions bénéfiques pour les bactéries. Certains d'entre eux, caractérisés par des propriétés physico-chimiques précieuses, ont été exploités dans des applications biomédicales. Par exemple, parmi tous les EPS rapportés, la cellulose bactérienne a été la plus étudiée en tant que matériau pour les implants dentaires, les pansements pour plaies

et un substitut cutané temporaire, conduisant à la commercialisation de produits biomédicaux [108, 123].

Pour certaines bactéries, ces polymères sont facteurs de virulence et de pathogénicité. Par exemple l'alginate, qui est un EPS produit par *Pseudomonas aeruginosa*, protège les bactéries contre le processus inflammatoire de l'hôte en évitant les radicaux libres, les anticorps et la phagocytose, aggravant ainsi le pronostic des patients infectés par *P. aeruginosa* [127, 128].

Les EPS forment une matrice extracellulaire (MEC) fortement hydratée. Les MEC sont des réseaux architecturaux tridimensionnels bien organisés et complexes qui jouent un rôle crucial dans l'organisation et la remodelisation des tissus, ainsi que dans la régulation des processus cellulaires [129-131]. Elles sont constituées de deux classes principales de macromolécules : les protéoglycanes (PG) et les protéines fibreuses. Les PG occupent la majeure partie de l'espace interstitiel extracellulaire au sein du tissu sous forme d'un gel hydraté. Les PG ont une grande variété de fonctions qui reflètent leurs propriétés uniques de tamponnement, d'hydratation, de liaison et de résistance à la force [132].

La **Figure 14** représente la structure d'un biofilm.

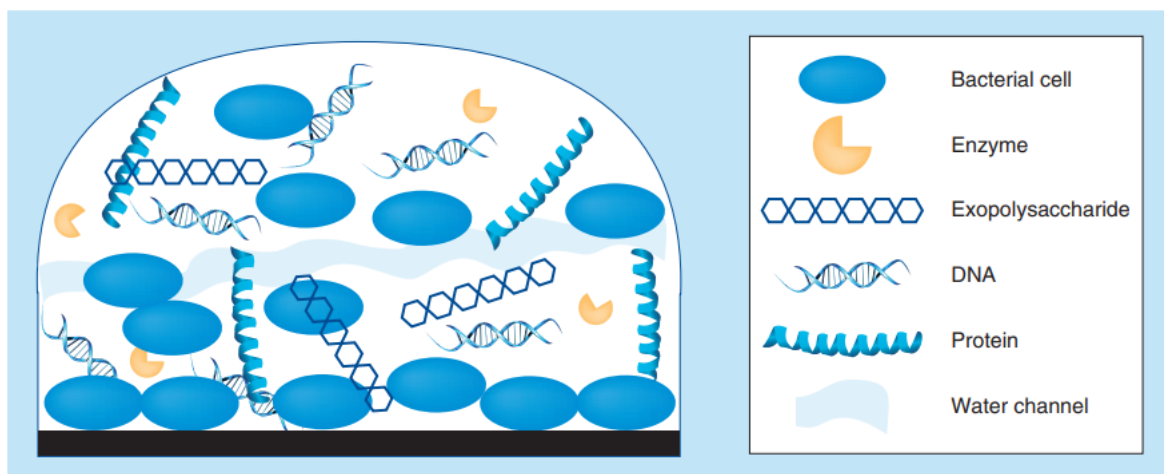


Figure 14: Schéma synoptique de la structure du biofilm.

7.2. Formation des biofilms

La formation d'un biofilm est un processus complexe et multi-étapes qui implique la transition des bactéries d'une forme planctonique libre en nage à une forme sédentaire dédiée à la production de biofilm [133]. Ce développement du biofilm comprend quatre étapes principales, débutant par l'attachement cellulaire, suivi de la formation de microcolonies, puis de la maturation du biofilm, pour finalement aboutir à la dispersion (**Figure 15**).

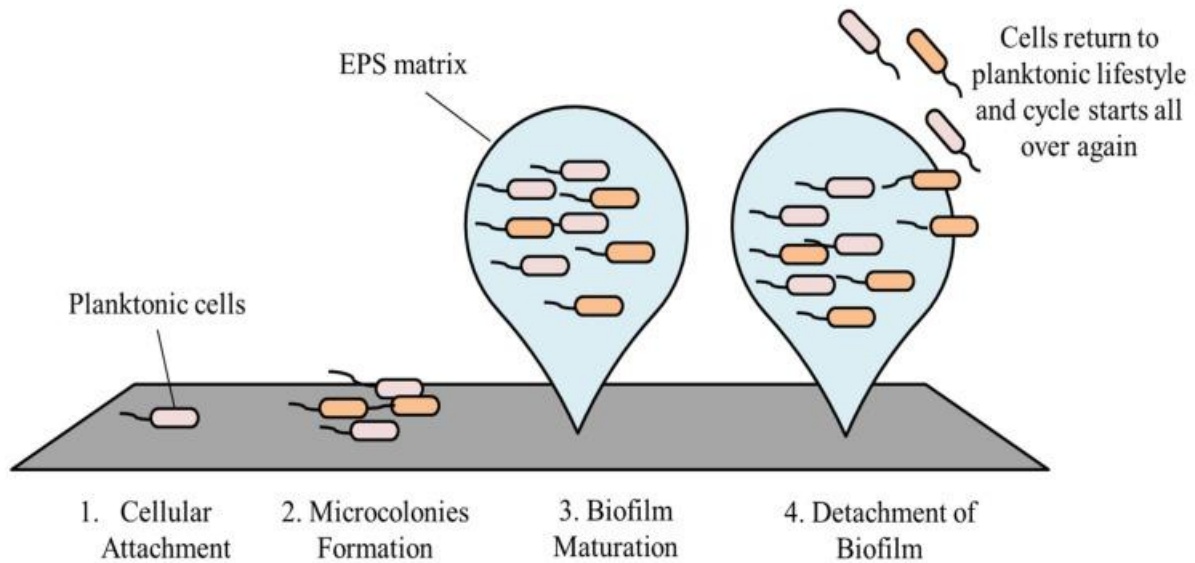


Figure 15: Les différentes étapes de formation d'un biofilm [134].

- 1) Etape de l'attachement : Elle peut être subdivisée davantage en un processus à deux étapes, un attachement initial réversible, suivi d'un attachement irréversible [124]. L'attachement réversible implique le support structurel des microorganismes. Pendant cette étape, différents facteurs tels que la sédimentation, les forces de Van der Waals, les forces hydrodynamiques, les mouvements browniens, ainsi que les interactions électrostatiques ou hydrophobes jouent un rôle dans l'attachement des microorganismes [135, 136]. Les cellules microbiennes s'attachent à la surface en utilisant leurs appendices telles que les pili et les flagelles [134, 137-138]. Lors de l'attachement réversible, les microorganismes sont faiblement liés à la surface et conservent une mobilité grâce au mouvement brownien. À ce stade, ils peuvent être facilement éliminés par des forces de cisaillement, telles que le rinçage. L'étape de l'attachement irréversible est atteinte lorsque les microorganismes sont solidement fixés à la surface de manière permanente, rendant leur détachement difficile sans recourir à des méthodes plus énergiques, telles que le grattage ou l'utilisation de nettoyants chimiques. Cette augmentation de la durabilité de la liaison des bactéries à la surface est facilitée par des mécanismes tels que la production de substances polymériques et/ou de ligands spécifiques tels que les pili ou les fimbriae qui peuvent se complexer avec la surface [137]. Cette étape est cruciale pour la formation du biofilm. Les micro-organismes ont une propension plus marquée à adhérer aux surfaces hydrophobes et non polaires, telles que le téflon et d'autres plastiques, que sur des surfaces hydrophiles et polaires, comme les métaux et le verre.

- 2) Formation de microcolonies : Une fois que les cellules se sont attachées de manière irréversible à la surface, elles commencent à former des agrégats appelés microcolonies. Ces microcolonies sont constituées de cellules de microorganismes qui se multiplient et s'accumulent, formant progressivement une masse plus dense. Au sein des microcolonies, les cellules entrent en contact étroit les unes avec les autres, favorisant les interactions cellulaires et la communication intercellulaire. Ces interactions sont facilitées par la production d'exopolysaccharides. La motilité, dirigée par les flagelles et les pili de type IV, joue un rôle crucial dans les interactions entre les micro-organismes et les surfaces, ainsi que dans la formation d'agrégats cellule-cellule pour constituer des microcolonies, respectivement [124, 133].
- 3) Maturation des biofilms : Une fois que les microcolonies se sont formées, la maturation du biofilm implique la croissance continue des agrégats cellulaires et le renforcement de la matrice extracellulaire (EPS). À ce stade du développement du biofilm, les EPS forment une structure tridimensionnelle et sont responsables de son maintien [134, 139, 140]. L'augmentation de la densité de la population favorise une communication intercellulaire plus étroite. La communication diffère entre les bactéries Gram-positives et Gram-négatives. Chez les bactéries Gram-positives, la communication cellule-cellule est principalement médiée par des autoinducteurs protéiques (AIPs, peptides auto-inducteurs), qui sont générés lors de la dégradation de précurseurs protéiques plus importants [140]. Les EPS facilitent la communication entre les cellules et la dégradation de substances. En effet, au sein du biofilm, les EPS retiennent les molécules de signalisation du quorum sensing (QS), les enzymes extracellulaires et les produits métaboliques [141].
- 4) Dispersion des biofilms : La dispersion du biofilm est cruciale pour permettre aux microorganismes de se libérer et de coloniser de nouveaux environnements lorsque les nutriments deviennent limités et que les déchets s'accumulent. Diverses stratégies sont utilisées pour favoriser la dispersion du biofilm, notamment la cessation de la synthèse des composants de la matrice du biofilm, la dégradation de la matrice, ainsi que la perturbation des interactions non covalentes entre les différents éléments de la matrice [142]. En plus des facteurs exogènes, la dispersion requiert que les microorganismes du biofilm produisent directement des enzymes dégradant la matrice, telles que l'alginate lyase, la glycosyl hydrolase PslG, ou la bêta-N-acétylglucosaminidase [143].

7.3. Communication cellulaire (Quorum sensing)

Les biofilms jouent un rôle crucial dans la régulation de la densité de population grâce à un mécanisme de signalisation connu sous le nom de communication cellulaire, ou quorum sensing (QS). Le QS est un phénomène de communication cellulaire où des molécules de signalisation sont excrétées dans l'environnement extracellulaire et s'accumulent avec l'augmentation de la densité de population. Lorsqu'un seuil de réponse est atteint, les signaux se lient aux récepteurs et régulent l'expression génique ainsi que les activités physiologiques à travers une série de réactions en cascade [144, 145]. Les molécules de signalisation, appelées autoinducteurs, sont continuellement produites par les bactéries, et leur concentration critique est atteinte lorsque la densité cellulaire spécifique, appelée niveau de quorum, est atteinte. Cette modulation génique coordonnée permet aux bactéries du biofilm d'activer certains gènes tout en réprimant d'autres, synchronisant ainsi leurs activités.

On pourrait se questionner sur le moment où la densité bactérienne atteint le seuil permettant à la signalisation QS de participer à la régulation du biofilm. L'étape initiale d'adhésion semble intuitivement inappropriée pour l'accumulation des signaux de quorum, car elle implique des bactéries qui nagent librement dans le milieu. C'est plus tard, lorsqu'elles sont attachées, se divisent et forment des microcolonies, que la densité de population augmente, permettant ainsi aux signaux de quorum d'atteindre des niveaux suffisants pour activer de manière coordonnée la maturation et le démantèlement du biofilm [121].

La régulation de l'expression génique par le QS confère aux bactéries du biofilm une réponse unifiée, renforçant la cohésion au sein de la communauté bactérienne. Cette coordination bénéfique contribue au maintien d'une taille optimale du biofilm, à la coordination des phénotypes de virulence et à une adaptation efficace aux changements environnementaux.

La **Figure 16** présente les structures des autoinducteurs et illustre le quorum sensing.

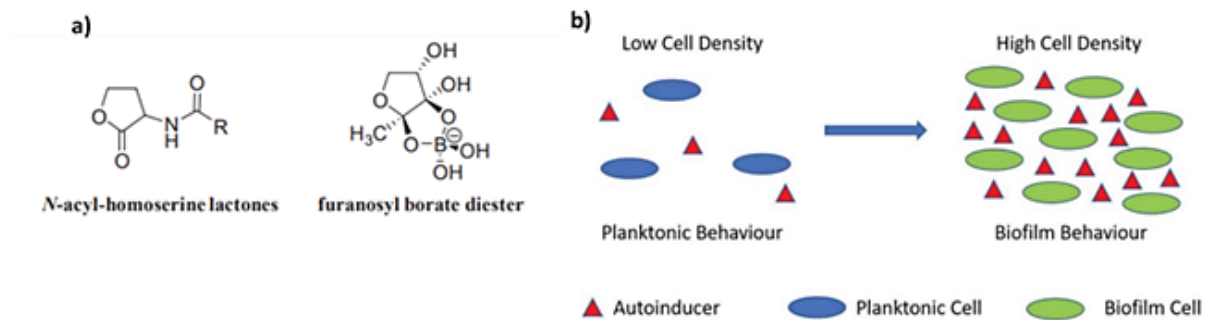


Figure 16: a) Les autoinducteurs de petite taille prédominante impliqués dans le quorum sensing et b) Illustration du quorum sensing.

Pendant la croissance planctonique (ovales bleus), la quantité relative d'autoinducteurs (triangles rouges) est proportionnellement faible. Lorsque les cellules entrent dans un mode de croissance densément peuplé (ovales verts), la proportion relative d'autoinducteurs augmente [146].

La **Figure 17** illustre des biofilms des microorganismes précédemment abordés. La **Figure 17-e)** est un exemple clair d'un biofilm situé à la surface d'un étang boisé stagnant, montrant une déchirure ou une "fracture" distincte dans la couche de biofilm. Elle illustre clairement comment les biofilms peuvent former des couches sur l'eau, interagissant à la fois avec le microenvironnement sous-marin et l'atmosphère extérieure.

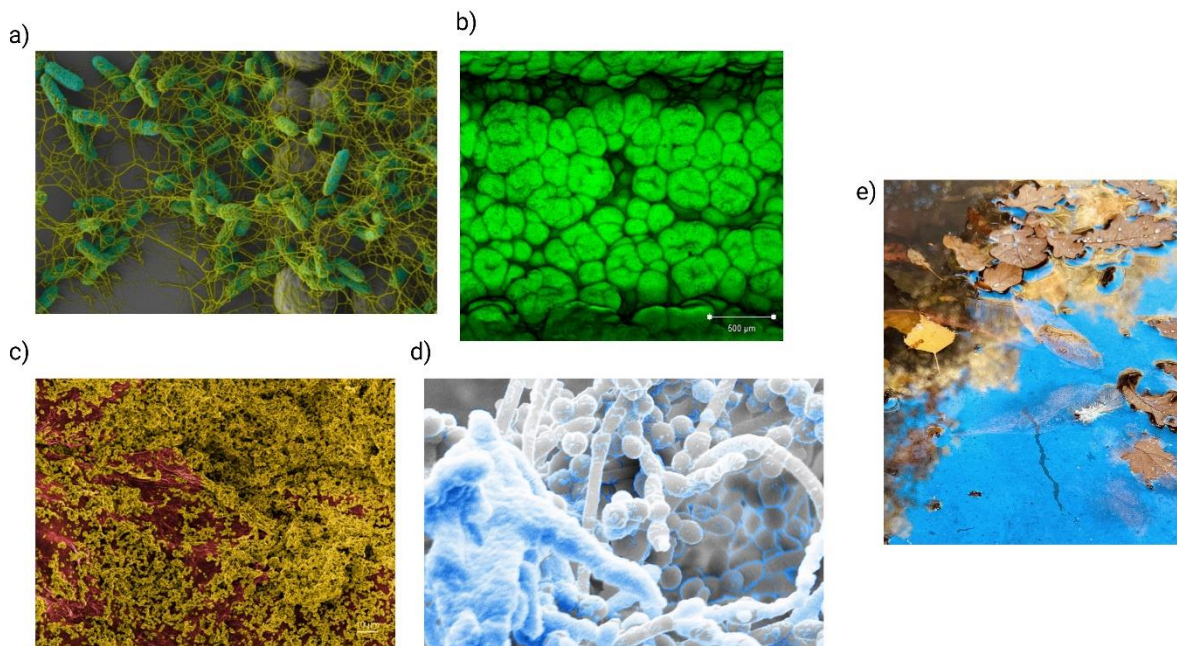


Figure 17: a) Cliché microscopie électronique à balayage (MEB) d'un biofilm d'*E. coli* [147] ; b) Image par microscopie confocale d'un biofilm de *P. aeruginosa* (PAO1W) formé à la surface d'un dispositif de cathéter urinaire en silicone (Biofilm Image Gallery NBIC) ; c) MEB d'un biofilm de *S. aureus* USA300 (MRSA) sur la peau (Biofilm Image Gallery NBIC) ; d) MEB d'un biofilm de *C. albicans* [148] et e) "Biofilm fracturé" (Biofilm Image Gallery NBIC).

7.4. Les antibiofilms

La formation de biofilm pose un défi considérable dans différents secteurs, incluant des problématiques telles que la corrosion industrielle et l'encrassement biologique, jusqu'aux infections chroniques et nosocomiales. Le mode de vie du biofilm est associé à une tolérance élevée au stress extérieur, et l'usage d'antibiotiques ou d'autres agents biocides se révèle généralement inefficace pour leur éradication [149]. Les biofilms sont estimés être 10 à 1000 fois plus résistants aux antibiotiques conventionnels que les bactéries planctoniques (libres dans le milieu) [150].

Plusieurs mécanismes permettent de l'expliquer [151] :

- Faible pénétration des molécules à l'intérieur du biofilm, liée aux propriétés physico-chimiques de la matrice extracellulaire
- Différents stades métaboliques à l'intérieur du biofilm, notamment métabolismes altérés
- Présence de cellules persistantes

- Surexpression de mécanismes de résistance et de gènes spécifiques
- Tolérance à la phagocytose et au système immunitaire

En principe, deux approches distinctes sont envisageables pour traiter les biofilms, à savoir les prévenir de se former ou les éliminer une fois formés [152]. Dans cette étude, notre concentration se porte principalement sur la première approche.

Des modifications de surface qui impriment des motifs 3D spéciaux ou confèrent des propriétés physicochimiques comme l'hydrophobicité de surface ont été signalées pour réduire l'attachement [152]. Selon une nouvelle étude menée à l'Université de Texas à Austin par l'assistante-professeure Vernita Gordon, les bactéries détectent un signal de cisaillement mécanique, qui est une sorte d'étirement se produisant lorsqu'une bactérie est attachée à une surface et que le liquide environnant se déplace et/ou s'écoule. Elle suggère l'existence d'une troisième classe de surface de prévention de biofilm qui module la mécanique de la surface de sorte que les bactéries ne reçoivent jamais le signal indiquant qu'elles sont attachées et ne commencent jamais à fabriquer un biofilm [153].

La **Figure 18** est une représentation schématique des différentes stratégies actuellement utilisées pour concevoir des surfaces nanostructurées avec des propriétés anti-biofilm.

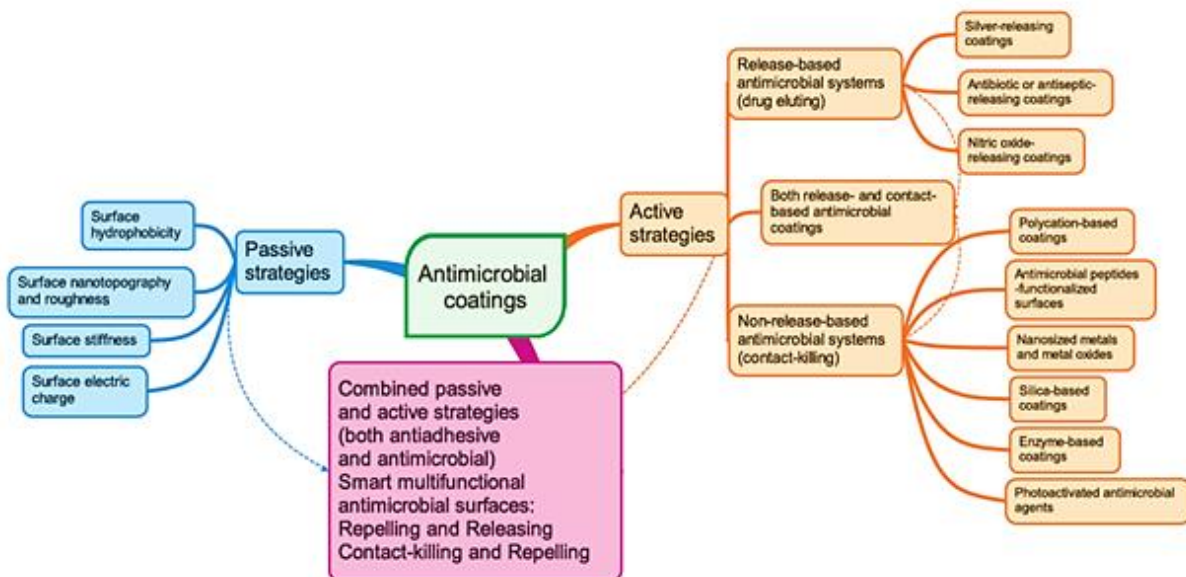


Figure 18: Représentations schématiques des différentes stratégies actuellement utilisées pour concevoir des surfaces nanostructurées avec des propriétés anti-biofilm [154].

L'approche passive antibiofilm vise le stade d'attachement du cycle de vie du biofilm, cherchant à prévenir la colonisation de la surface en atténuant les forces non covalentes intermoléculaires développées lors de l'adhésion initiale non spécifique et réversible des biofilms aux surfaces biotiques ou abiotiques, sans toutefois causer la mort des bactéries. En contraste, les stratégies actives antibiofilm visent à éliminer activement les bactéries plutôt qu'à simplement prévenir leur adhésion à la surface.

La section suivante clôture ce chapitre en abordant les aspects généraux des peintures, ainsi que leur utilisation en tant que revêtements antimicrobiens.

8. Généralité sur les peintures

8.1. Définition

Conformément au glossaire technique des peintures et des travaux d'application, la peinture est définie comme un produit liquide ou en poudre, renfermant des pigments, et destiné à être appliqué sur une surface en vue de former un revêtement opaque doté de qualités protectrices, décoratives ou techniques spécifiques [155]. Elle est tout matériau liquide qui, après séchage, se transforme en un film mince, opaque ou transparent, adhérant bien sur le substrat.

Les systèmes de peinture peuvent être regroupés en 5 catégories, à savoir : peintures en poudre thermodurcissable, peintures à dispersion aqueuse (peintures en émulsion), peintures à dispersion non aqueuse, peintures qui durcissent sous rayonnement UV en présence de photo-initiateurs, et peintures sans solvant et à faible teneur en solvant (à haute teneur en solides).

8.2. Constituants d'une peinture et leurs rôles

a) Le liant ou la résine

Le liant joue un rôle crucial en assurant la cohésion entre les différents composants de la peinture, tels que les pigments et les charges, tout en favorisant leur adhérence à la surface sous-jacente. Les propriétés physiques du film de peinture, telles que sa résistance aux intempéries, à l'usure, aux produits chimiques et aux solvants, dépendent largement des caractéristiques du liant. Ces liants peuvent être des polymères ou des macromolécules d'origine naturelle ou synthétique, pouvant adopter des formes liquides, visqueuses, voire solides. Ce sont des composés organiques ou minéraux dont les masses moléculaires varient entre 300 et 10^6 daltons. Le liant demeure l'élément prédominant dans la composition de la peinture, et il existe

une diversité de types de peintures, classées généralement en fonction du liant principal, comme l'alkyde, l'acrylique, le polyester, la nitrocellulose, l'époxy et les peintures à base d'huile [156].

b) Le solvant

Le solvant a pour fonction de dissoudre tous les constituants de la peinture et de la maintenir sous forme liquide, facilitant ainsi son application. Grâce à sa faible viscosité, il permet de régler la viscosité de la peinture pour en faciliter l'application et contrôler son écoulement. Son rôle est essentiel dans la formation du film, influent le temps de séchage et le point d'éclair. Le point d'éclair est la température minimale à laquelle un produit placé dans un vase clos doit être chauffé pour que les vapeurs émises s'enflamment au contact d'une flamme, et cela dans des conditions opératoires normalisées (NF EN 456 ou ISO 3679). Après l'application, le solvant s'évapore, ne faisant ainsi pas partie du film de peinture solide une fois séché. Le solvant peut être organique ou de l'eau [157].

c) Les pigments

Ils sont ajoutés pour conférer à la peinture la teinte souhaitée. Le TiO_2 est le pigment le plus utilisé [158-161].

d) Les additifs

Ils sont incorporés à faible dose (0,01 % à 5% v :v) pour y développer certaines propriétés propres, à en améliorer soit les conditions de fabrication et/ou de conservation et/ou d'application, soit certaines propriétés spécifiques. Ils peuvent englober un dispersant, un stabilisant, un coalescent, un épaississant, un régulateur de pH, un antimousse, un agent mouillant, un émulsifiant, un biocide, un agent d'amélioration et/ou de contrôle des propriétés d'écoulement, un agent d'amélioration de l'aspect final, un agent d'augmentation du bord mouillé, etc.

- Antimousse

L'utilisation d'une très petite quantité d'agents antimousse efficaces est bénéfique pour inhiber ou soulager divers problèmes courants liés aux revêtements, tels que [162].

- L'augmentation de la viscosité et la diminution du pouvoir de cisaillement mécanique pendant le processus de broyage, entraînant ainsi des tailles de lot plus petites et une mauvaise qualité de la dispersion pigment/polymère en émulsion.

- L'augmentation du volume pendant les étapes de dilution et de mélange, entraînant un débordement.
- Des débits de remplissage de l'emballage plus lents en raison d'un pompage inefficace. L'incorporation d'air dans les systèmes de revêtement pendant le transport et la manipulation.
- Des vitesses d'impression plus lentes sur presse ou des pressions plus faibles lors de la pulvérisation.
- Certains défauts de surface sur les substrats revêtus de polymère, entraînant une mauvaise apparence, une réduction du brillant et une moindre protection des substrats.
- Epaississant

Un agent épaississant augmente la viscosité de la phase aqueuse sans s'associer significativement aux autres ingrédients [163].

- Biocide

Les biocides sont des composés ajoutés à faible concentration dans les peintures pour freiner le développement des microorganismes. Ils contribuent à augmenter la longévité des revêtements en prévenant la dégradation biologique des surfaces, tout en conférant des propriétés antimicrobiennes aux matériaux protégés.

8.3. Physico-chimie des peintures

- **La concentration pigmentaire volumique CPV** : définit le rapport des volumes de matières pulvérulentes contenu dans le produit par la valeur de l'extrait sec. Elle rend compte, par définition, non pas strictement de la concentration de la pigmentation mais de l'ensemble « pigments – matières de charge » qui sont inclus dans la définition des matières pulvérulentes et s'exprime par la relation :

$$CPV \text{ (en \%)} = \frac{\sum_i V_{pi}}{\sum_i V_{pi} + \sum_j V_{LS}} \times 100 \quad (14)$$

Où V_{pi} est le volume de chacune des matières pulvérulentes et V_{LS} est le volume du liant sec.

- **La concentration pigmentaire volumique critique CPVC** : est une valeur particulière de la CPV pour laquelle le liant remplit très exactement le volume laissé disponible entre les particules de matières pulvérulentes supposées au contact et à partir de laquelle certaines propriétés physico-chimiques sont notablement modifiées.

Si :

- $CPV < CPVC$: la quantité de liant est non seulement suffisante pour enrober la totalité des particules pulvérulentes et remplir les « vides » qui existent entre elles, mais elle est même excédentaire ;
- $CPV = CPVC$: la quantité de liant est juste suffisante pour remplir le volume laissé disponible entre les particules de matières pulvérulentes supposées au contact ;
- $CPV > CPVC$: la quantité de liant est insuffisante pour remplir la totalité des vides existant entre les particules de matières pulvérulentes. Dès lors, on obtient un feuil hétérogène contenant des agglomérats, lesquels favorisent sa porosité.

Le rapport $CPV/CPVC$ est appelé concentration pigmentaire volumique réduite et est noté Λ .

8.4. Rhéologie des peintures liquides

La caractérisation des écoulements des peintures s'opère selon trois catégories: newtonien, pseudoplastique et thixotrope. L'évaluation de ces comportements spécifiques peut être réalisée conformément aux normes ISO 2884-1 et ISO 2884-2. La **Figure 19** présente les comportements rhéologiques des différents types d'écoulement des peintures.

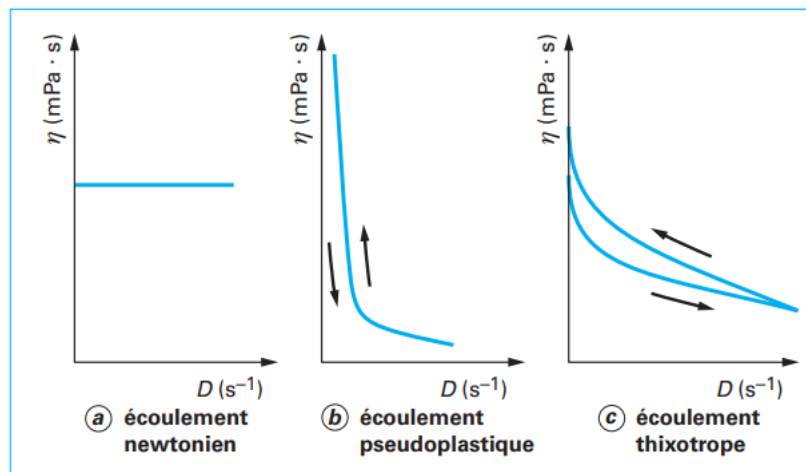


Figure 19: Comportement rhéologique des peintures [164].

L'écoulement pseudoplastique offre des avantages en termes d'application et de stockage. En effet, à des niveaux élevés de contrainte de cisaillement, la viscosité diminue, ce qui améliore l'applicabilité du matériau.

8.5. Adhésion et adhérence

L'interaction entre les surfaces de l'adhérant et de l'adhéré est principalement déterminée par la physico-chimie. Ces interactions jouent un rôle essentiel dans la cohésion du système global "adhérant/adhéré". L'adhésion peut résulter d'un ancrage mécanique, où le polymère est physiquement ancré dans les pores et/ou les aspérités du support. Elle peut également avoir une origine chimique, impliquant des liaisons chimiques covalentes entre le polymère et le substrat. Les forces de valence, les forces de Van der Waals et les liaisons hydrogène sont les principales forces chimiques susceptibles d'intervenir dans les mécanismes complexes d'adhésion. La diffusion joue un rôle lorsque deux zones interfaciales polymères sont en contact, permettant la diffusion mutuelle des chaînes macromoléculaires à condition qu'elles aient une certaine mobilité. L'adhésion peut également être électrostatique ou résulter de la création d'une couche de faible cohésion. Elle peut être thermodynamique, réduisant la tension superficielle.

La peinture peut être appliquée de différentes manières, notamment par pulvérisation à haute pression avec air comprimé ou chargement électrostatique, par immersion automatique (comme le procédé de revêtement par immersion), ainsi que par l'utilisation de rouleaux. Le séchage des couches de peinture peut s'effectuer à l'air libre ou dans un four. Dans le cas des peintures à base d'eau, la formation du film est réalisée par coalescence, c'est-à-dire par la fusion des particules entre elles sous l'action des forces capillaires lors de l'évaporation de l'eau. Ce phénomène se produit uniquement lorsque la température d'application est égale ou supérieure à la température de formation du film (TMFF).

8.6. Industrie des peintures et des biocides

Les environnements aqueux favorisent la croissance et la survie de micro-organismes tels que les bactéries, les champignons et les levures. Par exemple, l'encrassement biologique en milieu marin constitue l'un des problèmes majeurs auxquels sont actuellement confrontées les technologies marines [165].

Cet encrassement peut entraîner de nombreux inconvénients, telles que l'accumulation de gaz et d'odeurs désagréables dans les peintures, les adhésifs et les systèmes connexes, les dommages ou la perte de performances des équipements de traitement, l'amincissement et la séparation des phases, ainsi que la décoloration.

Pour résoudre ces problèmes, les biocides ont été utilisés dans les peintures pendant un certain temps, jusqu'à leur interdiction par la loi (Directive sur les produits biocides 98/8/CE) en raison

de leur écotoxicité et de leur propension à la lixiviation. Ensuite, ils ont rapidement été remplacés par des biocides organiques [166, 167].

Actuellement, les dérivés de l'isothiazolinone sont utilisés comme alternatives pour la conservation en boîte et en film sec, notamment la 1,2-benzisothiazolin-3-one (BIT), la 2-méthylisothiazol-3(2H)-one (MIT), la 2-octyl-2H-isothiazol-3-one (OIT), la 5-chloro-2-méthyl-4-isothiazolin-3-one (CMIT) et la 4,5-dichloro-2-n-octyl-3(2H)-isothiazolone (DCOIT). Cependant, les observations de réactions allergiques cutanées à un type spécifique d'isothiazoline, le MIT, ont conduit à sa classification en tant que sensibilisant cutané et à une réduction de sa concentration admissible en dessous de 15 ppm selon le Comité d'évaluation des risques (RAC) de l'Agence européenne des produits chimiques (ECHA) [168].

Les nanomatériaux ont été envisagés comme une solution aux défis liés aux biocides biodégradables et écotoxiques [169]. Aujourd'hui, ces nanomatériaux sont utilisés pour améliorer l'efficacité et introduire de nouvelles fonctionnalités dans les peintures. Plusieurs peintures améliorées par l'incorporation de nanomatériaux sont déjà disponibles sur le marché. Actuellement, le dioxyde de titane (TiO_2) et le dioxyde de silicium sont les nanomatériaux les plus couramment utilisés dans les peintures. Toutefois, de nombreuses études dans la littérature scientifique explorent le potentiel des nanoparticules de ZnO [170], [171], CuO [172], Ag [173], [174], [175] et Mg [176] en tant qu'additifs antimicrobiens dans les peintures.

Les avancées récentes dans le secteur des peintures incluent la peinture résistante aux intempéries, la peinture écologique, la peinture inodore, la peinture antibactérienne, et la peinture antifouling. Depuis l'apparition du COVID-19 au début de 2020, la peinture antivirale a émergé et a ouvert le potentiel de ce marché au moins jusqu'en 2025 [177]. Parmi les tendances actuelles en matière d'innovation dans le domaine des peintures antibactériennes, il y a la technologie des ions d'argent ; les peintures à base de cuivre ; les peintures purificatrices d'air. La société Onip a mis sur le marché des peintures traitées par des ions d'argent présents dans la composition des peintures, agissant comme agent antibactérien. La technologie des ions de cuivre fournit une activité désinfectante aux peintures, éliminant 99,9 % des bactéries et des virus dans les deux heures suivant le contact avec une surface peinte. Un exemple en est l'additif Corning® Guardian® de la société Corning. Par ailleurs, la société française MetalSkin Medical a développé une peinture antibactérienne à froid, formulée avec un alliage de cuivre à plus de 90 % et des polymères, d'une épaisseur d'environ 200 μm .

La mise sur le marché européen de biocides ou de composés ayant des effets biocides est réglementée pour l'environnement conformément au règlement UE 528/2012 (règlement sur les produits biocides) [178]. Par la décision du 28 mai 2014, la Commission européenne a établi les critères pour l'attribution du label écologique de l'UE aux peintures et vernis d'intérieur et d'extérieur [179].

Chapitre 2

Matériel et Techniques expérimentales

Ce chapitre constitue une présentation approfondie des différentes techniques analytiques utilisées dans le cadre de cette étude. Il débute par une présentation des protocoles utilisés pour la synthèse des nanoparticules de ZnO et l'élaboration des couches minces. Ensuite, la caractérisation des matériaux est décrite à travers divers techniques, notamment la diffraction des rayons X (DRX), la microscopie électronique à transmission (MET), la microscopie électronique à balayage (MEB), la spectroscopie Raman (IR-Raman), la microscopie à force atomique (AFM) et la spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier (FTIR). La conservation et la culture des souches microbiennes sont ensuite abordées, suivies des tests biologiques, comprenant la détermination des Concentration Minimale Inhibitrice et Bactéricide (CMI et CMB), la mesure des cinétique de croissance microbienne, le Time-Kill Test, la mesure de l'activité antimicrobienne des surfaces et l'analyse de la cytotoxicité.

1. Synthèse des nanoparticules de ZnO

• *Matériel*

Le matériel utilisé pour la synthèse des NPs comprend l'acétate de zinc dihydraté ($\geq 99\%$), le butanol ($\geq 99,5\%$), l'acétone ($\geq 99,5\%$), provenant de Sigma-Aldrich, et l'isopropanol ($\geq 99,5\%$) et le méthanol ($\geq 99,5\%$) provenant d'Acros Organics. La monoéthanolamine (MEA) pure (100%) fournie par Emprove est également utilisée.

Le protocole de synthèse des NPs de ZnO est inspiré de celui développé par L.Znaidi et al. avec quelques modifications [180]. Le mécanisme réactionnel est détaillé au paragraphe 5.3. du *Chapitre 1*.

• *Dispositif expérimental*

Le dispositif expérimental est constitué d'un ballon réactionnel immergé dans un bain d'huile de silicone, qui assure le maintien en température. Le ballon est surmonté d'un réfrigérant pour éviter la perte de solvant par évaporation. L'ensemble est placé sur un agitateur magnétique chauffant, qui assure l'agitation du milieu réactionnel et le chauffage. Le dispositif expérimental est présenté sur la **Figure 20**.

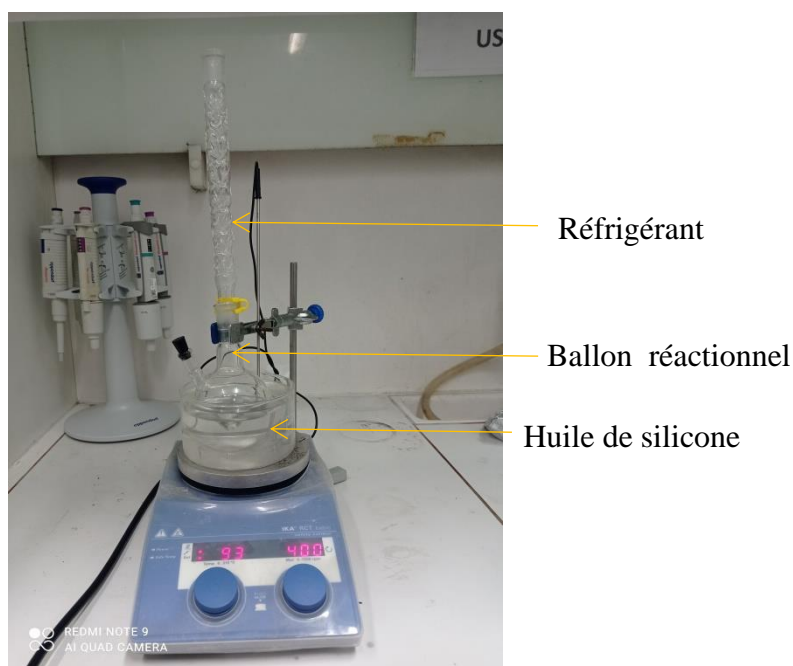


Figure 20 : Dispositif expérimental pour la synthèse de nanoparticule de ZnO.

- ***Etapas de la synthèse***

Dans le ballon réactionnel contenant 100 mL d'alcool (butanol, éthanol ou propanol), de l'acétate de zinc dihydraté est ajouté sous agitation, avec une concentration en zinc de 0,1 M. Une solution laiteuse se forme. Après une première phase d'agitation, le MEA est ajouté au mélange en tant qu'agent chélatant pour faciliter la dissolution de l'acétate de zinc dans l'alcool [181], rendant ainsi la solution parfaitement translucide. Le MEA agit également comme une base faible.

Après 30 minutes d'agitation, l'eau distillée est ajoutée au mélange pour favoriser la formation de NPs de ZnO et leur récupération sous forme de poudre. L'ajout de l'eau catalyse les réactions d'hydrolyse et de condensation, aidé par une température de synthèse légèrement élevée, variant entre 70°C et 110 °C. Un mécanisme de formation des NPs de ZnO est proposé dans le chapitre bibliographique de ce document.

Le protocole de synthèse de nanopoudres de ZnO est illustré sur la **Figure 21**.

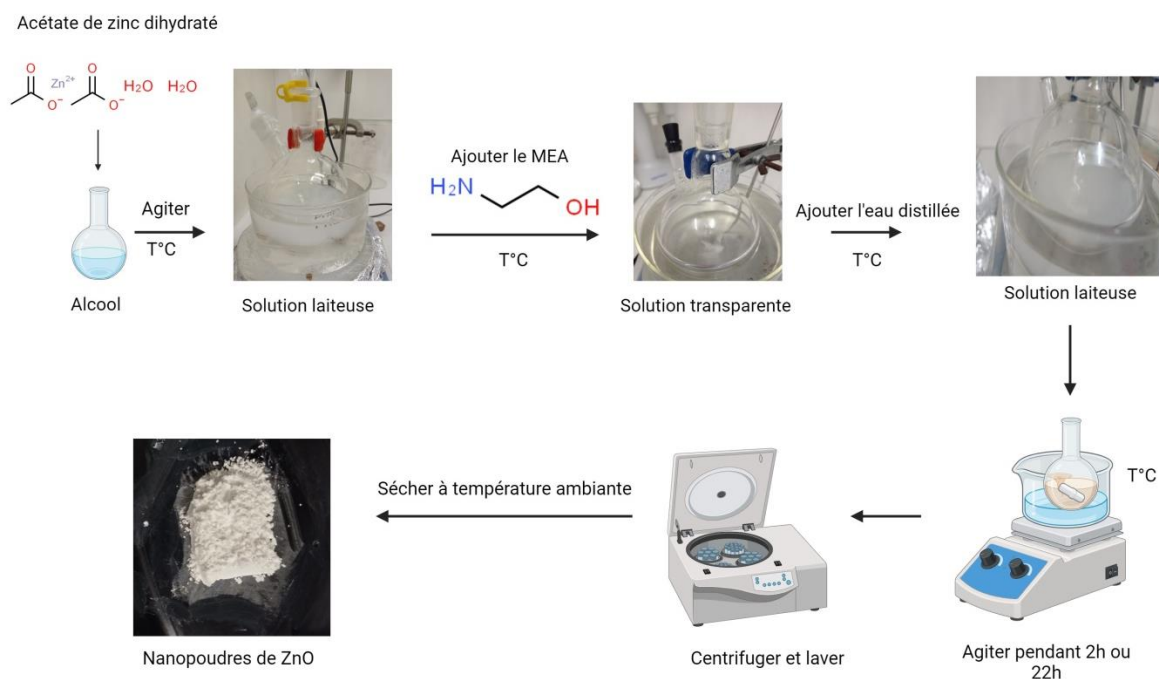


Figure 21 : Illustration schématique de synthèse des nanopoudres de ZnO

Afin d'explorer l'impact de la taille des nanoparticules de ZnO sur leur activité antimicrobienne, il est essentiel d'obtenir des suspensions stables dans un milieu aqueux. La section suivante décrit la méthodologie employée pour élaborer une dispersion homogène et stable des nanoparticules, en s'appuyant sur l'utilisation d'agents dispersants spécifiques.

2. Elaboration d'une dispersion stable de nanoparticules de ZnO

Les recherches sur l'impact de la taille des NPs de ZnO sur leur activité antimicrobienne sont menées dans un milieu aqueux, au sein duquel les NPs ont tendance à s'agglomérer et à sédimenter en raison de leur haute énergie de surface. Pour remédier à ce problème, une stratégie a été employée pour obtenir des suspensions de NPs de ZnO stable dans les milieux aqueux.

Ces dernières années, différentes stratégies ont été explorées pour améliorer la stabilité des NPs de ZnO et permettre leur dispersion dans les milieux aqueux [182, 183]. Les travaux de Luo et al. [183] ont démontré l'efficacité du tensioactif polymérique anionique, le polyacrylate de sodium (PAAS), dans la dispersion des NPs de ZnO en raison de la répulsion électrostatique et de l'obstacle stérique provenant de sa structure. L'enrobage de surface des NPs de ZnO réduit leur taille d'agrégat, augmente leur surface spécifique et améliore leur interaction avec la surface des champignons *Trichoderma viride*. Dans cette étude, nous avons examiné la

stabilité de suspension NPs de ZnO en utilisant le polyacrylate de sodium (PAAS) en tant qu'agent de dispersion.

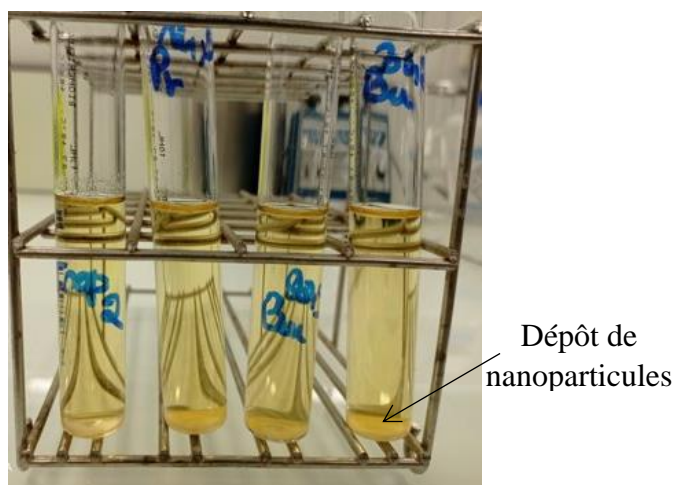


Figure 22 : Dépôt des nanoparticules dans le milieu de culture des microorganismes, sans l'ajout d'un dispersant.

La stérilité des poudres de NPs a été évaluée et présentée en **Annexe 1**.

Le protocole de dispersion est inspiré de celui développé par Luo et al. [183], avec quelques légères modifications. De la poudre de NPs, représentant 2% du poids total, est dispersée dans un milieu aqueux en présence de 0,4% en poids de dispersant. Le mélange est ensuite soumis à une sonication à 240 watts dans un bain à ultrasons J.P. Selecta à 60°C et 40 Khz pendant 40 minutes.

3. Elaboration et dépôt de couches minces de ZnO par dip-coating

Les couches minces de ZnO sont déposées à partir d'une solution colloïdale en utilisant la technique du dip coating. Le protocole de préparation est détaillé ci-dessous :

- **Préparation de solutions colloïdales de ZnO**

Des solutions à des concentrations de 0,1 M, 0,25 M et 0,4 M ont été préparées en dissolvant la quantité requise d'acétate de zinc dihydraté $[Zn(CH_3COO)_2, 2H_2O]$ dans 100 ml de propanol en présence de MEA, avec un rapport $[Zn^{2+}]/[MEA]$ de 1:1. À la concentration de 0,25 M, des préparations supplémentaires ont été réalisées dans du butanol et de l'éthanol.

Le **Tableau 3** résume les différentes conditions de synthèse utilisées pour préparer les échantillons.

Tableau 3: Récapitulatif des conditions de synthèse des échantillons.

Alcool	Concentration	Nomenclature
Propanol	0,1 M	0,1 M Propanol
	0,25 M	0,25 M Propanol
	0,4 M	0,4 M Propanol
Butanol	0,25 M	0,25 M Butanol
Ethanol	0,25 M	0,25 M Ethanol

- **Agitation et vieillissement des solutions**

Les mélanges finaux sont agités à 60°C pendant 2 heures pour assurer une bonne dissolution du précurseur et initier les réactions d'hydrolyse et de condensation, produisant ainsi des solutions transparentes et homogènes. Ensuite, les solutions sont laissées à vieillir pendant 24 heures dans une boîte à gants à atmosphère contrôlée ($[O_2]$ et $[H_2O] < 0,5$ ppm) avant d'être utilisées comme solutions de revêtement. Cette étape de vieillissement est importante car elle influence sur la qualité et les propriétés finales des films [184, 185]. Le faible niveau d'oxygène et d'eau dans la boîte à gants empêche la précipitation des solutions colloïdales.

- **Traitement des substrats**

Les films minces de ZnO ont été déposés sur des substrats de verre standard (FEA, Microscope slides ground Edges Plain, FEA Industries Inc., Morton, PA, US) mesurant 76 x 25 mm. Avant le dépôt des films, les substrats en verre ont été immergés dans une solution d'acide sulfurique à 98 % (H_2SO_4) pendant 4 jours. Ensuite, ils ont été rincés avec de l'eau distillée trois fois, jusqu'à ce que le pH atteigne 7. Enfin, les substrats ont été séchés dans une étuve pour assurer une bonne adhérence des films minces.

Le traitement des substrats en verre par l'acide sulfurique permet d'hydrolyser les groupes -Si-O-Si-O-Si- du substrat. Cela augmente la densité surfacique des fonctions Si-OH, nécessaires à la réalisation des liaisons covalentes entre les Zn-oxo-acétate et le substrat. Ces liaisons covalentes, en raison de leur solidité, assurent non seulement une adhésion efficace des films au substrat, mais aussi leur résistance mécanique, améliorant ainsi leur durabilité et leur résistance au fil du temps. La **Figure 23** illustre le mécanisme de fixation des particules sur le substrat.

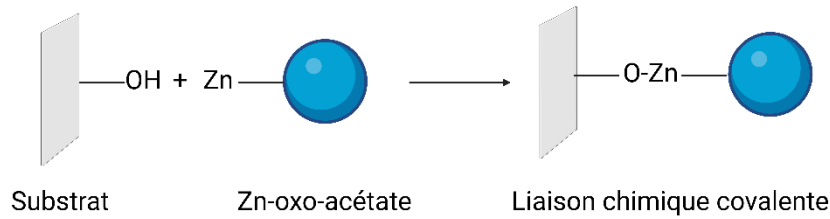


Figure 23 : Mécanisme de fixation des nanoparticules sur le substrat.

Dépôt des films minces

Les films sont déposés à une vitesse de dépôt de 5 cm/min par un dipcoateur KSV NINA dans la boîte à gant. Cinq (5) couches sont déposées au total pour chaque échantillon.

• **Séchage et recuit des films**

Entre chaque dépôt des trois premières couches, les échantillons sont laissés à sécher dans la boîte à gants pendant 24 heures pour éviter toute contamination. La pureté et l’homogénéité de ces trois premières couches sont importantes pour garantir une bonne adhésion des deux dernières couches. Pour les 4ème et 5ème couches, les échantillons sont séchés à l’étuve pendant 5 minutes à 200°C. Enfin, les échantillons sont recuits à 500°C dans un four électrique CARBOLITE (BHRF7/45B) pour garantir l’obtention de films minces bien cristallisés.

La **Figure 24** illustre le procédé de fabrication des films minces de ZnO.

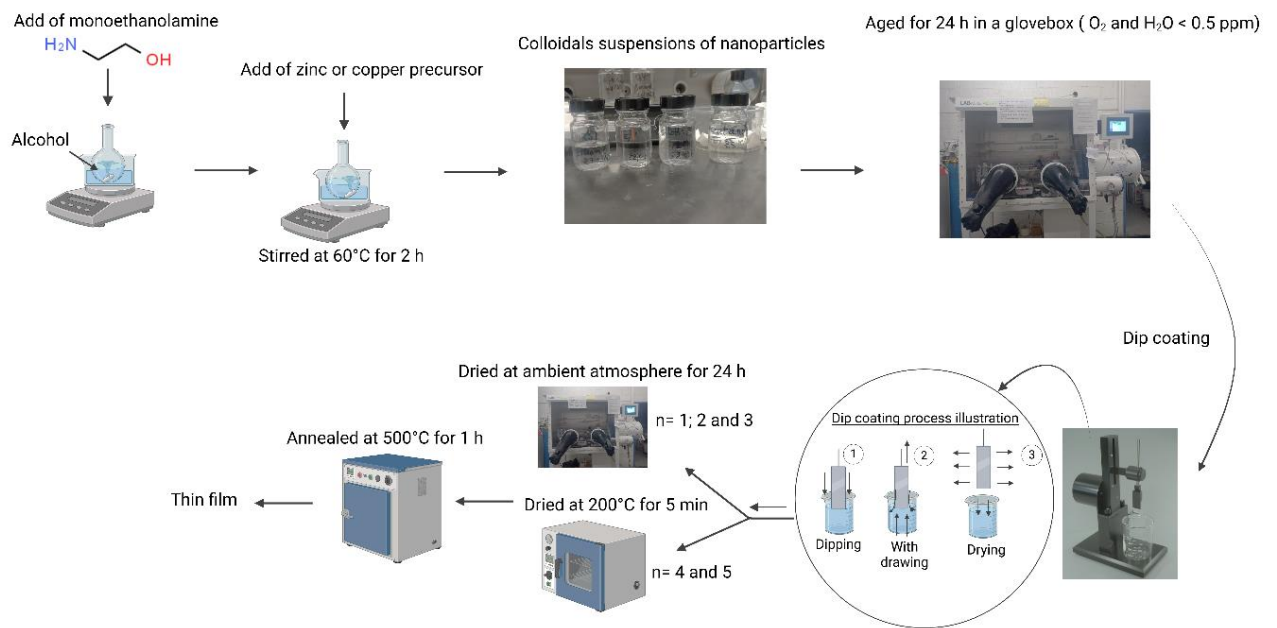


Figure 24 : Image illustrant le procédé d’élaboration de films minces de ZnO.

La **Figure 25** illustre des films minces de ZnO.

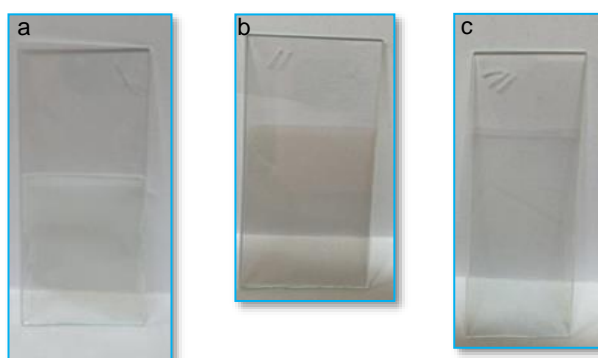


Figure 25 : Films minces de ZnO obtenus : a) 0,1 M Propanol ; b) 0,25 M Propanol et c) 0,4 M Propanol.

Les nanoparticules ont ensuite été incorporées dans une formulation de peinture afin d'évaluer leur activité antimicrobienne dans une matrice plus complexe. La section suivante détaille la méthodologie utilisée pour cette formulation.

4. Formulation d'une peinture à eau avec des nanoparticules de ZnO

Une poudre de peinture écologique sans conservateur, de la marque Dolci, a été dispersée dans de l'eau distillée stérile dans un rapport massique Peinture/Eau de 1:1 à l'aide d'un émulsionneur à rotor-stator numérique EUROSTAR 20. Les NPs ont été préalablement soniquées et ajoutées à la peinture dans un pourcentage massique de 1 %. Les films de peinture ont ensuite été appliqués sur des lames de microscopie prétraitées à l'acide sulfurique pour assurer une meilleure adhérence de la peinture, par dip coating, à une vitesse de dépôt de 5 cm/min, avec une seule couche déposée. La peinture a ensuite été laissée à sécher en profondeur pendant 24 heures. La quantité de NPs déposée sur les lames a été estimée en mesurant le poids sec des échantillons avec et sans NPs.

Dans la section suivante, nous présentons les principes des outils analytiques utilisés pour caractériser les matériaux.

5. Méthodes de caractérisation physico-chimique

La structure cristallographique des échantillons dans cette étude a été examinée à l'aide de la technique de diffraction aux rayons X. De plus, la structure a été explorée à l'aide de la spectrométrie Raman. L'analyse de la couverture de surface des NPs a été réalisée grâce à la spectroscopie à transformée de Fourier. La topographie des films minces a été examinée par la microscopie à force atomique, tandis que le diamètre hydrodynamique a été mesuré par la technique de diffusion dynamique de la lumière. Les sections suivantes traitent des principes

de fonctionnement de chaque méthode, ainsi que des appareils et des paramètres d'acquisition sélectionnés, utilisés pour la caractérisation des échantillons.

5.1. Diffraction des rayons X

5.1.1. Analyse de phase

Un cristal idéal est caractérisé par une disposition régulière et périodique de molécules ou d'atomes dans l'espace, définie par trois vecteurs (a , b et c) qui constituent le réseau cristallin. Les radiations susceptibles de subir une diffraction par une matière cristallisée sont à la fois électromagnétiques et corpusculaires. Le principe de la diffraction des rayons X repose sur la diffusion élastique de rayons X par un solide. Pendant la procédure d'analyse par diffraction des rayons X, le faisceau interagit avec le cristal et est ensuite diffusé dans des directions spécifiques. Simultanément, les électrons du cristal commencent à osciller à la fréquence du faisceau incident, devenant ainsi des sources d'ondes électromagnétiques. La loi de Bragg définit la condition de diffraction d'un plan (hkl) : $2 d_{hkl} \sin \theta = n\lambda$ (1), où d_{hkl} est la distance entre deux plans, θ est l'angle entre le rayon incident et la surface de l'échantillon correspondant à une interférence constructive créée par les plans (hkl), n est l'ordre de diffraction, et λ est la longueur d'onde du rayonnement.

Les interférences entre les rayons X et la matière sont plus prononcées lorsque la matière est ordonnée. En mesurant l'angle et l'intensité des rayons diffractés, une image tridimensionnelle de la densité électronique dans la maille cristalline peut être obtenue. En utilisant cette densité, il devient possible de déterminer la position moyenne des atomes constituant le motif cristallin du cristal. Cette approche fournit également des informations sur la nature des atomes, leurs liaisons chimiques, ainsi que d'autres aspects structuraux du cristal.

Les résultats de la diffraction des rayons X se présentent sous la forme d'un diffractogramme, noté $I = f(\theta hkl)$, où chaque pic correspond à la diffraction du faisceau source par une famille (hkl) de plans cristallographiques.

Les analyses de diffraction aux rayons X pour cette étude ont été effectuées au laboratoire LSPM à l'aide d'un diffractomètre INEL XRG 3000, en utilisant une source de cobalt ($\lambda K\alpha_1$ (Co) = 1,789 Å).

5.1.2. Analyse des propriétés structurales et microstructurales

a) Loi de Scherrer

L'équation de Scherrer représente le modèle le plus simple utilisé pour estimer le diamètre des particules, sans prendre en considération l'effet des microdéformations.

$$D = \frac{K\lambda}{\beta \cos(\theta)} \quad (15)$$

D : Taille des domaines cristallisés (par approximation \approx taille de grains)

K : Constante de Scherrer dépendant de la forme des cristallites (K = 0,94 pour les grains sphériques)

λ : Longueur d'onde de la radiation X

β : FWHM (largeur de pic à mi-hauteur), déterminée par ajustement de certains pics de Bragg, en utilisant le proGramme Peakoc.exe.

La **Figure 26** illustre la loi de Bragg sur la diffraction des plans (hkl).

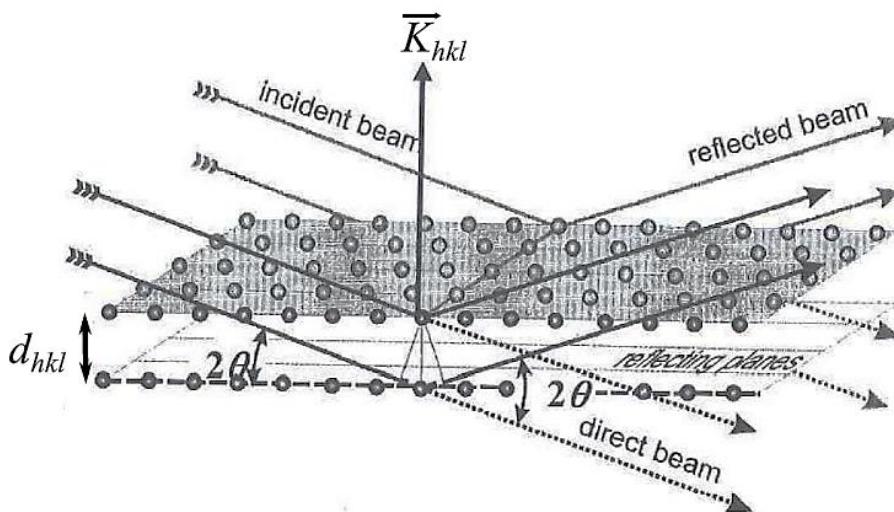


Figure 26: Illustration de la loi de Bragg sur la diffraction des plans (hkl).

b) Méthode de Rietveld

La méthode de Rietveld offre une meilleure précision dans la détermination de la structure cristalline des matériaux. Elle implique l'ajustement du profil observé du diagramme de poudre au profil théorique. Préalablement, les phases cristallines ont été identifiées à l'aide du logiciel Match, qui repose sur la reconnaissance des pics de diffraction avec les fiches de la

base de données JCPDS (Joint Committee for Powder Diffraction Standard). Le modèle obtenu est raisonnablement proche de la structure cristalline réelle du matériau d'intérêt. Les fichiers CIF (Crystallographic Information) correspondants, ainsi que les résultats de la diffraction des rayons X du matériau d'intérêt, sont ensuite exportés dans le logiciel MAUD (Materials Analysis Using Diffraction Version 2.998) pour ajustement.

Les diagrammes de diffraction ont été traités à l'aide de la méthode de Rietveld implémentée dans le logiciel MAUD (Material Analysis Using Diffraction) version 2.998. Les pics ont été ajustés selon une procédure standardisée. Les paramètres affinés comprenaient les paramètres de maille, la taille des nanoparticules et la présence de microdéformations. Le fichier d'information cristallographique pour la wurtzite de ZnO a été obtenu à partir de la Crystallography Open Database (Réf 2300450). À la dernière étape, une option de texture arbitraire a été utilisée pour optimiser la qualité de l'affinement du modèle de Rietveld. Ce processus se poursuit jusqu'à ce que le profil de poudre calculé, basé sur le modèle structural, s'ajuste de manière optimale au schéma observé [186].

5.2. Microscopie électronique à transmission (MET)

Le principe fondamental de la microscopie électronique en transmission (MET) repose sur la nature ondulatoire des électrons en mouvement. Au cours de cette procédure d'analyse, un filament de tungstène est chauffé dans un canon à électrons, générant ainsi des électrons qui sont focalisés sur l'échantillon grâce aux lentilles du condenseur. Un tube de colonne présent dans les lentilles du condenseur crée un vide, permettant aux électrons de produire une image nette sans être déviés par les molécules d'air. Lorsque les électrons atteignent l'échantillon, celui-ci les diffuse, et les électrons dispersés sont ensuite concentrés sur des lentilles magnétiques pour former une image claire et détaillée. La direction du faisceau d'électrons dépend de la forme et de la nature chimique de l'échantillon. La microscopie électronique en transmission permet d'analyser la microstructure interne du matériau, ainsi que la taille et la forme des grains. Généralement, la MET est équipée d'un diffractogramme électronique qui peut fournir localement des informations sur la structure cristallographique du matériau. La **Figure 27** illustre le processus de la transmission électronique.

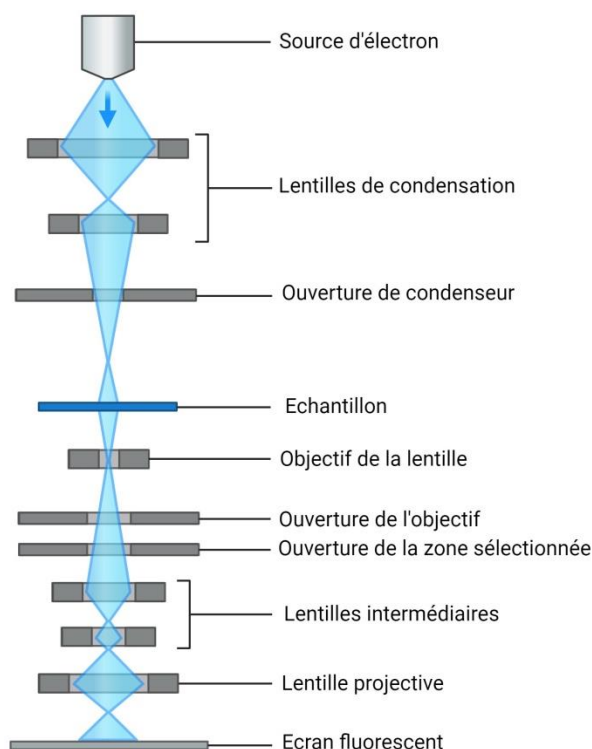


Figure 27: Illustration du processus de la transmission électronique.

La microscopie électronique à transmission appliquée dans ce travail est à haute résolution (HR-MET) et est réalisée sur un JEOL 2011 équipé d'un filtre d'imagerie Gatan (DIF) 200. La HR-MET permet de résoudre les atomes individuellement ou sous forme d'amas. Pour l'analyse des NPs en solution par MET, une goutte de la solution de NPs a été diluée dans 5 mL d'éthanol. Les NPs ainsi diluées ont ensuite été déposées sur des films de carbone perforés (S147-4). L'ensemble a été exposé à une lampe UV afin de faciliter l'étalement uniforme des gouttes sur toute la surface des films, avant d'être soumis à l'analyse au microscope.

5.3. Microscopie électronique à balayage (MEB)

La microscopie électronique à balayage (MEB ou SEM de l'anglais *Scanning Electron Microscopy*) est une technique capable de produire des images de la surface d'un échantillon en utilisant le principe des interactions électrons-matière. Un faisceau d'électrons est focalisé sur la surface du matériau observé à l'aide d'un jeu de lentilles électromagnétiques entraînant l'émission d'électrons depuis le matériau irradié. Un détecteur va capter ces électrons émis et retranscrire un signal modulé par le nombre d'électrons reçus depuis un point d'impact du faisceau. Pour former une image, le faisceau va balayer une zone de l'échantillon afin que les différents points d'impact forment chacun un point de l'image obtenue [187, 188].

Les images de microscopie électronique à balayage présentées dans ce travail ont été réalisées au Laboratoire des Sciences des Procédés et des matériaux, LSPM, sur un microscope de type Zeiss Supra 40VP et Leica 440 avec une tension d'accélération variant entre 1 et 30 kV. Pour les supports en plaque de verre qui ne sont pas conductrices, des dépôts de Au/Pd de 10 nm ou de carbone de 3 nm d'épaisseur ont été effectués avant le passage à l'imagerie. Le pouvoir de résolution dans les conditions d'utilisation normales est de 2 nm pour le MEB FEG (microscope électronique à balayage équipé d'un canon à effet de champ) et de 25 nm pour MEB classique. La microscopie électronique à balayage, nous informe sur la morphologie de surface des films. La **Figure 28** représente schématiquement de l'interaction entre un faisceau d'électrons et la surface d'un échantillon.

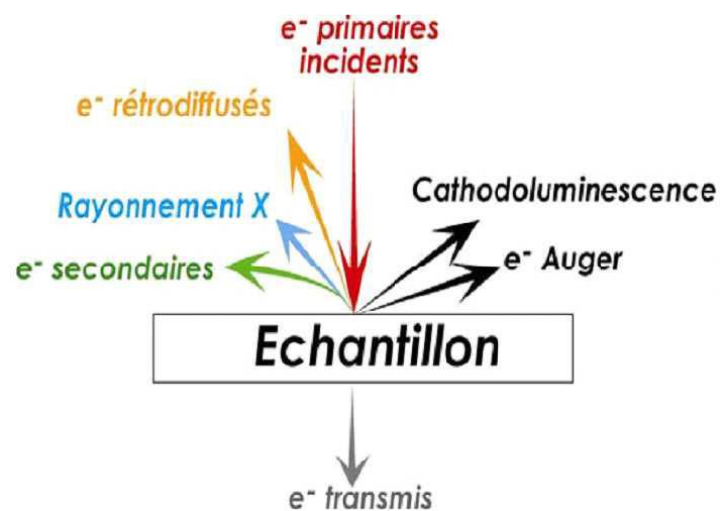


Figure 28: Représentation schématique de l'interaction entre un faisceau d'électrons et la surface d'un échantillon.

Pour cette analyse, les poudres de NPs ont été préalablement diluées dans de l'éthanol de manière significative afin de prévenir la formation d'agglomérats, avant d'être soumises à une observation par MEB.

5.4. Spectroscopie Raman

La spectrométrie Raman repose sur le principe que lorsqu'on irradie un échantillon avec une source intense et monochromatique (laser) dont les photons ont une énergie différente de celle correspondant à une transition électronique ou vibrationnelle de ces molécules, aucune interaction particulière ne se produit, sauf pour une très faible proportion d'entre elles.

Au cours de l'analyse par spectroscopie Raman, un faisceau de lumière monochromatique émis par un laser à une fréquence ν_0 spécifique est dirigé vers l'échantillon à analyser. Les photons incidents subissent une combinaison de transmission, réflexion et/ou absorption, avec une petite fraction étant diffusée. Une partie de la lumière diffusée résonne à la même fréquence que la radiation incidente, constituant la diffusion élastique connue sous le nom de diffusion Rayleigh. Une fraction infime de la lumière est diffusée avec un changement de fréquence, appelée diffusion Raman. Si la fréquence diffusée est supérieure à celle du photon incident, la molécule gagne de l'énergie (raie Stokes). Si la fréquence est inférieure, la molécule perd de l'énergie (raie anti-Stokes). La position des raies dépend de la structure du matériau.

Pour le ZnO de type wurtzite (groupe spatial P63mc), les phonons optiques au point de la zone de Brillouin appartiennent à la représentation irréductible : $\Gamma_{opt} = A_1 + E_1 + 2 E_2 + 2 B_1$ (16), avec les modes A_1 et E_1 actifs en Raman et en infrarouge, les modes E_2 actifs uniquement en Raman, et les modes B_1 inactifs en Raman et en infrarouge (modes silencieux) [189].

La propriété structurale des nanoparticules synthétisées dans ce travail a également été analysée par spectroscopie Raman à l'aide d'un spectromètre HORIBA Jobin-Yvon HR800 avec une longueur d'onde d'excitation de 633 nm.

La **Figure 29** présente les différentes transitions énergétiques quantiques dans la diffusion Rayleigh et Raman.

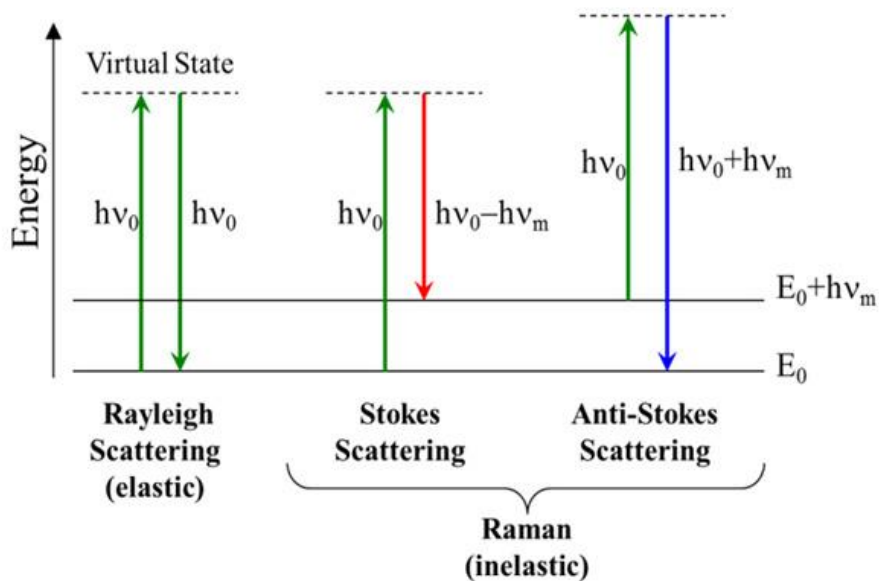


Figure 29: Transitions énergétiques quantiques dans la diffusion Rayleigh et Raman.

5.5. Spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier (FTIR)

La spectroscopie infrarouge exploite l'absorption de la lumière par la matière dans le proche et moyen infrarouge, résultant de l'interaction entre les radiations de la source lumineuse et les liaisons chimiques. Les atomes d'une molécule sont en perpétuel mouvement de vibration l'un par rapport à l'autre, sauf à la température zéro Kelvin. Lorsqu'une source monochromatique irradie une telle liaison non symétrique à la même fréquence que la fréquence de vibration, une interaction entre la lumière et le dipôle électrique de la liaison se produit. Les mouvements moléculaires les plus connus sont les vibrations d'élongation (symétrique et asymétrique) ainsi que les vibrations de déformation angulaire.

Dans le cadre de l'analyse de l'échantillon par FTIR, deux ondes infrarouges monochromes sont émises. L'une d'entre elles ne traverse rien et sert de référence, tandis que l'autre traverse l'échantillon. La différence de transmission entre les deux ondes est ensuite comparée. Deux procédés émettent le spectre : le procédé par transmission, utilisé pour les échantillons transparents de faible épaisseur, et le procédé par réflexion. Les dispositifs des procédés par réflexion sont basés sur la réflexion totale atténuée, la réflexion spéculaire ou la réflexion diffuse. Le procédé par réflexion totale atténuée (ATR) est celui utilisé dans ce travail.

Pendant le procédé ATR, le faisceau optique subit une ou plusieurs réflexions à l'interface entre l'échantillon et un matériau transparent d'indice de réfraction élevé. Le matériau sur lequel est déposé l'échantillon est éclairé sous un angle incident supérieur à son angle critique. Une faible fraction de la lumière incidente pénètre de quelques dixièmes de micromètre dans l'échantillon. La profondeur dépend de l'angle d'incidence, de la longueur d'onde et des indices de réfraction du cristal et de l'échantillon. La succession de plusieurs réflexions totales atténuées de ce type conduit à un trajet optique effectif comparable à celui qui aurait été obtenu par transmission.

L'absorption de l'échantillon est représentée par le spectre obtenu par le spectromètre. Les bandes d'absorption des vibrations d'élongation communes à toutes les molécules porteuses de fonction organique se situent majoritairement dans la zone de 1500 à 4000 cm^{-1} . L'étude de cette région permet de réaliser une première approche de l'analyse fonctionnelle d'une molécule, décrivant ainsi l'ensemble des groupements chimiques qui la constituent. La transmittance, en ordonnée, est le rapport des intensités transmises (T) avec et sans échantillon.

La **Figure 30** présente la technique de l'infrarouge à transformée de Fourier par réflexion totale atténuée (ATR).

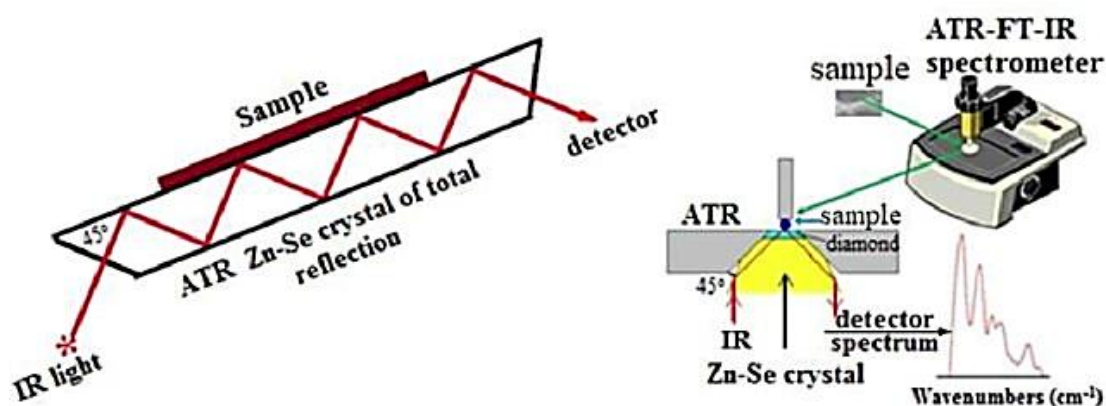


Figure 30: Présentation schématique de la technique de l'infrarouge à transformée de Fourier par réflexion totale atténuée (ATR) [190].

Les mesures FTIR ont été effectuées à l'aide d'un spectrophotomètre IR de Shimadzu (IRAffinity) utilisant la technique de réflexion totale atténuée (ATR).

5.6. Microscopie à force atomique (AFM)

Le principe d'un microscope à force atomique (AFM) découle de l'observation que lorsqu'une pointe de ce type de microscope balaye une surface, les distances de travail, qui sont de l'ordre de l'angström, génèrent des forces substantielles entre les atomes de la pointe et ceux de la surface. Elle permet d'analyser la surface des échantillons, ainsi que leur rugosité. Une pointe très fine fixée au bout d'un levier élastique (cantilever) va balayer la surface de l'échantillon. Les interactions atomiques (répulsion ou attraction) entre cette pointe et la surface de l'échantillon induisent une déflexion du cantilever, laquelle est détectée à l'aide de photodiodes. Ces derniers enregistrent le rayonnement lumineux d'un laser se réfléchissant à l'extrémité du cantilever (au-dessus de la pointe).

En imaginant un dispositif capable d'amplifier les variations locales de ces forces tout au long du balayage, il serait possible de créer une cartographie des forces à l'échelle atomique, offrant ainsi une représentation de la topographie de la surface. Un mécanisme amplificateur simple consiste en un levier dont la pointe est solidement attachée.

L'analyse de la déviation du levier, réalisée à l'aide d'un laser, permet à la fois de déterminer le parcours exact de la pointe et de mesurer les forces d'interaction entre cette dernière et l'échantillon.

La **Figure 31** présente le principe de la microscopie à force atomique (AFM).

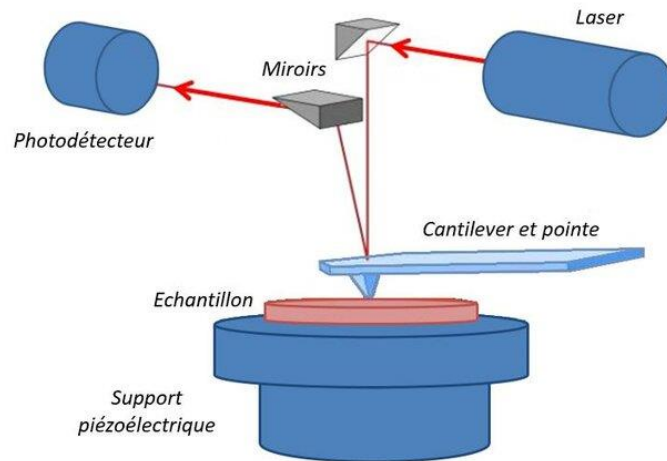


Figure 31: Schéma du principe de la microscopie à force atomique (AFM) [191].

Les imageries AFM ont été réalisées en mode à balayage intermittent à l'aide d'un microscope Nanoscope IIIA 3100 de Digital Instruments, équipé de pointes en nitrure de silicium avec un rayon de courbure d'environ 15 nm. Ces mesures permettent également de déterminer la rugosité des surfaces, exprimée notamment par la rugosité RMS (Root Mean Square), qui correspond à la moyenne des écarts quadratiques des hauteurs mesurées par rapport au plan moyen, et est définie par la formule suivante :

$$RMS = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (Z_i - Z_m)^2}{n - 1}} \quad (17)$$

Où Z_m est la valeur moyenne des hauteurs sur la surface analysée, Z_i est la mesure i de chaque point et n le nombre de points de mesures.

Les sections suivantes décrivent les conditions de culture et de croissance des microorganismes, ainsi que les méthodes analytiques utilisées pour évaluer l'activité antimicrobienne des NPs.

6. Conservation, culture et croissance des microorganismes

6.1. Conservation et culture des microorganismes

Des cryobilles de microorganismes conservés à -80°C ont été ajoutées à 9 mL de Trypto Soja Caséine (TCS, Biomérieux, France). La suspension a été incubée à 35°C pour *E. coli* (ATCC 8739) et *S. aureus* (ATCC 6538), et à 30°C pour *P. aeruginosa* (ATCC 9027) et *C. albicans* (ATCC 10231) pendant 24 h pour les bactéries et 72 h pour la levure.

Les microorganismes ont ensuite été répartis dans des cryotubes contenant du glycérol et conservés à -80°C . Des tests de pureté ont été réalisés au préalable par la méthode du cadran.

Pour la culture, les suspensions de microorganismes des cryotubes ont été étalées sur de la gélose nutritive et incubées à 35°C pendant 24h ou à 30°C pendant 72h. Les microorganismes ont ensuite été transférés sur une nouvelle gélose et incubés dans les conditions précédemment citées. Les concentrations de leurs suspensions mères à 8 Log UFC/mL ont été préparées en mesurant leur densité optique et à l'aide d'un étalonnage établi au laboratoire. Les suspensions mères des microorganismes ont été préparées dans de l'eau physiologique ou du bouillon nutritif.

6.2. Croissance des microorganismes

En microbiologie, la croissance se traduit par l'augmentation du nombre de cellules au sein d'une population. Le mécanisme fondamental de la croissance microbienne, étudiée par culture *in vitro*, implique la division d'une cellule mère en deux cellules filles identiques. À chaque division, la population microbienne double, et cela se produit avec une périodicité constante spécifique à chaque souche microbienne dans un milieu de culture donné.

6.2.1. Courbe de croissance microbienne

La courbe de croissance se divise en quatre (04) principales phases distinctes, chacune ayant une pente différente. Ces phases sont la phase de latence, la phase de croissance exponentielle, la phase stationnaire et la phase de déclin. La **Figure 32** illustre l'allure de la cinétique de croissance des microorganismes.

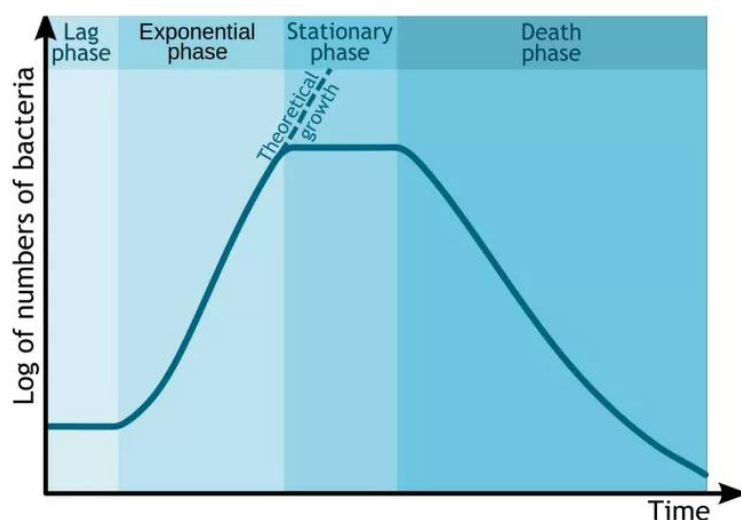


Figure 32: Cinétique de croissance des microorganismes [192].

Phase de latence (lag) : Au cours de cette période, la croissance n'est pas encore équilibrée. Les divers composants de chaque cellule sont synthétisés pour fournir les coenzymes, les

enzymes et les métabolites essentiels à la croissance. Le nombre de cellules reste constant pendant cette période, le taux de croissance est nul puis augmente légèrement, et le temps de génération tend vers l'infini. Cela traduit l'adaptation des bactéries à leur environnement.

Phase de croissance exponentielle (log) : Durant la phase exponentielle, également connue sous le nom de phase logarithmique, chaque cellule de la population se divise dans un laps de temps identique, correspondant au temps de génération. Les bactéries se multiplient rapidement, sans entrave, et le taux de croissance est à son maximum et constant, ce qui signifie que le temps de génération est minimal. La croissance la plus rapide est obtenue dans un milieu riche où les microorganismes n'ont pas à dépenser d'énergie pour la synthèse de monomères. La phase exponentielle joue un rôle crucial dans le déclenchement de maladies infectieuses, car la croissance exponentielle des microorganismes peut conduire à une population importante, nécessitant une intervention précoce en cas de maladie infectieuse. Cette période constitue la cible privilégiée pour la mise en œuvre de méthodes préventives contre les infections.

Phase stationnaire : En général, les microorganismes ne maintiennent pas une croissance exponentielle pendant un nombre prolongé de générations. Lorsque les nutriments essentiels sont épuisés, que des déchets toxiques produits par le métabolisme microbien s'accumulent, ou que les conditions environnementales deviennent défavorables (pH, température, etc.), les microorganismes cessent de se multiplier. La phase stationnaire représente une période de survie qui imite les conditions rencontrées dans la nature par les microorganismes lorsqu'ils croissent lentement ou cessent de croître. Lors de l'entrée en phase stationnaire, de nombreux gènes sont exprimés, dont certains codent pour des métabolismes secondaires tels que la production d'antibiotiques, qui sont réprimés en phase exponentielle.

Phase de déclin : Pendant cette dernière phase, les bactéries ne se reproduisent plus. Beaucoup d'entre elles meurent et sont décomposées plus ou moins rapidement par les enzymes libérées au moment de leur mort. Le taux de mortalité peut être constant, tout comme le taux de croissance. Il est alors représenté par une droite, le nombre de cellules étant proportionnel au temps. Cependant, des déviations de l'ordre exponentiel de déclin peuvent se produire assez fréquemment en raison de divers degrés de résistance des cellules. Dans certains cas, des bactéries peuvent également survivre et se multiplier aux dépens des nutriments libérés par la décomposition d'autres cellules, c'est la phase dite cryptique.

6.2.2. Paramètres de la croissance

La croissance microbienne peut être caractérisée par deux constantes définies en phase exponentielle de croissance :

- Le **temps de génération (G)** correspond à l'intervalle de temps entre deux divisions successives ou au temps nécessaire au doublement de la population bactérienne. Il s'exprime selon une progression géométrique, partant d'une cellule bactérienne unique (1, 2, 4, 8, 16, 32, 64, 128, 256...). Il est important de noter que toutes les cellules d'une population bactérienne ne se développent pas au même rythme, et le temps de génération peut varier en fonction de l'espèce considérée et des conditions de culture.

Le temps de génération d'un microorganisme cultivé dans des conditions déterminées reste constant. Il peut être calculé en utilisant trois éléments :

- X_0 : le nombre de microorganismes au début de la phase exponentielle de croissance
- X_t : le nombre de microorganismes après un temps t de la phase exponentielle de croissance
- t : est l'intervalle de temps entre X_0 et X_1

Si n est le nombre de dédoublement réalisées par la population microbienne, $X_n = X_0 \times 2^n$ (18)

- Le **taux de croissance horaire (μ_x) ou vitesse spécifique de croissance** est le nombre de divisions par unité de temps. Autrement dit, il est inversement proportionnel au temps de génération.

Si l'on pose μ_x (constante de vitesse de croissance) = le nombre de dédoublement par unité de temps, on a : $\mu_x = \frac{n}{(t_n - t_0)}$ (19)

D'après Si n est le nombre de dédoublement réalisées par la population microbienne, $X_n = X_0 \times 2^n$ (18), $n = \frac{\log X_n - \log X_0}{\log 2}$, ce qui conduit à écrire $\mu_x = \frac{\log X_n - \log X_0}{(t_n - t_0) \times \log 2}$ (21)

7. Mesure de l'activité antimicrobienne des nanoparticules

7.1. Activité antimicrobienne en suspension

7.1.1. La Concentration Minimale Inhibitrice (CMI)

La concentration minimale inhibitrice (CMI) est la concentration la plus faible d'un agent antimicrobien exprimée en mg/L ($\mu\text{g/mL}$) qui, dans des conditions in vitro strictement

contrôlées, empêche complètement la croissance visible de la souche d'essai d'un organisme [193]. Contrairement à une méthode qualitative, la CMI permet d'évaluer le degré de sensibilité ou de résistance à l'agent antimicrobien [194].

Les courbes de croissance d'une population microbienne exposée à différentes concentrations d'un agent antimicrobien montrent des modifications significatives par rapport à la courbe de témoin. Pour des faibles concentrations en agent antimicrobien, la concentration microbienne à un moment donné devient inférieure à celle de la courbe témoin, et la biomasse de la phase stationnaire demeure constante. Cela se traduit par un ralentissement de la croissance, et le taux de croissance horaire est donc réduit.

En revanche, pour des fortes concentrations en agent antimicrobien, la concentration microbienne diminue. Le nombre de microorganismes tués excède celui des cellules issues de la multiplication, conduisant à un taux de croissance horaire négatif. Dans cette situation, on qualifie l'agent antimicrobien comme ayant un effet microbicide.

Enfin, lorsque la concentration en agent antimicrobien est égale à la CMI, le taux de croissance horaire est nul.

En pratique clinique, cette concentration est utilisée pour classer le microorganisme testé comme étant cliniquement susceptible, intermédiaire ou résistant à l'antibiotique testé [195].

La CMI peut être déterminée par des méthodes de dilution ou par des méthodes de gradient. En ce qui concerne la méthode par dilution, cette dernière peut se faire en milieu liquide ou sur milieu gélosé. En milieu liquide, la dilution peut être une macro-dilution ou une micro-dilution en fonction du volume utilisé.

Le milieu de culture utilisé dans les tests standard est le Muller-Hinton sous forme liquide ou gélose. La concentration d'inoculum finale recommandée pour la dilution en bouillon est de 5×10^5 unités formant des colonies (UFC) par ml; le nombre de cellules approprié dans les expériences de dilution en milieu gélosé est fixé à 10^4 UFC par ensemencement en surface.

L'inoculum doit être préparé à partir d'une culture fraîche, et la suspension bactérienne doit être utilisée dans les 30 minutes afin d'éviter tout changement dans le nombre de cellules. La **Figure 33** illustre les différentes méthodes de dilutions.

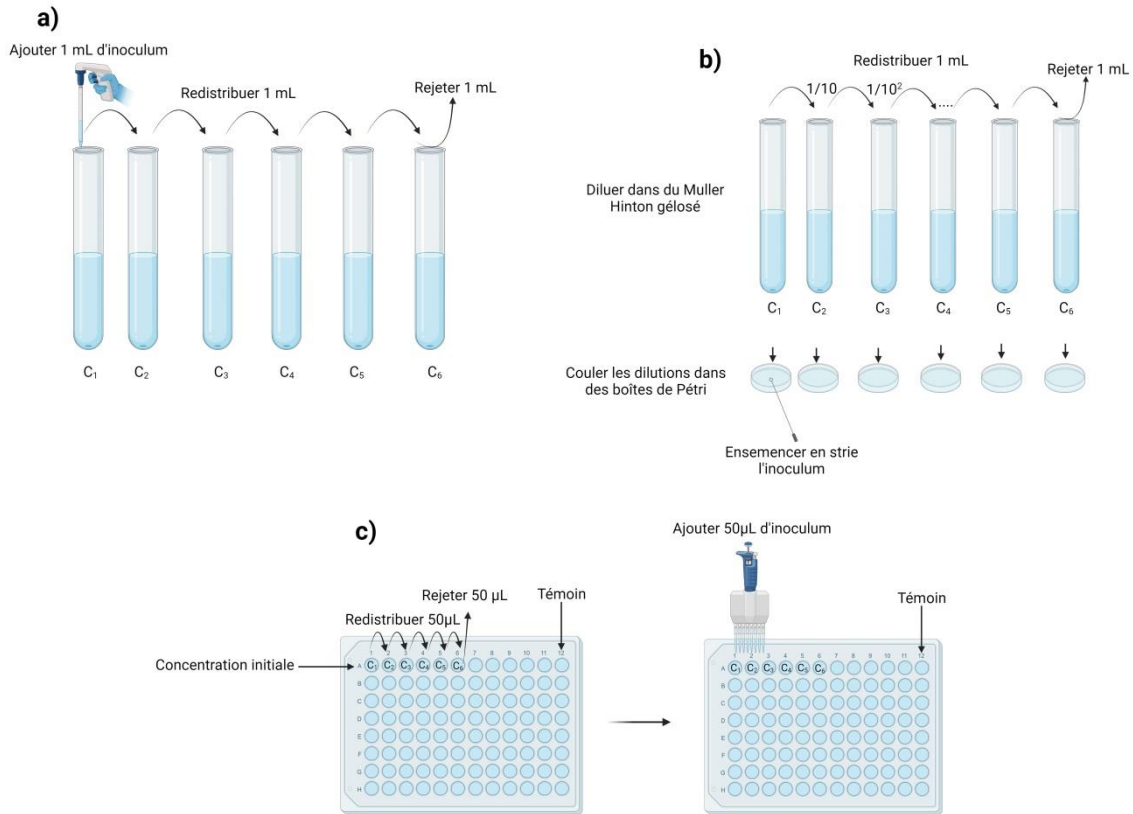


Figure 33: Schéma d'illustration de la détermination d'une CMI par des méthodes de dilution a) Macrodilution, b) Milieu gélifié et c) Microdilution dans une microplaque à 96 puits.

La CMI a été déterminée dans cette étude à l'aide de la méthode de microdilution en microplaque. Différentes concentrations de NPs (50-1000 µg/mL) ont été testées contre les bactéries pour déterminer la CMI. Ces concentrations ont été préparées par microdilutions d'une suspension mère de NPs de ZnO.

- **Préparation des échantillons**

Au total, 200 µL de chaque échantillon ont été inoculés dans une microplaque à 96 puits en présence d'une concentration finale de micro-organismes de 4,67 Log₁₀ UFC/mL. De l'eau physiologique a été ajoutée aux puits vides de la microplaque pour maintenir un environnement humide.

- **Condition d'incubation et de mesure**

Les échantillons ont été incubés dans un spectrophotomètre FLUOstar Omega pendant 24 heures avec une agitation orbitale double à 300 rpm pour surveiller les changements de densité optique à 600 nm (DO₆₀₀). Les températures d'incubation étaient de 37°C pour *E. coli* et *S. aureus*, et de 30°C pour *P. aeruginosa*. Les expériences ont été réalisées en triplicata.

- **Contrôles expérimentaux**

Les témoins négatifs comprenaient le milieu de culture, la solution de NPs et la solution de l'agent de dispersion des NPs. Les témoins positifs consistaient en la solution de l'agent de dispersion en contact avec les micro-organismes sans NPs, ainsi que les micro-organismes seuls dans le milieu MH, sans dispersant ni NPs.

- **Evaluation de la CMI**

La CMI a été évaluée comme étant la plus faible concentration à laquelle la densité optique des bactéries restait constante et égale à 0 pendant 24 h d'incubation.

- **Condition de culture et provenance des souches bactériennes**

Les bactéries ont été préalablement cultivées sur gélose MH à partir de cryotubes conservés à -80°C . Le Centre de Ressources Biologiques de l'Institut Pasteur (CRBIP) à Paris, France, a fourni les souches bactériennes, incluant *Escherichia coli* ATCC 8739 (CIP 53 126), *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027 (CIP 82118) et *Staphylococcus aureus* ATCC 6538 (CIP 53 156).

Bien que la CMI révèle l'absence de croissance bactérienne visible, elle ne permet pas de déterminer si les bactéries sont encore viables ou si elles ont été complètement éliminées. Pour approfondir notre étude sur l'impact de la taille des NPs de ZnO sur leur potentiel antibactérien, nous avons examiné leurs concentrations minimales bactéricides (CMB) contre les trois types de bactéries. La CMB a été déterminée en utilisant la méthode de dénombrement sur gélose.

7.1.2. La concentration minimale bactéricide

La valeur de la DO est directement corrélée à la population bactérienne totale, mais elle ne fournit pas d'indications sur leur viabilité. Par conséquent, en plus des mesures de la CMI, la concentration minimale bactéricide (CMB) a été déterminée par la méthode du dénombrement des colonies.

Il s'agit de la plus faible concentration de NPs entraînant une réduction d'au moins 99,9 % de la viabilité cellulaire. Diverses concentrations de NPs ont été incubées avec les bactéries dans le FLUOstar à la température appropriée pendant 24 heures. Après incubation, les échantillons ont été dilués et un volume de $1\ \mu\text{L}$ a été ensemencé sur de la gélose MH. Les boîtes de gélose MH ont ensuite été incubées aux températures appropriées pour le comptage des colonies.

La **Figure 34** illustre la méthodologie de détermination de la CMB.

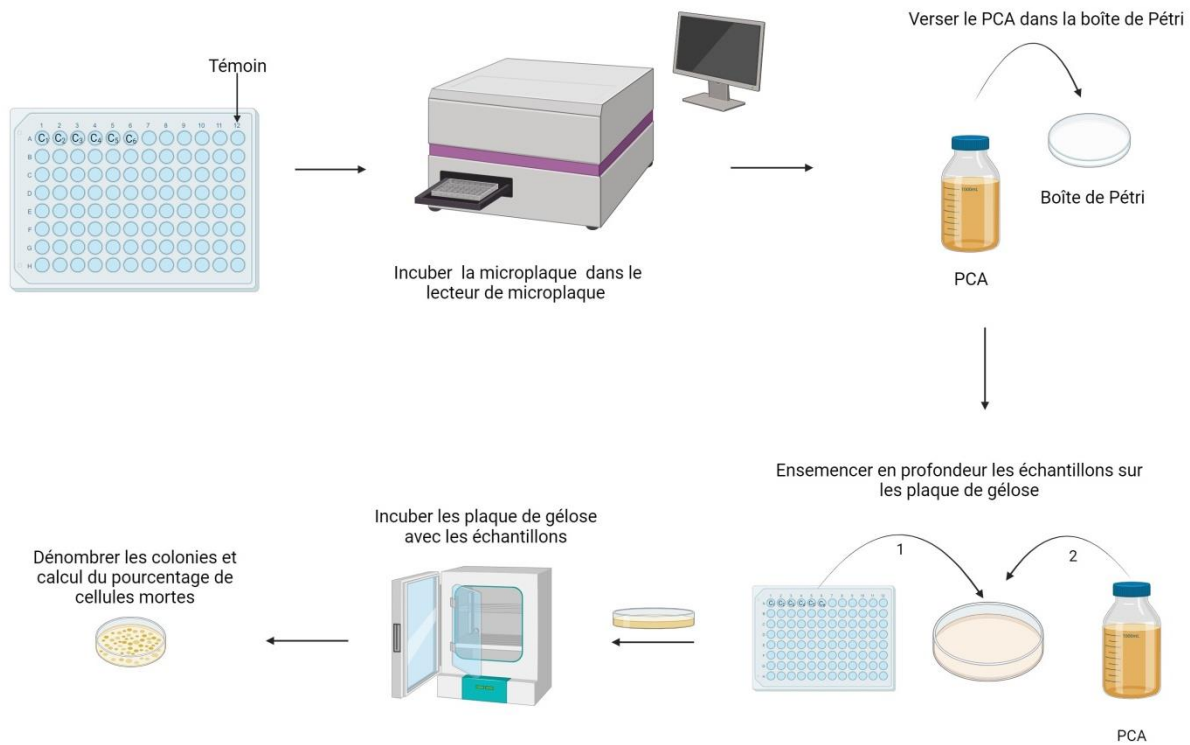


Figure 34 : Détermination d'une CMB par la méthode de dénombrement sur plaque de gélose.

La réduction cellulaire en pourcentage a été calculée selon la formule suivante :

$$\text{Reduction cellulaire} = (1 - (C_f/C_i)) \times 100 \text{ en \%} \quad (22)$$

C_i : est la concentration initiale de micro-organismes en contact avec les NPs avant l'incubation

C_f : est la concentration finale de micro-organismes en contact avec les NPs après 24 heures d'incubation

n : est le nombre de colonies comptées

V : est le volume inoculé

d : est le facteur de dilution.

Dans le souci d'apporter une meilleure compréhension de l'influence de la taille des NPs de ZnO sur leur activité antibactérienne, une étude sur la cinétique de croissance des bactéries en présence des NPs a été réalisée.

7.1.3. Cinétique de croissance du microorganisme par mesure de la densité optique

La méthode la plus couramment utilisée pour évaluer la croissance cellulaire consiste à suivre l'évolution de la densité optique (DO) des microorganismes par spectrophométrie à une longueur d'ondes comprise entre 600 nm et 660 nm. Cette méthode offre l'avantage de rapidité, de coût abordable, de simplicité de mise en œuvre, non intrusive et de sa facilité d'automatisation [196]. Elle peut également être utilisée pour évaluer les propriétés antibactériennes de diverses nanostructures et nanomatériaux.

Dans cette approche, l'absorbance de la lumière, à travers un échantillon pour évaluer la turbidité ou la densité optique, sert d'estimation du nombre de cellules bactériennes. Le résultat est fortement influencé par la dispersion, d'où la dénomination de cette méthode comme turbidimétrie, car l'accroissement de la turbidité entraîne une diffusion lumineuse accrue.

Selon la loi de Beer-Lambert, la concentration d'un soluté est directement proportionnelle à son absorbance. Cette relation est mathématiquement exprimée par l'équation $C = \epsilon A$, où ϵ représente un coefficient spécifique associé à une longueur d'onde déterminée et à un trajet optique particulier. Cette loi ne s'applique pas aux suspensions de cellules microbiennes, car ces cellules ne réalisent pas une absorption de la lumière, mais plutôt une diffusion [197]. Par conséquent, la turbidité est souvent exprimée sous forme de densité optique plutôt que d'absorbance. La loi de Beer-Lambert est valable seulement jusqu'à une densité optique d'environ 0,1 dans le contexte de suspensions de cellules microbiennes. La méthode spectrophotométrique fournit donc une estimation de la biomasse cellulaire totale, englobant à la fois les cellules vivantes et les cellules mortes [198].

Bien que la mesure de la densité optique soit rapide, elle présente des limites en termes de plage de concentration bactérienne car des variations dans la taille des cellules bactériennes, la formation d'agrégats de différentes tailles, ainsi que la constitution de biofilms complexifient la technique [197].

La croissance des agents pathogènes peut être surveillée en observant l'évolution de leur densité optique dans les puits d'une plaque de microtitration. Cette méthode permet de mesurer la cinétique de croissance microbienne. L'allure des courbes obtenues correspondent à celle d'une croissance microbienne. Sur la base des résultats, les courbes expérimentales qui représentent l'absence de croissance ou l'effet destructeur peuvent être construites et donnent un aperçu de

l'interaction entre la bactérie et l'agent antimicrobien. Les données peuvent être analysées plus en détail à l'aide de différents modèles mathématiques [194].

La cinétique de croissance des bactéries en contact avec les NPs a été suivie en mesurant la densité optique (DO_{600}) des échantillons au cours du temps, à l'aide du spectrophotomètre FLUOstar Omega à une longueur d'onde de 600 nm.

Les concentrations de NPs pour lesquelles la densité optique des bactéries n'était pas constante lors de la détermination de la CMI, comme expliqué précédemment, ont été utilisées pour étudier l'impact de la taille des NPs sur la cinétique de croissance bactérienne. La période de latence, le taux de croissance spécifique des bactéries et le pourcentage d'inhibition des NPs ont été évalués en utilisant les données sur les DO_{600} . Les formules utilisées, citées précédemment dans la référence [199], sont présentées ci-dessous :

$$\mu_x = (\ln(X_2) - \ln(X_1)) / (t_2 - t_1) \text{ en } h^{-1} \quad (23)$$

$$G = \ln(2) / \mu_x \text{ en } h \quad (24)$$

$$\text{Inhibition} = (DO_f^{\text{bactérie}} - (DO_f^{\text{NPs+bactérie}} - DO_{\text{contrôle}}^{\text{NPs-bactérie}})) / DO_f^{\text{bactérie}} \times 100 \quad (25)$$

Avec,

μ_x : la vitesse spécifique de croissance

X_2 et X_1 : représentent la biomasse aux temps t_2 et t_1 , respectivement, pendant la phase de croissance exponentielle en UFC/mL

$t_2 - t_1$: représente le temps correspondant à la croissance de la biomasse de X_1 à X_2 en heures

G : le temps de génération en heures

$DO_f^{\text{bactérie}}$: la densité optique finale du témoin positif avec seulement les bactéries

$DO_f^{\text{NPs+ bactérie}}$: la densité optique finale des bactéries en présence de NPs

$DO_{\text{contrôle}}^{\text{NPs- bactérie}}$: la densité optique des NPs seules sans les bactéries

La conversion de la DO_{600} en UFC/mL est réalisée en utilisant une équation de calibration $DO = f(X)$ établie dans le laboratoire pour chaque bactérie dans les conditions opératoires, où X représente la biomasse en UFC/mL.

7.1.4. *Test Time-Kill*

Le test de destruction dans le temps (Time-Kill) évalue la concentration de cellules mortes ou vivantes au fil du temps à l'aide de la méthode de dénombrement sur boîte de milieu gélosé. La réduction du nombre de cellules microbiennes viables est donc évaluée à des intervalles de temps réguliers après exposition à des NPs. Le pourcentage de cellules mortes ou vivantes est calculé après chaque période d'incubation à l'aide de la méthode de dénombrement sur milieu gélosé. Ce test est normalisé pour les bactéries et est décrit dans le document M26-A du CLSI [200].

En raison du temps imparti pour ce travail, cette méthode a été appliquée uniquement à *C.albicans*. Concrètement, des échantillons sont prélevés à différentes périodes pour mesurer la concentration de micro-organismes survivants, permettant ainsi de tracer une courbe de la diminution logarithmique des unités formant colonie (UFC/mL) en fonction du temps.

Des concentrations finales de NPs de 4, 15, 20 et 30 mg/mL ont été ajoutées dans une microplaqueensemencée avec *Candida albicans* à 6 Log₁₀ UFC/mL. Les échantillons ont été incubés à 30°C pendant 72 heures dans le FLUOStar. Ensuite, des aliquotes de 1 µL ont été prélevées pour compter les colonies viables à 0, 6, 22 et 48 heures. Ces aliquotes ont été diluées jusqu'à 10⁻⁵ dans du bouillon Muller Hinton stérile, puis chaque dilution a étéensemencée sur gélose PCA pour déterminer la concentration des cellules viables par dénombrement de colonies. Les colonies viables ont été comptées après incubation pendant 24 et 72 heures.

7.1.5. *Évaluation de l'effet antibactérien d'alcools par bioluminescence*

Le travail réalisé précédemment par Dadi et al. [201] s'est concentré sur l'étude de l'effet de la concentration des solutions colloïdales de NPs d'oxydes métalliques dans l'isopropanol sur leur activité antibactérienne. Les solutions colloïdales ont été préparées en utilisant la méthode sol-gel, basée sur la technique décrite par Znaidi et al. [88], avec l'isopropanol comme solvant de synthèse. Le principe de cette méthode et les mécanismes conduisant à la formation des NPs sont précisés dans la partie 5.3. du *Chapitre 1*.

L'étude de solutions colloïdales dans un solvant alcoolique pose des défis pour distinguer l'activité spécifique des NPs de celle du solvant, en particulier lors d'analyses microbiologiques plus poussées. Ces analyses, telles que l'ATP-métrie et la mesure de la toxicité par microdilution, exigent des échantillons sous forme liquide, ce qui rend cette distinction encore plus difficile. C'est dans ce contexte que l'effet antibactérien de trois alcools – l'éthanol, le

butanol et l'isopropanol a été étudié sur trois bactéries (*E. coli* (ATCC 8739), *S. aureus* (ATCC 6538) et *P.aeruginosa* (ATCC 9027)) à l'aide de la méthode de bioluminescence. Le choix de ces alcools a été motivé par leur disponibilité au laboratoire et leur usage courant dans la méthode sol-gel.

50 μ L de chaque alcool ont été ajoutés à une microplaque à 96 puits contenant 50 μ L de suspension bactérienne à une concentration de 10^9 UFC/mL. Ensuite, 50 μ L de réactif Promex, qui libère l'ATP des bactéries, ont été introduits dans le mélange, établissant ainsi une concentration finale d'alcool de 33 %.

Des témoins positifs ont été établis en utilisant 100 μ L d'ATP standard à une concentration de 10 μ mol/L, 50 μ L de suspension bactérienne à une concentration de 10^9 UFC/mL, et 50 μ L de réactif Promex. Un témoin négatif a été mis en place en utilisant 50 μ L d'alcool en présence de 50 μ L de réactif Promex. La quantité d'ATP a été mesurée en unités relatives de lumière (URL) à l'aide d'un luminomètre (FLUOstar OMEGA, BMG LABTECH).

7.2. Activité antimicrobienne sur support

Il existe cinq catégories de tests normalisés pour évaluer l'efficacité antimicrobienne des agents antimicrobiens incorporés sur des surfaces en fonction de leur mécanisme d'action : les tests à haut rapport surface-volume, tels que l'ISO 22196, les tests d'adhérence, tels que l'ISO/TR 19402, les tests de biofilm, tels que l'ISO/DIS 4768, les tests de zone d'inhibition, tels que l'ISO 20776-2, et les tests en suspension, tels que l'EN 1276 [202].

Les modifications et itérations du protocole normalisé sont courantes, soit en raison des préférences du laboratoire effectuant le test, telle que le choix des conditions de culture, soit en raison de l'optimisation du protocole en fonction des microorganismes ou du composé utilisé [202].

Dans cette étude, deux normes (ISO 22196:2011 et ISO 7581:2023) ainsi qu'une méthode semi-quantitative utilisant des lames gélosées ont été sélectionnés pour évaluer leur efficacité à décrocher les microorganismes des couches minces.

7.2.1. Norme ISO 7581 :2023

La norme ISO/DIS 7581 : 2023 [203] présente une méthode in vitro pour évaluer l'activité antibactérienne des surfaces non poreuses dans des conditions sèches proches de la réalité.

- ***Préparation des Microorganismes***

Les microorganismes sont d'abord cultivés sur du PCA gélosé et incubés pendant 18 à 24 heures. Une deuxième sous-culture est ensuite préparée pour s'assurer que les microorganismes sont dans une phase de croissance active et uniforme.

- ***Préparation de la suspension de microorganismes***

Une suspension de microorganismes est préparée dans de l'eau physiologique pour obtenir une concentration finale de 8 Log₁₀ UFC/mL, et elle est utilisée dans les 2 heures suivant sa préparation.

- ***Inoculation des échantillons***

1 µL de cette suspension est inoculé sur chaque échantillon. Les échantillons sont ensuite laissés à sécher sous un flux laminaire, et le temps nécessaire pour le séchage est enregistré comme T₀.

- ***Durée exposition***

La durée d'exposition correspond à la fin du séchage, et les échantillons sont exposés aux microorganismes dans les conditions ambiantes du laboratoire pendant 1 heure (T₁).

Les expériences sont réalisées en duplicata, avec une série de triplicata pour T₀ et une deuxième série pour les échantillons à T₁.

- ***Neutralisation et détachement des microorganismes***

Après l'exposition, les échantillons sont ajoutés à 10 mL de solution de neutralisation Eugon LT Sup (Bio Mérieux) en présence de 5 g de billes, puis agités au vortex pendant 1 minute pour permettre un décrochage optimal des microorganismes des lames.

- **Détermination de la concentration des microorganismes**

La concentration des microorganismes est déterminée par la méthode de dénombrement sur gélose. Elle est calculée selon la formule suivante :

$$C = \left(\frac{c}{(n_1 + 0,2 * n_2)} \right) * 10 * d \text{ en UFC}/\mu\text{L (26)}$$

Où,

C : est la concentration en microorganisme,

c : est la somme totale des nombres de colonies entre 14 et 330,

n_1 : est le nombre de répétition pris en compte dans la plus faible dilution,

n_2 : est le nombre de répétition pris en compte dans la plus haute dilution

d : est le taux de dilution correspondant à la plus faible dilution

7.2.2. *Evaluation de l'activité antibactérienne à l'aide des lames gélosées*

La méthode des lames gélosées est une approche semi-quantitative pour évaluer la population bactérienne sur des surfaces planes. Les lames utilisées sont dotées de deux faces contenant un neutralisant. L'**Annexe 2** décrit les caractéristiques de ces lames.

- **Inoculation des échantillons**

Une inoculation de 1 μL de suspension microbienne à une concentration de 8 Log_{10} UFC/mL est réalisée sur les échantillons, avec la période de séchage référencée comme T_0 .

- **Durée d'exposition**

La durée d'exposition, enregistrée après le séchage, est fixée à 1 heure (T_1). Les expériences sont conduites en triplicata, avec une première série pour les échantillons à l'instant initial (T_0) et une seconde série pour les échantillons après une heure d'exposition.

- **Application des lames gélosées sur les échantillons**

Après les périodes d'exposition (T_0 et T_1), les lames sont pliées à un angle de 90° et appliquées pendant 10 secondes contre la surface à examiner.

- **Incubation des lames gélosées**

Ensuite, les lames sont incubées à une température de $37\text{ °C} \pm 1\text{ °C}$ pendant 24 à 48 heures.

- **Evaluation de la croissance bactérienne**

Après l'incubation, la croissance des microorganismes est évaluée sur les lames gélosées et la concentration microbienne est estimée.

La **Figure 35** donne le nombre approximatif de microorganismes exprimé en Log_{10}

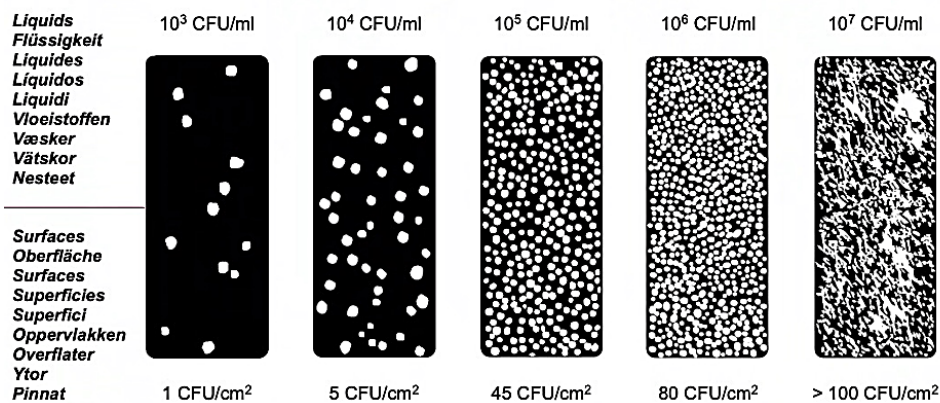


Figure 35: Interprétation des résultats selon le manuel d'utilisation de [204].

7.2.3. Norme ISO 22196 :2011

La norme ISO 22196 :2011 [205], adaptation de la norme japonaise JIS Z2801[206], propose une méthode *in vitro* pour évaluer l'activité antimicrobienne des surfaces en plastique traitées et d'autres surfaces non poreuses. Elle mesure la réduction du nombre de microorganismes viables après leur incubation sur ladite surface dans des conditions humides (99% d'humidité relative) à une température de 37 °C . Cette méthode vise à assurer un contact optimal entre les agents antimicrobiens présents et l'inoculum bactérien, favorisant ainsi une efficacité bactéricide maximale [207].

- **Préparation des microorganismes**

Les bactéries sont d'abord cultivées sur un milieu de culture (5,0 g d'extrait de viande, 10,0 g de peptone, 5,0 g de chlorure de sodium et 15,0 g de poudre d'agar dans 1 L d'eau

distillée) et incubées à une température de $(35 \pm 1)^\circ\text{C}$ pendant 16 à 24 heures. Ensuite, elles sont transférées sur un nouveau milieu de culture.

- ***Préparation de la suspension microbienne***

Une suspension microbienne contenant $6 \text{ Log}_{10} \text{ UFC/mL}$ est préparée dans un bouillon nutritif BN (3,0 g d'extrait de viande, 10,0 g de peptone et 5,0 g de chlorure de sodium dans 1 000 ml de distillat) dilué au 1/500.

- ***Inoculation et incubation des échantillons***

0,1 mL de cette suspension est déposé sur l'échantillon. Un film de couverture en polypropylène (2 x 5 cm²) est appliqué sur l'échantillon, qui est ensuite incubé pendant 24 heures à 35°C dans des conditions d'humidité maximale ($\geq 90\%$). Les bords du film de couverture doivent toujours se situer à une distance de 0,25 cm à 0,5 cm à l'intérieur du bord de l'échantillon sur tous les côtés afin d'éviter tout débordement.

- ***Décrochage et dénombrement des microorganismes***

Après l'incubation, les échantillons sont immergés dans 10 mL de milieu de culture Eugon LT Sup pour décrocher les cellules microbiennes. La concentration des bactéries est déterminée par la méthode de dénombrement sur gélose. Les expériences ont été réalisées en triplicata.

- ***Calcul de la concentration microbienne***

La concentration microbienne sur les échantillons est estimée selon la formule suivante :

$$N = (100 \times C \times D \times V) / A \text{ en UFC/cm}^2 \text{ (27)}$$

Avec,

N : représente le nombre de micro-organismes viables récupérés par cm² par échantillon de test

C : correspond au décompte moyen des colonies pour les trois plaques en triplicata

D : est le facteur de dilution pour les plaques comptées

V : représente le volume, en ml, d'Eugon LT Sup ajouté à l'échantillon.

Dans la suite de cette étude, nous avons investigué la quantité de NPs lixiviée dans la solution d'Eugon LT Sup lors de l'agitation en présence de billes, en appliquant la nouvelle méthode de décrochage des microorganismes que nous avons développée. Une analyse sera

ensuite présentée concernant la capacité de l'Eugon LT Sup à neutraliser les NPs ainsi dissoutes. Il est crucial de s'assurer qu'il n'y ait aucun effet inhibiteur sur les micro-organismes lors de leur décrochage, étant donné que l'activité antimicrobienne est évaluée pendant la phase d'incubation.

7.2.4. Méthodologies d'analyse de la lixiviation et de la neutralisation des nanoparticules de ZnO

a) Analyse de la lixiviation de nanoparticules de ZnO par ICP

Pour vérifier si l'agitation au vortex des échantillons de films minces entraîne la lixiviation de NPs de ZnO dans la solution de neutralisant, une analyse élémentaire préliminaire par ICP a été réalisée. La procédure était la suivante :

- 0,1 mL de solution d'eau physiologique a été déposé sur un film mince de ZnO, puis recouvert par un film en polypropylène de 2x5 cm².
- L'échantillon a été incubé à 35°C et d'humidité relative $\geq 90\%$ pendant 24 heures.
- Ensuite, l'échantillon a été placé dans 10 mL de solution Eugon LT Sup avec 10 g de billes et agité au vortex pendant 1 minute.
- L'échantillon a été ensuite retiré, et la solution a été analysée par ICP pour détecter la présence d'ions Zn²⁺.

Les expériences ont été réalisées en duplicata.

b) Validation de la neutralisation de l'activité antibactérienne des nanoparticules par l'Eugon LT Sup

L'efficacité de l'Eugon LT Sup à neutraliser l'activité antibactérienne des NPs de ZnO lixiviées lors de la mesure de la concentration bactérienne a été examinée. Pour ce faire :

- 0,1 mL de solution de NB 1/500 sans bactéries ont été déposées sur des films minces de 0,25 M propanol.
- Ensuite, les films ont été incubés selon les conditions expérimentales de la norme ISO 22196:2011 modifiée.
- Après 24 heures d'incubation, l'échantillon a été placé dans 10 mL d'Eugon LT Sup.
- Le mélange a été soumis au vortex pendant 1 minute en présence de 10 g de billes de 1 mm.
- Ensuite, 0,1 mL de suspension de *S. aureus* à une concentration de 6 log₁₀ UFC/mL a été ajouté au mélange.

- Enfin, la concentration bactérienne dans le mélange est déterminée par dénombrement sur gélose.

Les expériences ont été réalisées en duplicata. Nous avons choisi *S. aureus* car cette bactérie s'est montrée la plus sensible aux NPs en poudres. La concentration bactérienne après contact avec l'échantillon a été déterminée à l'aide de la formule :

$$L_i = \log_{10} (c * d * 10,1) / 0,1 \text{ en } \text{Log}_{10} \text{UFC/mL} \quad (28)$$

Avec,

L_i : La concentration des bactéries après ajout dans la solution d'Eugon LT Sup en Log_{10} UFC/mL,

c : Le nombre totale de colonies,

d : Le facteur de dilution

La section suivante détaille la méthode employée pour évaluer la cytotoxicité des NPs.

8. Analyse de la toxicité des nanoparticules par la méthode au rouge neutre

L'innocuité des NPs ayant montré l'activité antibactérienne la plus élevée a été analysée sur des fibroblastes dermiques humains. Cette analyse a été réalisée à l'aide de la méthode du rouge neutre, présentée comme suit :

• *Culture des fibroblastes humains dermiques*

Les fibroblastes dermiques humains ont été cultivés dans un milieu DMEM supplémenté en par 10% de SVF et contenant de la pénicilline, de la streptomycine et de l'amphotéricine B.

• *Incubation des cellules*

200 μL de la solution contenant les cellules ont été ajoutées à des plaques de culture cellulaire à 96 puits et incubés pendant 24 heures à 37°C . Après cette période, le DMEM a été retiré et 200 μL de solution de NPs (1- 200 $\mu\text{g/mL}$) ont été ajoutés. Les plaques ont ensuite été incubées pendant 24 heures supplémentaires à 37°C . La concentration des cellules était de 50 000 cellules/mL. La gamme de concentrations en NPs étudiée s'étend de 0,1 $\mu\text{g/mL}$ à 221 $\mu\text{g/mL}$. Le choix de ces concentrations a été déterminé en fonction de la concentration surfacique des nanoparticules déposées sur les films de peinture (voir *Chapitre 4*), les calculs ayant été réalisés conformément à la méthodologie décrite dans [208]. La surface d'un puit étant

de 0,36 cm², une concentration en NPs de 221 µg/mL correspond à une concentration surfacique de 123 µg/cm², ce qui est proche de la concentration surfacique en NPs sur les films de peinture étudiés dans le cadre des tests bactériens au *Chapitre 4*.

- **Test de cytotoxicité**

La cytotoxicité des NPs a été évaluée en suivant le protocole fourni par le kit d'essai de cytotoxicité cellulaire "Neutral Red cytotoxicity test" d'Abcam. Brièvement, les milieux ont été retirés des puits, qui ont ensuite été lavés avec une solution de lavage diluée au 1/10. Après avoir retiré la solution de lavage, 150 µL de solution de rouge neutre diluée au 1/100 ont été ajoutés dans les puits et incubés pendant 2 heures. Après incubation, le rouge neutre a été retiré des puits, qui ont de nouveau été lavés avec la solution de lavage. Ensuite, 150 µL de solution de solubilisation diluée au 1/2 dans du méthanol ont été ajoutés aux puits, suivis d'une agitation pendant 20 minutes. Le rouge neutre incorporé est endocyté par les seules cellules vivantes, La solubilisation finale après les lavages successifs permet ainsi de libérer dans le surnageant le rouge neutre et d'estimer la viabilité cellulaire par détection colorimétrique.

- **Lecture des résultats**

Après les 20 minutes d'agitation des cellules dans la solution de solubilisation, les échantillons sont placés dans le lecteur de microplaques FLUOstar® Omega. La densité optique est alors mesurée à 540 nm, longueur d'onde à laquelle le rouge neutre est absorbé.

Le pourcentage de cytotoxicité a été calculé à l'aide de la formule suivante :

$$\% \text{ Cytotoxicité} = \frac{D.O.Témoin - D.O.Echantillon}{D.O.Témoin} * 100 \quad (29)$$

Où,

$D.O.Témoin$: représente la densité optique du témoin comprenant les cellules seules sans les NPs et,

$D.O.Echantillon$: représente la densité optique de l'échantillon comprenant les cellules en présence des NPs.

L'IC₅₀ est déterminée sur GrapPad Prism 9.

Chapitre 3

Effet de la taille des nanoparticules de ZnO sur leur activité antibactérienne et leur toxicité

L'objectif principal de ce chapitre est de mettre en lumière l'impact de la taille des nanoparticules de ZnO en suspension sur leur activité antibactérienne. Pour commencer, la première partie sera consacrée à l'étude sur l'effet antibactérien des solvants de synthèse. La seconde partie se concentre sur la synthèse par chimie douce de nanoparticules de ZnO avec des tailles contrôlées. La troisième partie est dédiée à la préparation d'une dispersion stable des nanoparticules. La quatrième partie, analyse l'influence de la taille des nanoparticules sur leur activité antibactérienne. La cinquième partie et avant dernière partie de ce chapitre porte sur l'examen de l'activité antimicrobienne de ces nanoparticules sur la levure *Candida albicans*. Enfin, l'étude de la cytotoxicité des NPs de ZnO sur des fibroblastes dermiques sera présentée.

1. Activité antibactérienne des alcools de synthèse

L'effet antibactérien de l'éthanol, du butanol et de l'isopropanol à 33% est représenté sur la **Figure 36** où « r » représente le pourcentage de réduction d'ATP. Toutes les expériences ont été effectuées en double.

La **Figure 36** révèle une diminution de l'ATP des bactéries en présence d'alcools. Parmi les trois bactéries examinées, le butanol et l'isopropanol ont démontré une réduction plus significative du taux d'ATP que l'éthanol. Ces observations indiquent que l'éthanol, le butanol et l'isopropanol présentent une activité contre les bactéries.

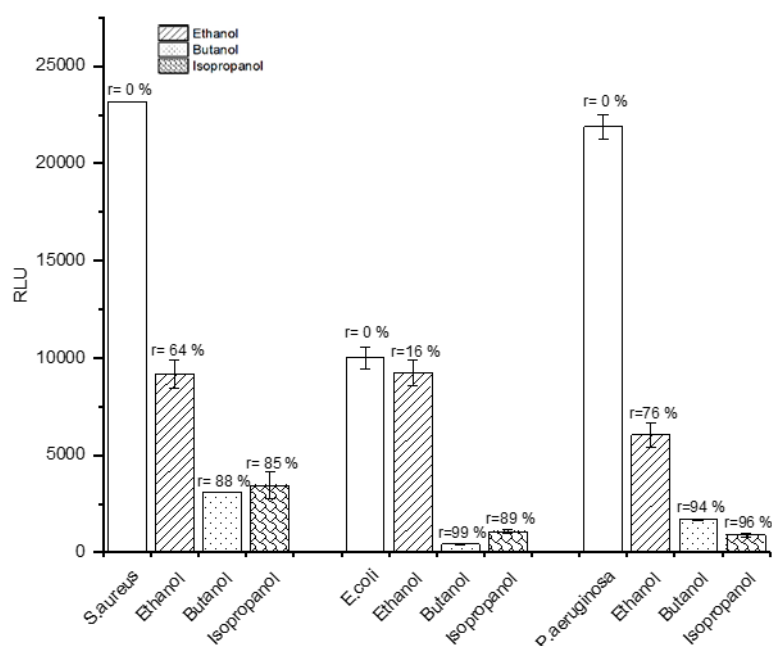


Figure 36 : Mesure d'ATP dans des échantillons d'éthanol, de butanol et d'isopropanol en présence de *S. aureus*, *E. coli* et *P. aeruginosa*.

Compte tenu de l'activité antimicrobienne observée des alcools, l'étude a été réorientée vers l'extraction des NPs sous forme de poudre. Celles-ci ont ensuite été redispersées dans un solvant exempt d'activité antimicrobienne, afin de minimiser son interaction dans l'évaluation de l'activité des NPs.

Par ailleurs, l'objectif principal de ce chapitre étant d'étudier l'influence de la taille des NPs sur leur activité antimicrobienne, une étude préalable des paramètres de synthèse influençant la taille des poudres de NPs a été réalisée et fait l'objet du paragraphe suivant.

2. Synthèse de nanoparticules de ZnO de tailles variables et contrôlées par le procédé sol-gel

Partant du postulat que la diminution de la taille des NPs entraîne une augmentation significative de leur réactivité, cette observation a motivé une exploration approfondie de l'influence de ce paramètre sur leur activité antimicrobienne. Cette section a donc pour objectif de réaliser une étude paramétrique des conditions de synthèse afin d'obtenir des particules aux tailles variées et contrôlées, permettant ainsi une analyse approfondie de l'impact de la taille sur leur efficacité antibactérienne.

2.1. Etude de l'influence des paramètres de synthèse sur la taille des nanoparticules de ZnO

Afin de produire des NPs de ZnO présentant une variété de tailles, une étude paramétrique a été menée sur les différents paramètres de synthèse tels que le type de solvant, le ratio $[\text{MEA}]/[\text{Zn}^{2+}]$ (a), le taux d'hydrolyse (h), ainsi que le ratio $[\text{OH}^-]/[\text{Zn}^{2+}]$, susceptibles d'influencer la taille des NPs obtenues.

2.1.1. Influence de la longueur de la chaîne carbonée de l'alcool

L'analyse de l'influence de la longueur de la chaîne carbonée sur la taille des NPs de ZnO repose sur le principe selon lequel les propriétés physico-chimiques du solvant, telles que la polarité, la viscosité et la constante diélectrique, peuvent influencer les cinétiques de nucléation/croissance et d'agglomération des particules pendant la synthèse [209, 210]. En effet, les solvants jouent un rôle majeur dans la stabilité, la morphologie, ainsi que sur la phase et la taille des particules [211]. Des études ont montré que la croissance et le grossissement des particules dépendent fortement du solvant, en raison de sa viscosité, de sa solubilité et de son énergie de surface [212]. Le solvant organique agit comme un agent coiffant, qui se lie à la surface des particules, limitant ainsi la croissance cristalline et influençant à la fois la morphologie et la taille des particules [213].

Dans cette étude, nous avons examiné l'influence de trois alcools- Méthanol, Isopropanol et butanol sur la taille, la formation et la cristallisation des NPs de ZnO à basse température (70°C), avec un taux d'hydrolyse $[\text{H}_2\text{O}]/[\text{Zn}^{2+}]$ (h) de 10, un rapport $\text{MEA}/\text{Zn}^{2+}$ (a) de 1 et une durée d'agitation de 22 heures.

Le **Tableau 4** présente les caractéristiques physico-chimiques des solvants étudiés. On peut noter que l'allongement de la chaîne carbonée des alcools diminue la constante diélectrique et augmente la viscosité.

Tableau 4 : Caractéristiques physico-chimiques des solvants.

Alcool	Méthanol	Propanol	Butanol
Chaîne carbonée	CH ₃ -	-CH ₂ -CH ₂ -CH ₃	-(CH ₂) ₃ -CH ₃
Point d'ébullition	64,7 °C	97 °C	117,7 °C
Moment dipolaire (D)	1,70	1,68	1,66
Constante diélectrique ϵ à 20°C	32,7	20,3	17,8
Viscosité (m Pa.s) à 20°C	0,54	2,03	2,9

Les diffractogrammes des échantillons obtenus sont présentés dans la **Figure 37**.

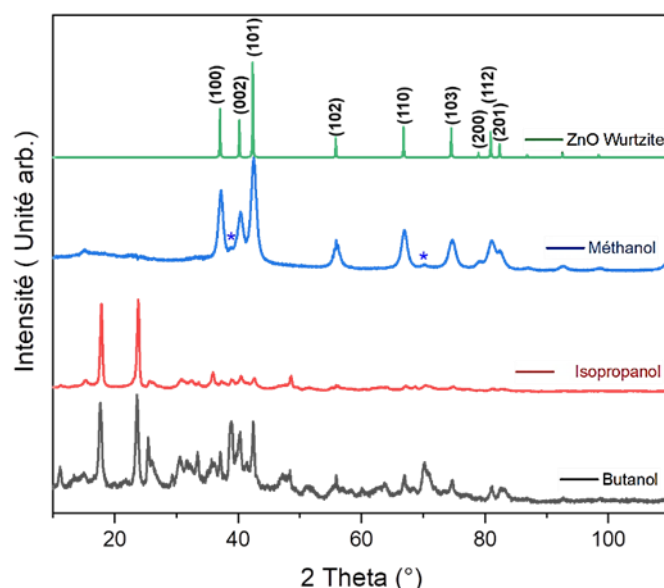


Figure 37 : Synthèse de nanopoudres de ZnO à 70°C en utilisant divers alcools, avec un rapport [H₂O/Zn²⁺] de 10 et un ratio MEA/Zn²⁺ de 1 pendant 22h.

* espèces d'hydroxyde de zinc.

On observe la présence des pics de l'acétate de zinc dans les échantillons issus du butanol et de l'isopropanol. En revanche, l'échantillon préparé à partir du méthanol révèle des pics caractéristiques du ZnO de structure wurtzite observés aux angles 2 θ , 37°, 40°, 42°, 56°, 67°, 75°, 81° correspondant respectivement aux plans (100), (002), (101), (102), (110), (103), (112). Ces pics sont accompagnés de traces d'hydroxyde de zinc aux angles 38° et 70° [214]. Ces

observations suggèrent que les échantillons synthétisés dans le butanol et l'isopropanol n'ont pas abouti à la cristallisation en ZnO, ce qui indique que les réactions sol-gel n'ont pas été effectives dans ces solvants. À l'inverse, le méthanol s'est révélé plus efficace pour induire la formation de ZnO cristallin, suggérant que la cristallisation du ZnO est davantage favorisée par l'utilisation d'un alcool à chaîne carbonée plus courte.

Il a été précédemment constaté que la constante diélectrique augmente à mesure que la longueur de la chaîne carbonée de l'alcool diminue. Cette constante, qui reflète la capacité de dissociation du solvant, semble être un facteur déterminant dans la conversion de l'acétate de zinc en ZnO cristallisé. Dans le cas du méthanol, sa constante diélectrique élevée, associée à sa viscosité relativement faible, facilite cette conversion [215-217]. De plus, l'augmentation de la solubilité du précurseur de zinc dans le méthanol favorise une augmentation de la sursaturation, essentielle à la nucléation du ZnO [218, 219]. Enfin, la faible viscosité du méthanol par rapport aux autres solvants permet une diffusion plus rapide des solutés, favorisant ainsi davantage le processus de cristallisation dans ce solvant.

Étant donné que la température de 70°C s'est révélée insuffisante pour convertir complètement l'acétate de zinc en ZnO de structure wurtzite sans impuretés dans le méthanol, il a été nécessaire d'augmenter la température de synthèse. Cette décision repose sur l'hypothèse que l'augmentation de la température favorise la cristallisation de l'oxyde de zinc en augmentant l'énergie d'activation des réactions sol-gel et en diminuant la viscosité. Pour la suite de cette étude, le solvant choisi est le butanol, en raison de sa température d'ébullition élevée de 117°C, qui permet d'explorer une large gamme de températures tout en évitant son évaporation. Ainsi, le butanol est utilisé pour la synthèse des NPs dans le reste de cette étude.

2.1.2. Influence de la température de synthèse sur la taille des nanoparticules de ZnO

La **Figure 38** présente les diffractogrammes DRX des poudres de NPs de ZnO élaborées à différentes températures (70°C, 94°C, 80°C et 110°C), avec un ratio MEA/Zn²⁺ (a) de 1, un taux d'hydrolyse [H₂O]/[Zn²⁺] (h) de = 10 et une durée de synthèse de 22 heures dans le butanol.

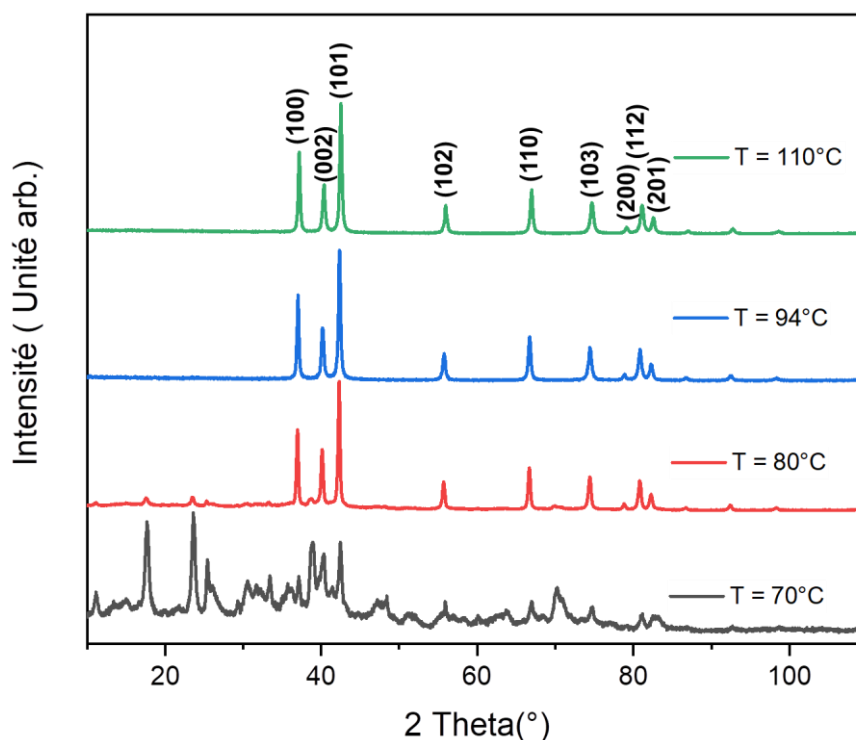


Figure 38 : Diffractogrammes RX de poudres de nanoparticules de ZnO élaborées à différentes températures (MEA/Zn²⁺ = 1, H₂O/Zn²⁺ = 10, 22 heures, dans le butanol).

À 80°C, la conversion du précurseur est presque complète, comme en témoigne la présence de pics caractéristiques du ZnO de structure wurtzite, accompagnée de traces d'espèces d'hydroxyde de zinc et d'acétate de zinc. Lorsque la température de synthèse dépasse 94°C et atteint jusqu'à 110°C, les espèces d'hydroxyde disparaissent, indiquant la formation de NPs de ZnO Wurtzite monophasé.

La **Figure 39** illustre l'affinement de Rietveld de l'échantillon élaboré à 94°C.

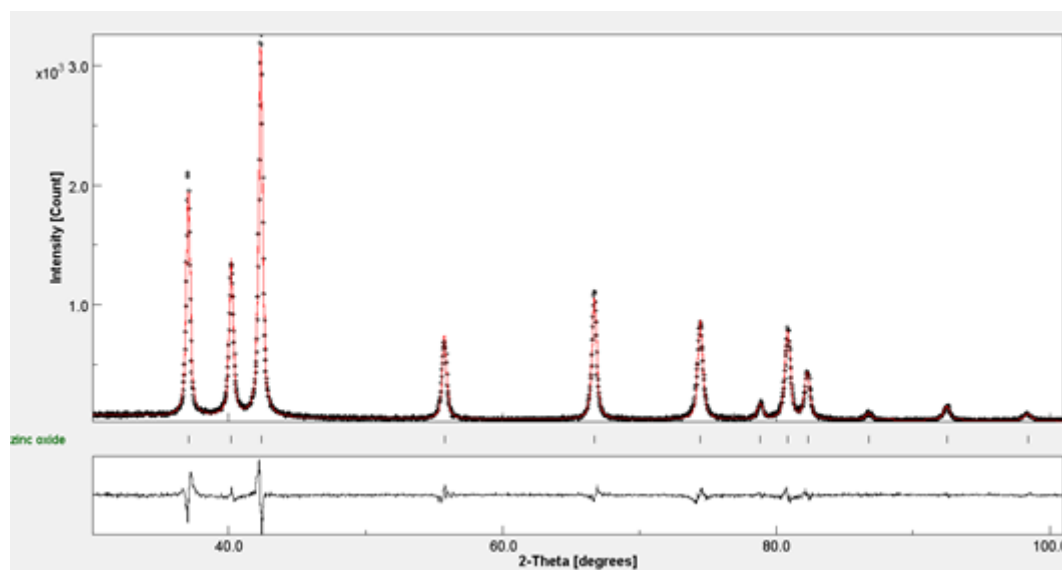


Figure 39 : Affinement de Rietveld de poudres de nanoparticules de ZnO élaborées à 94°C dans le butanol à un ratio $\text{MEA}/\text{Zn}^{2+} = 1$; un taux d'hydrolyse $\text{H}_2\text{O}/\text{Zn}^{2+}=10$ et une durée d'agitation de 22h.

Le **Tableau 5** présente les résultats de l'affinement de Rietveld, où "Sig" ou "Sigma" désigne l'écart-type des différences entre les intensités observées et celles calculées des pics de diffraction. L'affinement est de bonne qualité en raison des faibles valeurs de Sigma observées (Sig = 1,44 et 1,77) et confirme la formation de NPs de ZnO monophasé. Les paramètres de maille sont de $a=b=3,257 \text{ \AA}$ et $c=5,217 \text{ \AA}$ et $a=b=3,251 \text{ \AA}$ et $c=5,210 \text{ \AA}$ pour les échantillons synthétisés à 94°C et 110°C, respectivement, qui sont proches des valeurs reportées dans la littérature ($a=b= 3,249 \text{ \AA}$ et $c = 5,206 \text{ \AA}$). Une quantité négligeable de microdéformation est obtenue pour tous les échantillons, ce qui indique que la taille des particules est la principale contribution à l'élargissement des pics. Les diamètres cristallins des NPs sont respectivement de 57 nm et 54 nm pour des température à 94°C et 110°C. Ce faible écart de température n'a pas été suffisant pour induire une variation significative de la taille des NPs.

Tableau 5: Paramètres cristallins des nanoparticules en fonction de la température de synthèse (MEA/Zn²⁺ = 1, H₂O/Zn²⁺ = 10, 22 heures, dans le butanol).

Températures	Taille des échantillons (nm)	Paramètres de mailles (Å)		Microdéformation (%)	Sig
		a= b	c		
94°C	57	3,257	5,217	0,0002	1,44
110°C	54	3,244	5,195	0,0009	1,90

Dans les sections suivantes, nous examinons l'influence d'autres paramètres tels que le ratio MEA/Zn²⁺, le taux d'hydrolyse et la durée d'agitation sur la taille des NPs, tout en maintenant constants la température de synthèse à 110°C et l'utilisation du butanol comme solvant.

2.1.3. Influence du ratio MEA/Zn²⁺ (a) sur la taille des nanoparticules de ZnO

La **Figure 40** représente les diffractogrammes DRX des échantillons élaborés à différents ratios MEA/Zn²⁺ (a), avec un taux d'hydrolyse H₂O/Zn²⁺ (h) fixé à 10 et une durée d'agitation de 22 heures.

Le rôle du MEA dans la réaction peut être multiple, comme énoncé dans le premier chapitre : il peut servir de base faible grâce à la présence de groupements amines sur sa structure, favorisant ainsi la dissolution du précurseur. De plus, en tant que ligand bidentate avec ses groupements amines et hydroxyles (-NH et -OH), il se fixe à la surface des NPs, empêchant ainsi leur grossissement. Ces différentes fonctions permettent au MEA de jouer un rôle important sur la taille et la structure des NPs.

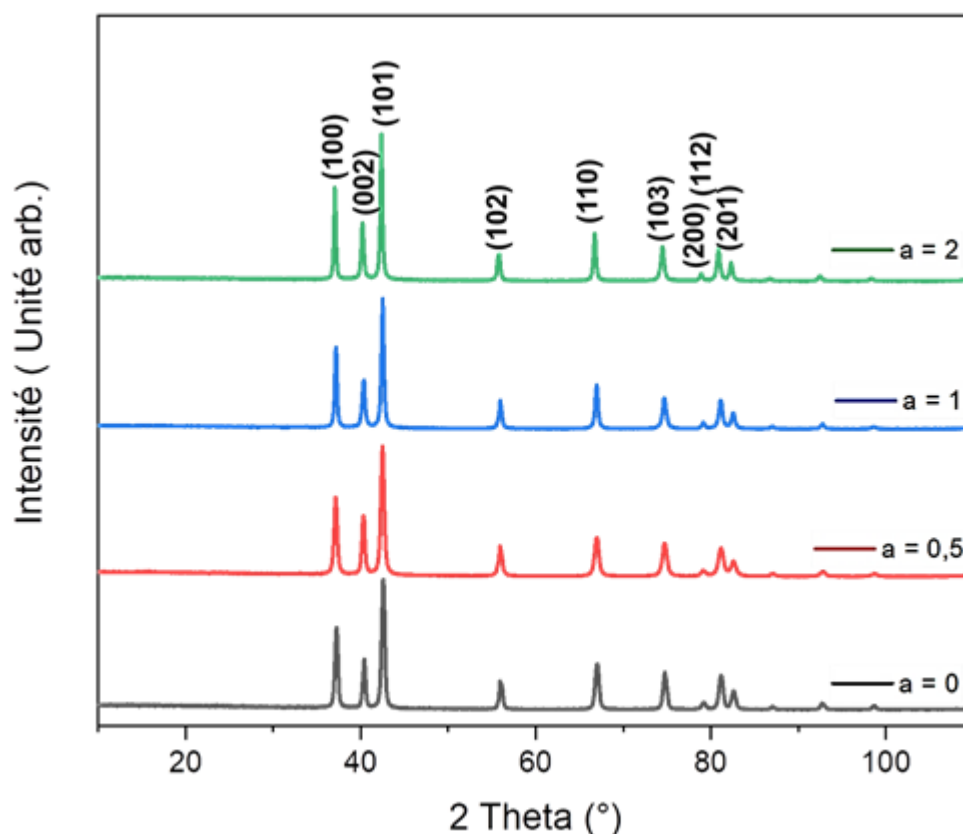


Figure 40 : Diffractogrammes DRX de nanopoudres de ZnO élaborées à différents ratio MEA/ Zn^{2+} (a) ($T= 110^{\circ}C$, $H_2O/Zn^{2+} = 10$, 22 heures, dans le butanol).

On observe pour tous les échantillons la formation de ZnO Wurtzite monophasé indépendamment de la présence de ligand. La largeur des pics est plus fine lorsque le ratio du ligand MEA par rapport aux ions de zinc augmente, ce qui indique une augmentation de la taille des NPs proportionnelle au ratio MEA/ Zn^{2+} .

Le **Tableau 6** résume la taille des NPs calculée par affinement de Rietveld et les paramètres de maille en fonction du ratio MEA/ Zn^{2+} . Les faibles valeurs du Sigma attestent de la bonne qualité de l'ajustement du modèle cristallographique, confirmant ainsi la formation de la structure Wurtzite du ZnO.

Les paramètres des mailles obtenus sont très proches de ceux de la structure cristalline Wurtzite du ZnO. Les déformations sont toujours négligeables indiquant que la taille des NPs est le seul paramètre contribuant à l'élargissement des pics. Cette taille diminue avec le ratio MEA, en accord avec les observations faites sur les diffractogrammes DRX. Le diamètre des particules évolue de 47 nm à 54 nm, puis à 65,6 nm lorsque le ratio MEA/ Zn^{2+} augmente de 0,5 à 1, puis à 2. Particulièrement, les NPs synthétisées avec un ratio MEA/ Zn^{2+} de 0 sont plus grandes que

celles obtenues avec des ratios plus élevés (0,5 et 1), affichant une taille de 60 nm. Cela est probablement dû à une hydrolyse incontrôlée qui accélère la croissance des particules.

De ces résultats, nous pouvons déduire que la concentration en MEA a une influence sur la taille des NPs : elle augmente avec le ratio MEA/Zn²⁺. Ces résultats suggèrent que le mécanisme réactionnel est relativement complexe, impliquant une compétition entre le rôle du MEA en tant que ligand et sa fonction de base faible en présence d'eau.

Tableau 6: Paramètres cristallins des nanoparticules en fonction du ratio MEA/Zn²⁺ (T= 110°C , H₂O/Zn²⁺ = 10, 22 heures, dans le butanol).

MEA/Zn ²⁺	Taille des échantillons (nm)	Paramètres de mailles (Å)		Microdéformation (%)	Sig
		a= b	c		
0	60	3,245	5,197	0,0016	1,61
0,5	47	3,245	5,198	0,0019	1,92
1	54	3,244	5,195	0,0009	1,90
2	66	3,246	5,199	0,0009	1,67

2.1.4. Influence du taux d'hydrolyse [H₂O]/[Zn²⁺](h) sur la taille des nanoparticules de ZnO

Dans cette section, nous examinons comment le taux d'hydrolyse influence la taille des NPs. La **Figure 41** illustre les diffractogrammes par rayons X des échantillons de nanopoudres de ZnO, obtenus à différents taux d'hydrolyse (h= 5 ; 10 et 15). Le ratio MEA/Zn²⁺ est fixé à 1 et la durée de synthèse de 22 heures.

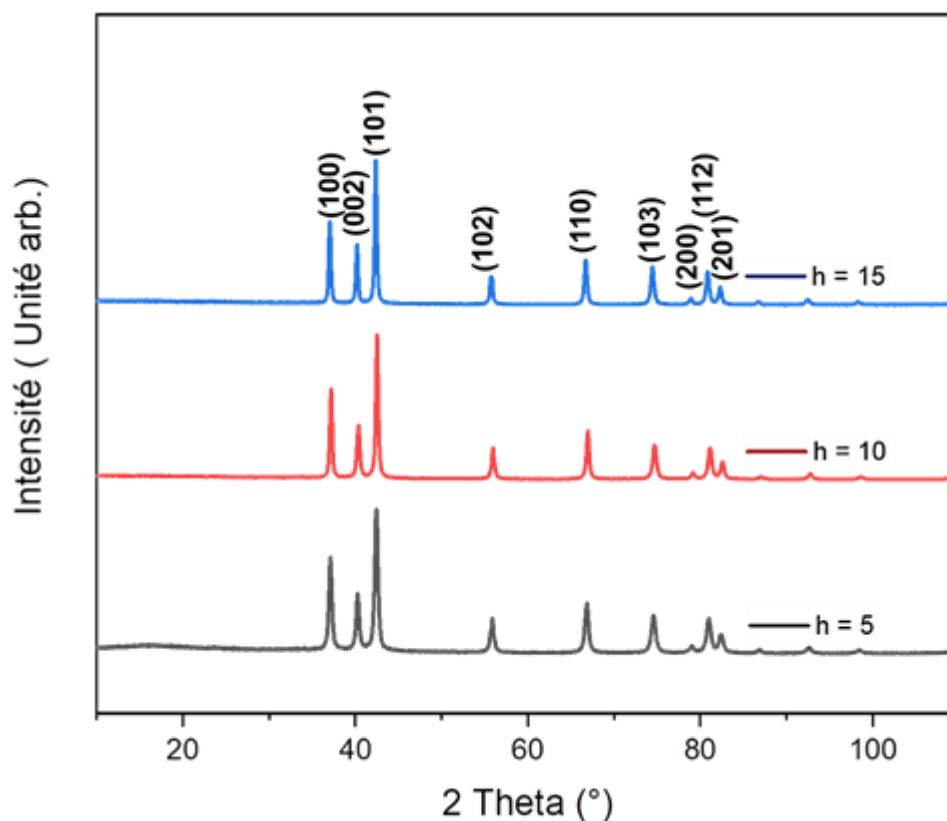


Figure 41 : Diffractogrammes RX de nanopoudres de ZnO élaborées à différents taux d'hydrolyse $\text{H}_2\text{O}/\text{Zn}^{2+}$ (h) ($T = 110^\circ\text{C}$, $\text{MEA}/\text{Zn}^{2+} = 1$, 22 heures, dans le butanol).

Tous les échantillons sont bien cristallisés dans la structure wurtzite hexagonale du ZnO. Malgré un taux d'hydrolyse élevé ($h = 15$), les particules présentent une bonne cristallinité, démontrant ainsi le rôle modérateur du MEA en tant qu'agent chélatant dans les réactions d'hydrolyse-condensation. Par ailleurs, il est observable que la largeur des pics diminue avec l'augmentation du taux d'hydrolyse, ce qui souligne l'augmentation de la taille des NPs avec le taux d'hydrolyse.

L'effet du taux d'hydrolyse sur la réduction de la taille des particules est confirmé par les résultats de l'affinement de Rietveld, présentés dans le **Tableau 7**. Les paramètres de maille sont stables et proches de ceux de la structure wurtzite du ZnO. Les microdéformations sont négligeables et la taille des particules augmente avec le taux d'hydrolyse. Le diamètre des NPs est de 41 nm, 54 nm, et 73 nm pour des taux d'hydrolyse de 5, 10 et 15, respectivement.

Tableau 7 : Paramètres cristallins des nanoparticules en fonction du taux d'hydrolyse

$\text{H}_2\text{O}/\text{Zn}^{2+}$ (T= 110°C , MEA/ Zn^{2+} = 1, 22 heures, dans le butanol).

$\text{H}_2\text{O}/\text{Zn}^{2+}$	Taille des échantillons (nm)	Paramètres de mailles (Å)		Microdéformation (%)	Sig
		a= b	c		
5	41	3,258	5,219	0,0008	1,41
10	54	3,244	5,195	0,0009	1,90
15	73	3,255	5,214	0,0008	1,41

L'augmentation de la taille des particules avec le taux d'hydrolyse peut s'expliquer par le fait que l'hydrolyse favorise les réactions de polymérisation inorganique qui conduisent à la formation des NPs plus grosse [220]. Ainsi, l'ajout d'eau dans la réaction favorise la croissance des particules.

2.1.5. Influence de la durée de synthèse sur la taille des nanoparticules de ZnO

Nous explorons dans cette section l'influence de la durée de synthèse sur la taille des NPs. La **Figure 42** présente les diffractogrammes des échantillons obtenus à différentes durées de synthèse. Ces expériences ont été réalisées dans des conditions identiques, avec un rapport molaire [MEA]/[Zn^{2+}] fixé à 1 et un taux d'hydrolyse $\text{H}_2\text{O}/\text{Zn}^{2+}$ fixé à 10.

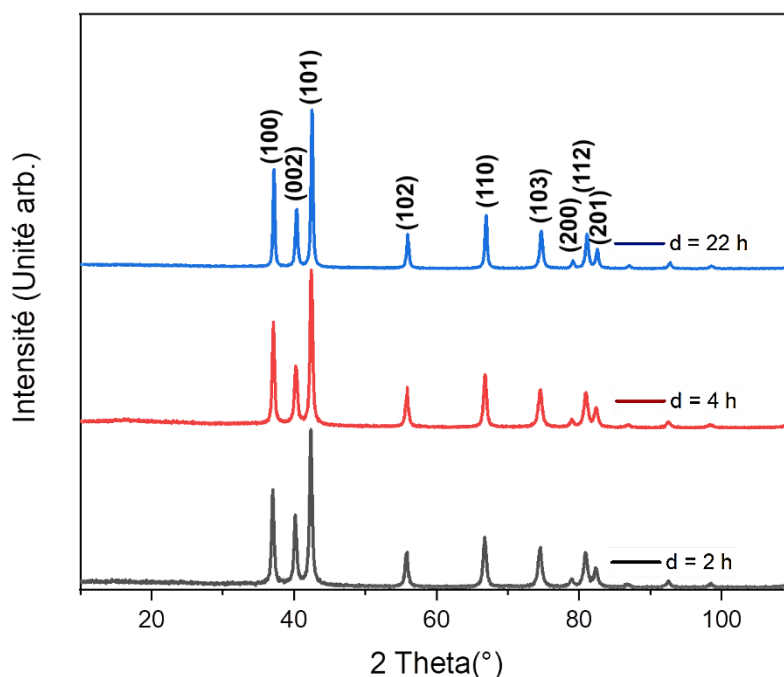


Figure 42: Diffractogrammes RX de nanopoudres de ZnO élaborées à différentes durées de synthèse ($T = 110^{\circ}\text{C}$, $\text{MEA}/\text{Zn}^{2+} = 1$, $\text{H}_2\text{O}/\text{Zn}^{2+} = 10$, dans le butanol).

Tous les échantillons sont cristallisés en ZnO Wurtzite pure. La largeur des pics de diffraction devient légèrement plus fine lorsque la durée de synthèse augmente, montrant une augmentation de la taille des NPs pour des périodes de synthèse plus longues.

Ces observations sont approfondies par les résultats de l'analyse Rietveld, présentés dans le **Tableau 8**. La taille des NPs passe de 35 nm à 39 nm, puis à 54 nm lorsque la durée de synthèse augmente de 2 heures à 4 heures, puis à 22 heures. La prolongation de la durée de synthèse favorise la croissance des particules par le mûrissement d'Ostwald.

Tableau 8: Paramètres cristallins des nanoparticules en fonction de la durée de synthèse ($T = 110^{\circ}\text{C}$, $\text{MEA}/\text{Zn}^{2+} = 1$, $\text{H}_2\text{O}/\text{Zn}^{2+} = 10$, dans le butanol).

Durée de synthèse	Taille des échantillons (nm)	Paramètres de mailles (Å)		Microdéformation (%)	Sig
		a= b	c		
2 h	35	3,253	5,211	0,0008	1,32
4 h	39	3,244	5,196	0,0008	1,36
22 h	54	3,244	5,195	0,0009	1,90

2.2. Synthèse de nanoparticules de ZnO à faible température

Cette section vise à explorer la possibilité de développer un procédé de synthèse à plus basse température, permettant ainsi de réduire davantage les coûts de production. Comme l'a montré la **Figure 38** (*Section 2.1.2 : Influence de la température de synthèse sur la taille des nanoparticules de ZnO*), l'échantillon élaboré à 80°C n'était pas monophasé et présentait quelques espèces d'hydroxydes de zinc et d'acétate de zinc.

Les stratégies mises en place pour convertir les espèces d'hydroxyde de zinc détectées sur la **Figure 38** impliquent :

- La réduction du ratio MEA/Zn²⁺ à a=0,5 en gardant le taux d'hydrolyse à 10.
- L'ajout de 1,44 mL d'une solution de NaOH à 1M à la place de l'eau en gardant le ratio MEA/Zn²⁺ à 1. Le choix de ce volume a été fait car il correspond à la quantité d'eau à ajouter lorsque le taux d'hydrolyse est fixé à 10.

La **Figure 43** présente les diffractogrammes obtenus par rayons X des échantillons.

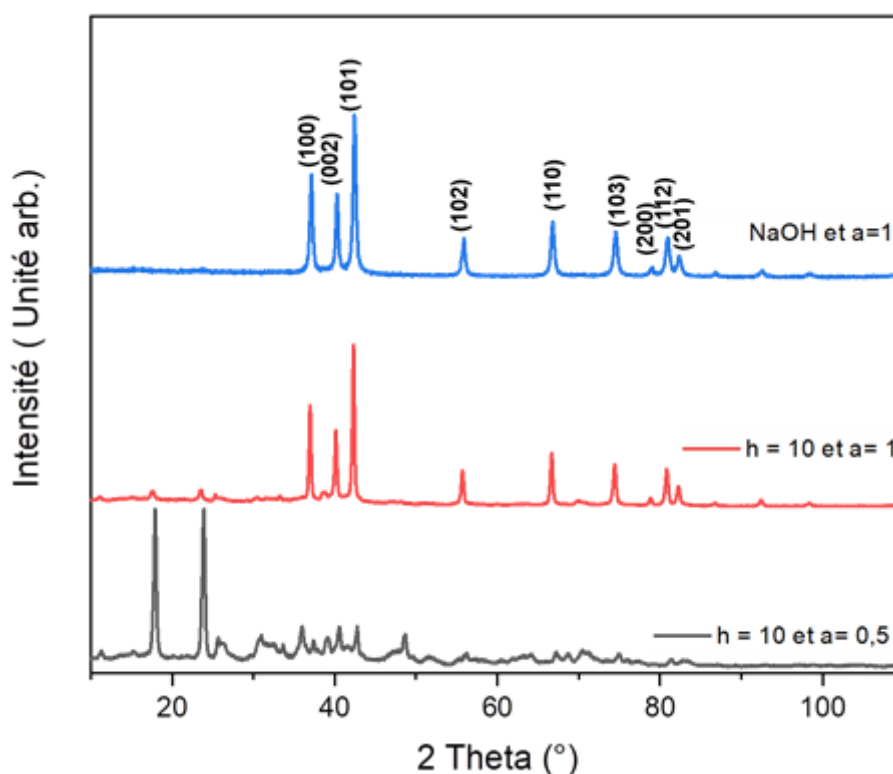


Figure 43: Diffractogrammes RX des échantillons synthétisés à 80°C, en variant le taux d'hydrolyse H₂O/Zn²⁺ (h), du rapport MEA/Zn²⁺ (a) et en présence de soude.

La réduction du ratio MEA/Zn²⁺ à 0,5 n'a pas permis la formation de ZnO Wurtzite, comme le montre la présence du précurseur de zinc sur le diffractogramme en **Figure 43**. Nous pensons que cette diminution du ratio de ligand a entraîné une dissolution insuffisante du précurseur à 80°C, empêchant ainsi les réactions de polymérisation inorganiques. En revanche, l'ajout d'une base plus forte, comme la soude, a permis la formation de ZnO Wurtzite monophasé pur. Cela est probablement dû à la plus grande force basique de la soude, qui pourrait augmenter l'énergie nécessaire à la formation des NPs de ZnO.

Le **Tableau 9** présente les paramètres cristallins des nanoparticules cristallisées et pures.

Tableau 9 : Paramètres cristallins des nanoparticules cristallisées et pures préparées à partir de la soude.

Durée de synthèse	Taille des échantillons (nm)	Paramètres de mailles (Å)		Microdéformation (%)	Sig
		a= b	c		
NaOH et a=1	52 nm	3,237	5,184	0,0019	1,85

Les faibles valeurs du Sigma corroborent la formation d'une phase pure de ZnO de structure wurtzite. Les paramètres de maille mesurés sont constants et en accord avec les données de la littérature, soit (a=b=3,237 Å ; c=5,184 Å)

La température de 80°C ne permet pas la condensation des hydroxydes de zinc lorsque le taux d'hydrolyse est élevé [221]. Nous supposons qu'un faible rapport OH⁻/Zn²⁺, combiné à un ratio MEA/Zn²⁺ suffisant, permet d'obtenir des NPs de ZnO monophasé de petite taille. Ces résultats confirment la possibilité d'un mécanisme réactionnel complexe, impliquant une compétition entre le MEA et l'eau. Ils ouvrent la voie à l'utilisation potentielle d'une base organique en remplacement de l'eau, afin d'améliorer le contrôle sur la taille des particules et d'optimiser les conditions de synthèse.

Cette étude paramétrique a permis d'identifier les facteurs influençant la taille des NPs et de produire des NPs de tailles variées, allant de 35 nm à 66 nm. Pour la suite de cette étude, trois tailles distinctes ont été sélectionnées pour une caractérisation plus approfondie, en vue d'évaluer leur impact sur les propriétés antimicrobiennes. Le **Tableau 10** récapitule les paramètres de synthèse des NPs.

Tableau 10: Paramètres de synthèse des nanopoudres de ZnO étudiées en interaction avec les microorganismes.

Taille de l'échantillon	[MEA]/[Zn ²⁺]	[H ₂ O]/[Zn ²⁺]	Durée d'agitation	Température	Solvant
22 nm	1	5	22 h	80 °C	Butan-1-ol
35 nm	1	10	2 h	110°C	
66 nm	2	10	22 h	110°C	

2.3. Caractérisation des échantillons pour l'analyse des propriétés antibactériennes

Cette section aborde la diffraction des rayons X, l'affinement de Rietveld, la spectroscopie Raman, la microscopie électronique à transmission et à balayage (MET et MEB), ainsi que la spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier (FTIR) des échantillons de NPs de ZnO sélectionnés. Ces échantillons feront l'objet d'une étude de leurs effets antimicrobiens sur des microorganismes.

2.3.1. Analyse structurale

La **Figure 44** présente les diffractogrammes RX des échantillons, dont les paramètres de synthèse sont récapitulés dans le **Tableau 10**. L'affinement Rietveld de l'échantillon présentant la plus faible taille est présenté sur la **Figure 45**. Tous les échantillons de ZnO sont bien cristallisés en phase wurtzite sans phase secondaire, comme confirmé par la diffraction des rayons X (**Figure 44**) et l'affinement de Rietveld (**Figure 45**). L'analyse par affinement de Rietveld a montré la stabilité des paramètres de la maille (a, c) identiques à ceux reportés dans la littérature. Elle a également révélé des tailles variées : 22 nm, 35 nm et 66 nm (**Tableau 11**).

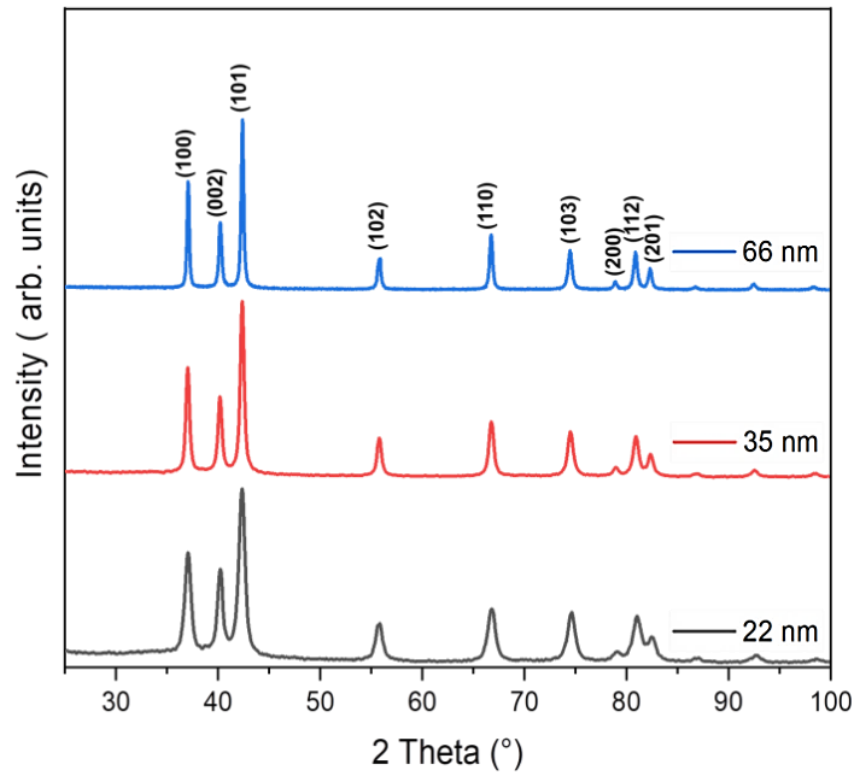


Figure 44 : Diffractogrammes RX des échantillons de nanoparticule de ZnO de tailles variables étudiés en interaction avec les microorganismes.

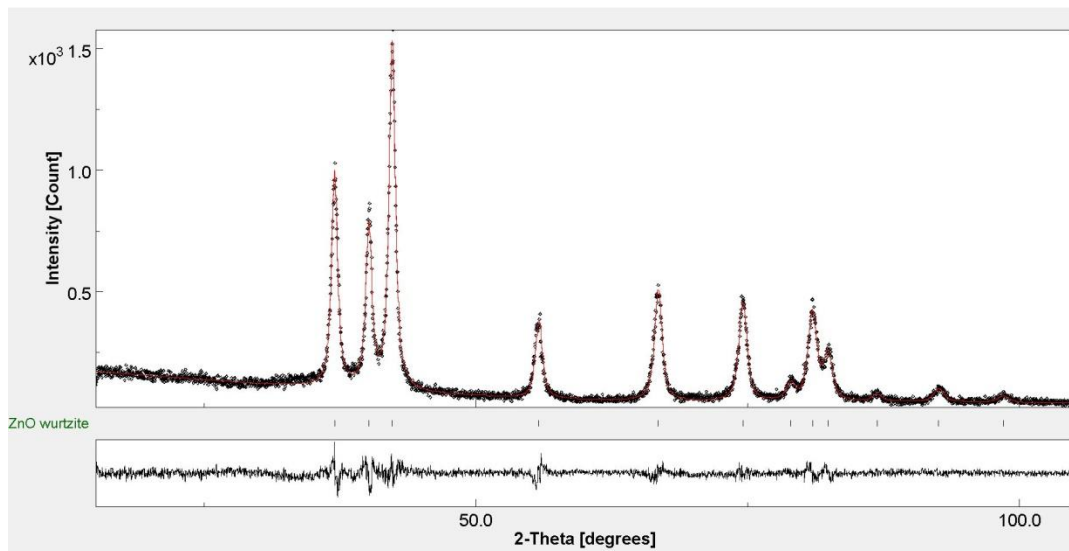


Figure 45: Affinement Rietveld de nanoparticules de ZnO de 22 nm.

Tableau 11 : Paramètres cristallographiques des nanoparticules de étudiées en interaction avec les microorganismes.

Taille des échantillons (nm)	Paramètres de mailles (Å)		Microdéformation (%)	Sig
	a= b	c		
22	3,248	5,201	0,002	1,18
35	3,251	5,207	0,001	1,21
66	3,253	5,210	0,001	1,60

2.3.2. Spectroscopies vibrationnelles

a) Spectroscopie Raman

Dans la **Figure 46**, nous présentons les spectres Raman des nanopoudres de ZnO. Tous les spectres Raman présentent des caractéristiques attribuées aux modes actifs de Raman du cristal wurtzite de ZnO, en accord avec les analyses de DRX. La bande prédominante observée à 437 cm^{-1} correspond au mode Raman E2 (haute), principalement associé aux vibrations de l'oxygène et caractéristique de la structure cristalline wurtzite [222]. À 330 cm^{-1} , la bande est identifiée comme la différence entre E2 (haute) et E2 (basse), représentant un mode Raman multiphonon d'ordre deux résultant du phonon de frontière de zone, confirmant ainsi la haute qualité structurale des échantillons [223, 224]. Les bandes à 636 cm^{-1} et 690 cm^{-1} sont attribuées aux modes TA + TO (acoustique transversale + optique transversale) et LA + TO (acoustique longitudinale + optique transversale), respectivement. De plus, la bande à 931 cm^{-1} peut être associée aux modes E1 (TO) + E1 (LO) (optique transversale + optique longitudinale) [224].

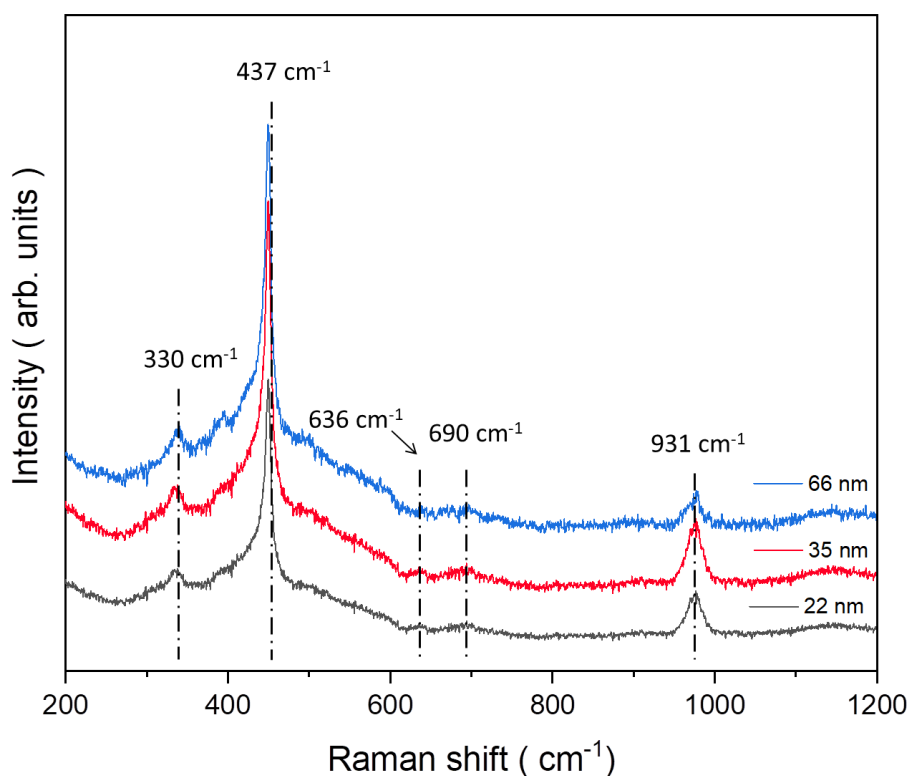


Figure 46 : Spectre Raman des échantillons de nanoparticules de ZnO de tailles variables étudiées en interaction avec les microorganismes.

b) Spectroscopie infrarouge à Transformée de Fourier (FTIR)

La spectroscopie FTIR permet d'identifier les groupes fonctionnels des composants actifs en analysant les pics d'absorption dans la région infrarouge. Les oxydes métalliques donnent généralement des bandes d'absorption dans la région des empreintes digitales, c'est-à-dire en dessous de 1000 cm^{-1} [225].

Les résultats du spectre FTIR de l'échantillon de 22 nm sont illustrés dans la **Figure 47**. La bande d'absorption dans la région à plus haute fréquence, autour de 3734 cm^{-1} , est attribué à l'étirement des groupements O-H, et la bande dans la plage inférieure à 1575 cm^{-1} est due à la déformation de O-H à la surface des particules, probablement dû à l'interaction entre les NPs et l'humidité [234, 235]. Toutes les autres bandes sont associées aux caractéristiques spécifiques des NPs de ZnO préparées [227]. La bande à 2987 cm^{-1} est attribuée à la vibration de l'étirement d'une fonction aldéhyde, probablement à la couverture de sa surface par des acétates [228]. Les bandes apparaissant près de $2272 - 2358\text{ cm}^{-1}$ indiquent l'adsorption de CO à la surface de l'oxyde et du CO₂ de l'air. La bande d'absorption principale est due à la vibration dans la région $500-1000\text{ cm}^{-1}$ de la liaison Zn-O de ZnO au pic de 538 cm^{-1} [227].

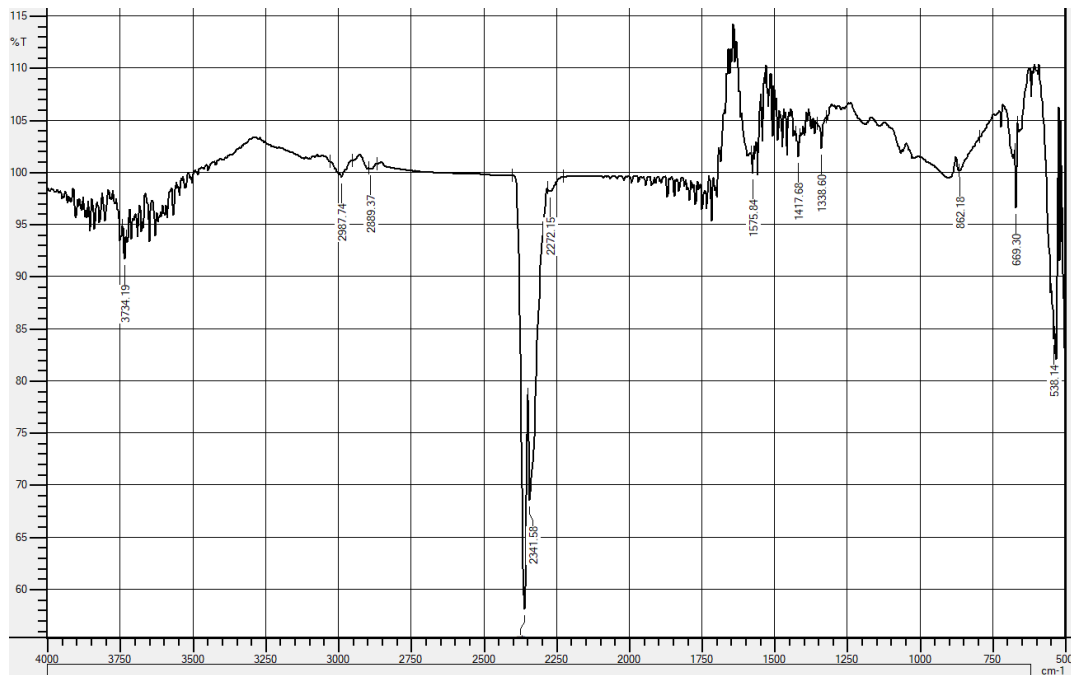


Figure 47 : Spectroscopie infrarouge par transformée de Fourier (FTIR) des nanoparticules de ZnO de 22 nm.

2.3.3. Analyses morphologiques

a) Analyse par Microscopie Electronique à Transmission (MET)

L'image à haute résolution obtenue par microscopie électronique à transmission (MET) pour l'échantillon de 22 nm confirme la formation de petites NPs de ZnO wurtzite bien cristallisées, avec un diamètre moyen mesuré à 20 nm (**Figure 48**). La distance interréticulaire calculée est de $d=2,79 \text{ \AA}$ qui correspond à la famille de plan (100) de la structure Wurtzite du ZnO. Malgré l'état d'agrégation des poudres, il semble que les particules soient sphériques et isotropes. Ces résultats concordent avec les données issues des mesures de la DRX.

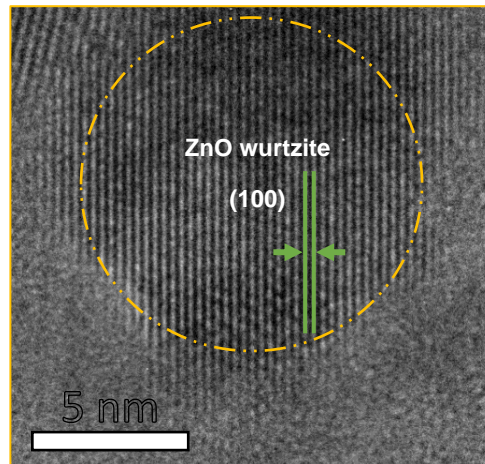


Figure 48 : Image MET de nanoparticules de ZnO de 22 nm

b) Analyse par Microscopie Electronique à Balayage (MEB)

La **Figure 49** présente la micrographie obtenue des NPs de diamètre cristallin de 35 nm. L'image révèle la présence d'agglomérats de NPs d'environ 500 nm, présentant une morphologie globalement pyramidale et parfois sphérique. Les agglomérats observés au MEB corroborent les résultats de la MET.

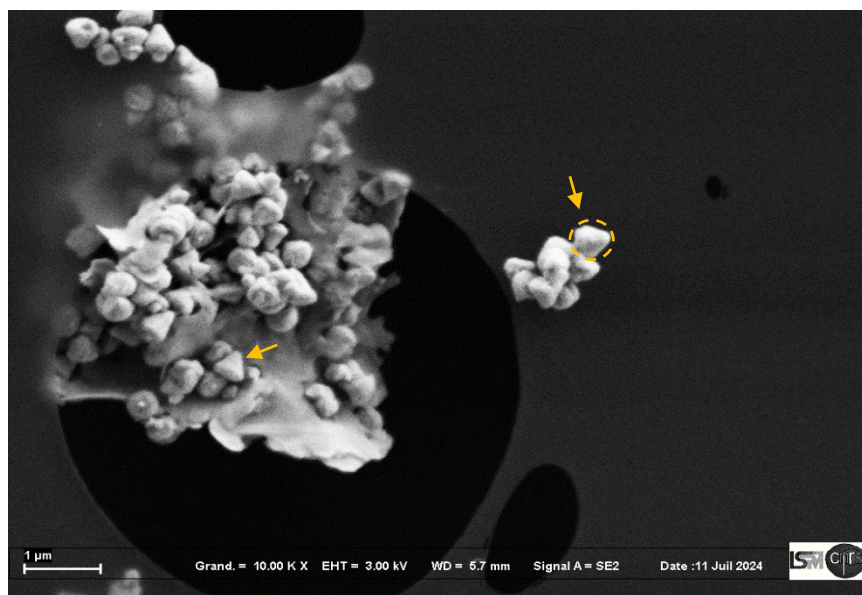


Figure 49 : Cliché MEB des nanoparticules de ZnO de 35 nm.

2.4 . Conclusion

Dans cette étude, nous avons exploré l'activité antibactérienne des alcools couramment utilisés dans le procédé sol-gel pour la synthèse de NPs, à savoir le butanol, l'isopropanol et le méthanol. Les résultats de cette analyse ont révélé que ces alcools exercent tous une activité

antibactérienne notable. Ainsi, pour s'affranchir de l'activité antibactérienne des solvants, les NPs ont été extraits sous forme de poudres.

Nous avons ensuite examiné l'influence de divers paramètres de synthèse sur la taille des NPs, afin de produire des particules de tailles distinctes et d'évaluer ensuite leur impact sur l'activité antimicrobienne. Parmi les paramètres ayant un effet significatif sur la taille des particules, nous avons identifié le type de solvant, le ratio MEA/Zn²⁺, ainsi que le taux d'hydrolyse. Le méthanol s'est révélé être le solvant le plus efficace pour la formation de ZnO, bien que les échantillons ainsi produits contiennent des traces d'espèces hydroxydes. Afin d'éliminer ces espèces, la température de synthèse a été augmentée, un procédé rendu possible grâce à l'utilisation du butanol, qui possède une température d'ébullition plus élevée comparée aux autres solvants étudiés, permettant ainsi une exploration plus large des conditions thermiques. Par conséquent, le butanol a été retenu comme solvant de synthèse pour le reste de l'étude. Ensuite, nous avons observé que des températures et des ratios MEA/Zn²⁺ plus élevées favorisaient la croissance des particules, tandis qu'un taux d'hydrolyse plus faible a conduit à des particules de plus petite taille.

Cette étude a permis d'obtenir des NPs dont les tailles varient entre 22 nm et 66 nm. Par la suite, trois échantillons présentant des tailles distinctes ont été sélectionnés pour des analyses supplémentaires visant à évaluer l'impact de leur taille sur l'activité antimicrobienne. Avant de mener cette évaluation, une étude préliminaire sur la stabilité des particules en suspension a été réalisée et fait l'objet de la section suivante.

3. Influence du dispersant sur la stabilité des nanoparticules

La stabilité de la dispersion des NPs de ZnO dans du Muller Hinton avec le polyacrylate de sodium est présentée sur la **Figure 50** après 24 heures d'incubation.

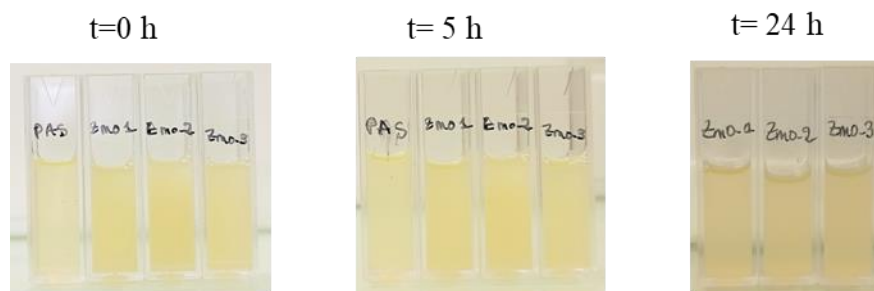


Figure 50 : Évolution de la stabilité des suspensions de nanoparticules dispersées dans du PAAS au fil du temps. ZnO-1 = 22 nm ; ZnO-2 = 35 nm et ZnO-3 = 66 nm.

La **Figure 51** illustre l'évolution de la densité optique des suspensions de nanoparticules de ZnO dispersées avec le PAAS sur une période de 3 heures. Les résultats montrent une bonne stabilité de la densité optique au cours de cette période, indiquant une bonne stabilité des suspensions. Aucune différence significative de stabilité n'a été observée entre les trois (3) tailles de NPs.

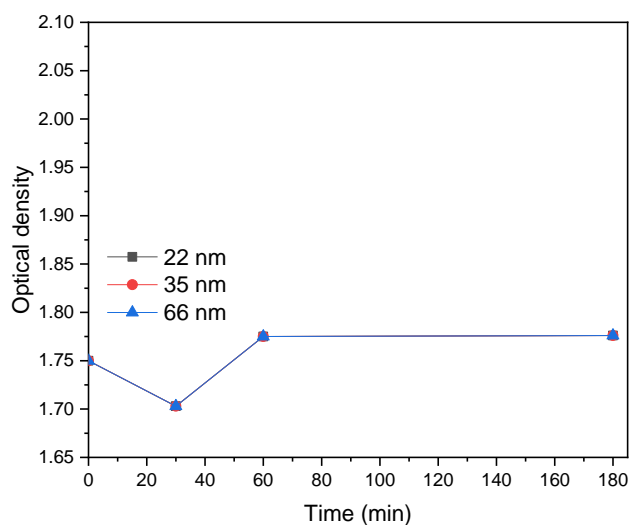


Figure 51 : Evolution des densités optiques des suspensions de nanoparticules au cours du temps.

L'importance de disperser les NPs dans un solvant dépourvu d'activité antimicrobienne a conduit à examiner la préparation de dispersions stables des poudres en suspension. Le milieu de culture utilisé pour les tests antimicrobiens a été sélectionné pour étudier la stabilité des suspensions, car il ne présente pas d'effet inhibiteur sur les microorganismes. De plus, la dispersion des NPs dans un liquide ne contenant que le milieu de culture a semblé pertinente, car elle permet de maintenir les microorganismes dans des conditions de croissance optimales pour leur évaluation en présence des NPs.

La dispersion stable des NPs de ZnO dans des milieux aqueux revêt une importance cruciale pour leur efficacité en tant qu'agents antimicrobiens, car elle peut influencer leur performance contre les microorganismes. En effet, une dispersion inefficace pourrait ralentir, par exemple, la diffusion des NPs à travers les membranes bactériennes, réduisant ainsi leur capacité à inhiber la croissance des bactéries. Dans cette étude, l'utilisation du polyacrylate de sodium (PAAS) a été explorée comme agent dispersant. Les résultats ont démontré la supériorité du PAAS en termes de stabilité par rapport aux autres agents testés. La constance de la densité optique des suspensions de NPs de ZnO dispersées avec le PAAS pendant une période de trois heures témoigne de cette stabilité. Ces observations suggèrent que le PAAS pourrait constituer une option prometteuse pour la dispersion des NPs de ZnO dans des milieux aqueux.

D'autres dispersants ont également été étudiés, notamment le Noir Eriochrome T, le dodécylsulfate de sodium, ainsi que l'éthylène glycol comme solvant de dispersion. Cependant, les résultats obtenus avec ces dispersants n'ont pas été concluants, et l'éthylène glycol a manifesté une activité antimicrobienne contre les bactéries, rendant son utilisation inappropriée pour cette application. De plus, la toxicité des dispersants ainsi que celle du liquide de dispersion, a été un facteur déterminant dans le choix de la méthode de dispersion. Le PAAS, en raison de sa toxicité modérée, a donc été préféré pour cette raison supplémentaire [229]. Les résultats concernant la stabilité des suspensions de NPs de 22 nm dispersées avec le SDS dans l'eau distillée sont présentés en **Annexe 3**.

Dans la section suivante, nous analysons l'impact de la taille des NPs de ZnO en suspension/solution sur leur activité antibactérienne.

4. Influence de la taille des nanoparticules de ZnO sur leur activité antibactérienne

Des études antérieures ont démontré que la réduction de la taille des NPs améliore leur activité antibactérienne [64, 230-233]. Babayevska et al. [64] ont constaté que les NPs de ZnO étaient plus efficaces que les microparticules contre *Escherichia coli* et *Staphylococcus aureus*. Ils ont expliqué cette différence en examinant le mécanisme par des mesures des espèces réactives de l'oxygène (ERO) et ont trouvé que les NPs produisaient plus d'ERO que les microparticules. Raghupathi et al. [231] ont également observé une activité antibactérienne supérieure des NPs de ZnO à des tailles réduites. Ils ont comparé les courbes de croissance des bactéries en présence de NPs de ZnO de différentes tailles (30 nm, 88 nm, 142 nm et 212 nm) à une concentration de 6 mM pendant des cultures de 6 heures. Malgré ces efforts, peu de

recherches ont été menées pour comparer la cinétique de croissance bactérienne en fonction de différentes tailles de NPs afin de comprendre le mode d'action dépendant de la taille.

L'originalité de cette section réside dans l'étude de l'influence de la taille des NPs sur la cinétique de croissance bactérienne, en se concentrant sur la période de latence et la vitesse spécifique de croissance des bactéries. Déterminer ces paramètres permet de mieux comprendre l'effet des NPs sur les mécanismes de croissance des souches bactériennes. L'étude cinétique des bactéries a été réalisée sur des bactéries Gram-négatives et Gram-positives en surveillant les variations de la densité optique bactérienne sur une période de culture de 24 heures avec différentes tailles et concentrations de NPs. La période de latence et le taux spécifique de croissance des bactéries ont été calculés à partir des données de densité optique. Au préalable, l'impact de la taille des trois NPs de ZnO de tailles distinctes sur leur activité antibactérienne a été examiné en déterminant leur concentration minimale inhibitrice (CMI) et leur concentration minimale bactéricide (CMB).

4.1. Corrélacion entre la taille des nanoparticules de ZnO et la concentration minimale inhibitrice (CMI)

La **Figure 52** présente la CMI de trois tailles (22 nm ; 35 nm et 66 nm) de NPs contre *E. coli* ; *P. aeruginosa* et *S. aureus*. La CMI représente la plus faible concentration de NPs de ZnO qui inhibe la croissance bactérienne visible après la période d'incubation. Une diminution significative de la CMI des NPs de ZnO contre *E. coli* a été observée à mesure que leur taille diminuait, avec des valeurs respectives de 0,45 mg/mL, 0,40 mg/mL et 0,85 mg/mL pour des tailles de 22 nm, 35 nm et 66 nm. De même, une réduction de la CMI a été notée pour *P. aeruginosa*, avec des valeurs diminuant de 1,25 mg/mL et 1,60 mg/mL à 1,85 mg/mL pour des tailles de 22 nm, 35 nm et 66 nm, respectivement. L'activité antibactérienne des NPs de ZnO contre *E. coli* et *P. aeruginosa* augmentait à mesure que leur taille diminuait. La CMI des NPs de ZnO contre *S. aureus* est restée stable à 0,15 mg/mL, quelle que soit leur taille.

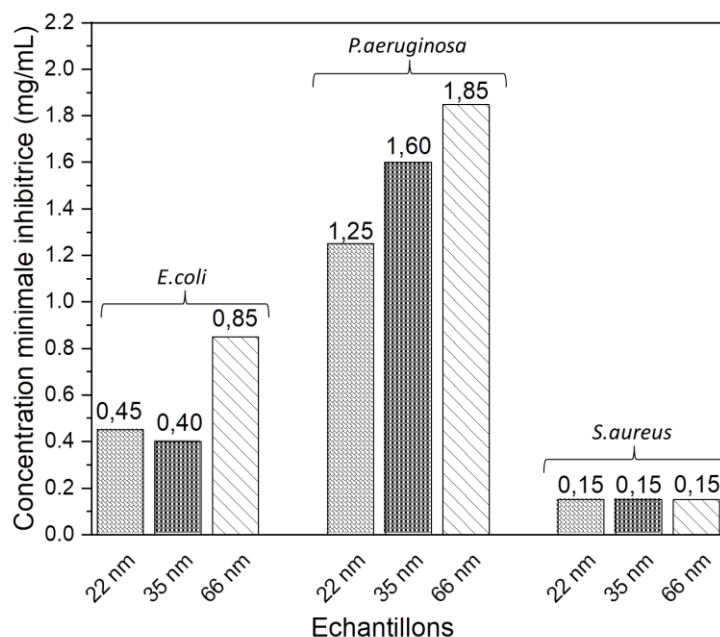


Figure 52 : Effet de la taille des nanoparticules de ZnO sur la CMI contre *E. coli*, *P. aeruginosa* et *S. aureus*.

4.2. Corrélation entre la taille des nanoparticules et la concentration minimale bactéricide (CMB)

L'influence de la taille des NPs de ZnO sur leur CMB est présentée sur la **Figure 53**. La CMB correspond à la plus faible concentration de NPs entraînant la mort de 99,9 % de la population bactérienne initiale. Il a été observé que la CMB des NPs contre les trois bactéries diminuait à mesure que leur taille diminuait, ce qui indique une amélioration de l'activité antibactérienne des NPs et confirme les résultats obtenus précédemment (**Figure 52**). Plus précisément, les valeurs étaient de 0,5 mg/mL, 0,6 mg/mL et 1,05 mg/mL pour des tailles de 22 nm, 35 nm et 66 nm contre *E. coli*, respectivement. Pour *P. aeruginosa*, les valeurs étaient de 11 mg/mL, 13 mg/mL et 15 mg/mL pour des tailles de 22 nm, 35 nm et 66 nm, respectivement. Pour *S. aureus*, les valeurs de la CMB étaient de 0,30 mg/mL, 1,55 mg/mL et 1,70 mg/mL pour des tailles de 22 nm, 35 nm et 66 nm, respectivement.

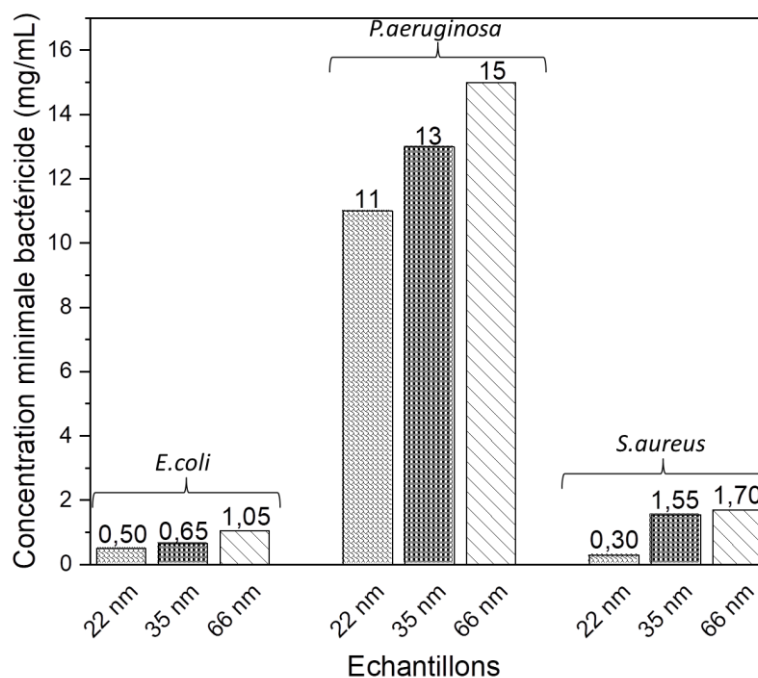


Figure 53 : Effet de la taille des NPs de ZnO sur leur CMB contre *E. coli*, *P. aeruginosa* et *S. aureus*.

4.3. Influence de la taille des nanoparticules sur la cinétique de croissance des microorganismes

4.3.1. Evolution de la densité optique de *P. aeruginosa* en présence de nanoparticules de ZnO de différentes tailles

La **Figure 54** montre l'évolution de la densité optique des bactéries *P. aeruginosa* en présence de différentes tailles de NPs : 22 nm (**Figure 54a**), 35 nm (**Figure 54b**) et 66 nm (**Figure 54c**), à diverses concentrations. L'augmentation de la concentration des NPs améliore leur activité antibactérienne, comme le montre la densité optique plus faible à des concentrations plus élevées. Pour les concentrations où la densité optique ne reste pas constante pendant 24 heures, la phase de latence — période où la densité optique reste égale à 0 avant d'augmenter — était plus longue avec des NPs plus petites. Cela indique une inhibition plus forte de la croissance bactérienne en présence de NPs de plus petite taille.

Par exemple, à une concentration de 1,35 mg/mL (en vert dans la **Figure 54**), la phase de latence des bactéries avec des NPs de 22 nm était plus longue qu'avec des NPs de 35 nm, qui était elle-même plus longue qu'avec des NPs de 66 nm. De même, le taux de croissance, indiqué par la pente, était plus élevé avec des NPs plus grandes, montrant une croissance bactérienne plus rapide et une inhibition moindre. En outre, la densité optique des bactéries à la fin de

l'incubation, liée au pourcentage d'inhibition, était plus élevée avec des NPs plus grandes. Ces observations montrent que l'inhibition des NPs sur la croissance de *P. aeruginosa* augmente à mesure que leur taille diminue.

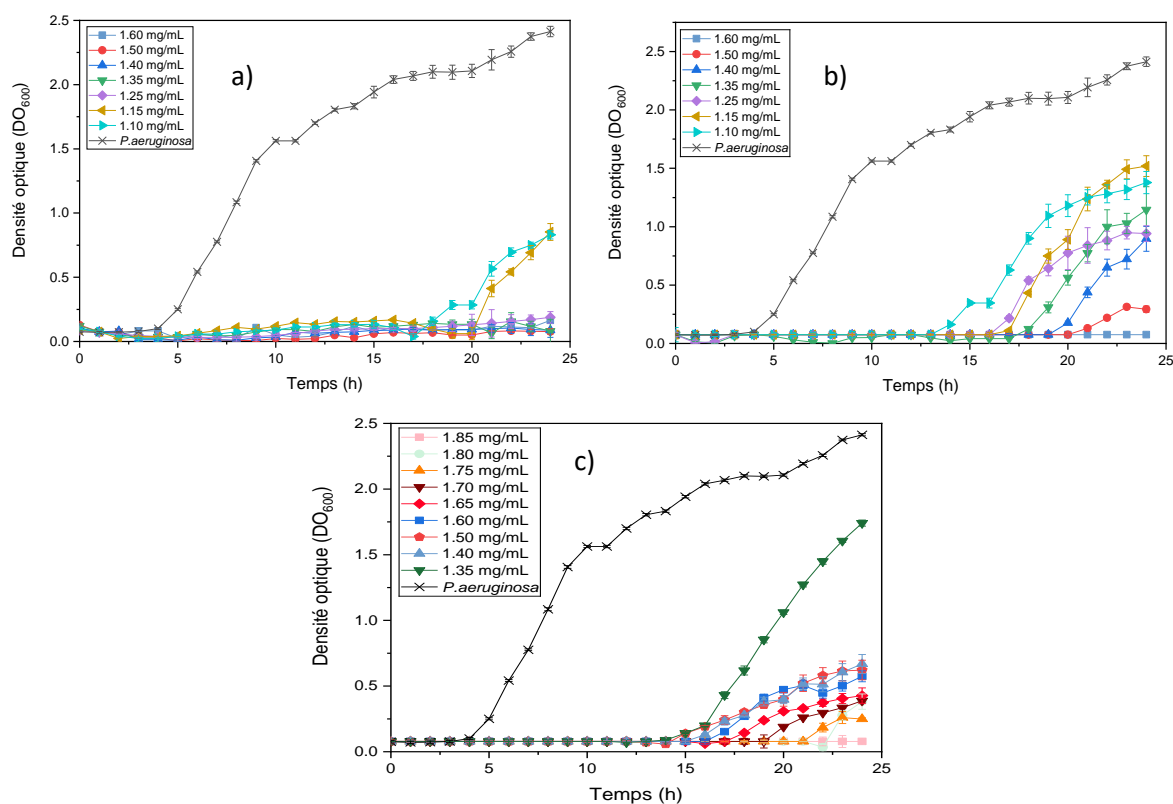


Figure 54: Croissance de la densité optique DO₆₀₀ de *P. aeruginosa* en contact avec des NPs de ZnO de (a) 22 nm; (b) 35 nm; et (c) 66 nm à différentes concentrations.

Ces résultats ont permis de calculer la période de latence, la vitesse spécifique de croissance, le pourcentage d'inhibition, et d'évaluer l'impact de la taille des NPs sur ces paramètres pour les bactéries *E. coli*, *P. aeruginosa* et *S. aureus*.

4.3.2. Etude comparative des paramètres cinétiques de bactéries en présence de nanoparticules de ZnO de différentes tailles

L'effet de la taille des NPs de ZnO sur les paramètres cinétiques des différentes bactéries est détaillé dans la **Figure 55**.

a) Influence sur la période de latence

Une meilleure observation de l'impact de la taille des NPs sur la cinétique de croissance bactérienne a été obtenue en examinant la phase de latence (**Figure 55-a**). La phase de latence, représentant le temps nécessaire aux bactéries pour initier leur multiplication après l'inoculation, montre une tendance générale chez tous les microorganismes : les NPs de ZnO

plus petites prolongent la période de latence bactérienne. À 0,1 mg/mL, la phase de latence est restée stable pour toutes les tailles chez *E. coli*, avec une moyenne de 4 h. Cependant, des réductions notables ont été observées à des concentrations plus élevées. Par exemple, à 0,25 mg/mL, la phase de latence d'*E. coli* a diminué de 8,5 h à 10 h à 4 h avec des NPs de 22 nm, 35 nm et 66 nm, respectivement. De même, à 0,30 mg/mL, elle a diminué à 12 h, 14,5 h et 4,5 h avec les mêmes tailles de NPs respectivement.

Pour *P. aeruginosa*, à une concentration de 1,35 mg/mL, la phase de latence a diminué de 23 h à 13 h avec des NPs de 22 nm, 35 nm et 66 nm. Cette réduction a également été observée à 1,50 mg/mL, où la phase de latence était de 24 h, 21 h et 15 h avec des NPs de 22 nm, 35 nm et 66 nm, respectivement. De même, à une concentration de 1,60 mg/mL, la phase de latence est restée à 24 h pour les tailles de 22 nm et 35 nm, et a diminué à 18 h pour les NPs de 66 nm.

Pour *S. aureus*, des différences distinctes dans la durée de la phase de latence ont été observées à différentes concentrations et tailles de NPs. À une concentration de 0,05 mg/mL, la phase de latence a persisté pendant 9 h avec des NPs de 22 nm, tandis qu'elle était réduite à 7 h avec des NPs de 35 nm et 66 nm. À une concentration de 0,1 mg/mL, la phase de latence s'est prolongée à 15 h avec des NPs de 22 nm, tandis qu'elle est restée à 10 h avec des NPs de 35 nm et 66 nm.

b) Influence sur le taux spécifique de croissance

En ce qui concerne le taux spécifique de croissance, représentant le taux de prolifération bactérienne en phase exponentielle, nous observons également une tendance générale chez tous les microorganismes (**Figure 55-b**) : les NPs de ZnO plus petites réduisent le taux spécifique de croissance. Pour *E. coli*, la vitesse spécifique de croissance était de 0,67 h⁻¹ avec des NPs de 22 nm, comparé à 0,8 h⁻¹ avec des NPs de 35 nm et 66 nm à une concentration de 0,1 mg/mL. À 0,25 mg/mL, il a diminué à 0,2 h⁻¹, 0,3 h⁻¹ et 0,49 h⁻¹ avec des NPs de 22 nm, 35 nm et 66 nm, respectivement. À une concentration de 0,3 mg/mL, le taux spécifique de croissance était de 0,35 h⁻¹ avec des NPs de 22 nm et 35 nm, et de 0,65 h⁻¹ avec des NPs de 66 nm.

Pour *P. aeruginosa*, les taux étaient de 0 h⁻¹, 0,25 h⁻¹ et 0,50 h⁻¹ avec des NPs de 22 nm, 35 nm et 66 nm, respectivement, à 1,35 mg/mL. À une concentration de 1,50 mg/mL, les taux étaient de 0 h⁻¹, 0,12 h⁻¹ et 0,14 h⁻¹ pour les tailles respectives de NPs. Enfin, à une concentration de 1,60 mg/mL, le taux spécifique de croissance de *P. aeruginosa* était de 0 h⁻¹ pour les NPs de 22 nm et 35 nm, et de 0,10 h⁻¹ pour les NPs de 66 nm.

Pour *S. aureus*, à 0,05 mg/mL, le taux spécifique de croissance était de 0,71 h⁻¹, 0,77 h⁻¹ et 0,85 h⁻¹ avec des NPs de 22 nm, 35 nm et 66 nm, respectivement. En moyenne, il était de 0,52 h⁻¹ avec des NPs de 22 nm et 35 nm, et de 0,67 h⁻¹ avec des NPs de 66 nm.

c) *Influence sur le pourcentage d'inhibition*

Le pourcentage d'inhibition augmente généralement avec la diminution de la taille des NPs, indépendamment des bactéries étudiées (**Figure 55-c**). Bien qu'aucun impact significatif ne soit observé avec *E. coli* et *S. aureus*, l'influence de la taille des NPs de ZnO est évidente avec *P. aeruginosa*. Les NPs de ZnO de 22 nm et 35 nm montrent des niveaux d'inhibition similaires sur la croissance d'*E. coli* à toutes les concentrations testées, sauf à 0,3 mg/mL, où les pourcentages d'inhibition étaient de 75 %, 77 % et 66 % pour les NPs de 22 nm, 35 nm et 66 nm, respectivement.

L'impact de la taille des NPs sur le pourcentage d'inhibition est particulièrement marqué chez *P. aeruginosa* à toutes les concentrations testées. À 1,35 mg/mL, les pourcentages d'inhibition ont diminué de 100 %, 60 % à 39 % pour les NPs de 22 nm, 35 nm et 66 nm, respectivement. De même, à 1,50 mg/mL, les pourcentages d'inhibition ont diminué de 100 %, 85 % à 80 % pour les tailles de NPs respectives par rapport au contrôle. À 1,60 mg/mL, les pourcentages d'inhibition ont diminué de 100 % pour les NPs de 22 nm et 35 nm à 88 % pour les NPs de 66 nm.

Pour *S. aureus*, les pourcentages d'inhibition étaient identiques pour les NPs de 35 nm et 66 nm à toutes les concentrations testées : 37 % pour les NPs de 35 nm et 66 nm à 0,05 mg/mL, 34 % pour les NPs de 22 nm à 0,1 mg/mL, 56 % à 0,1 mg/mL, et 74 % pour les NPs de 22 nm à 0,1 mg/mL.

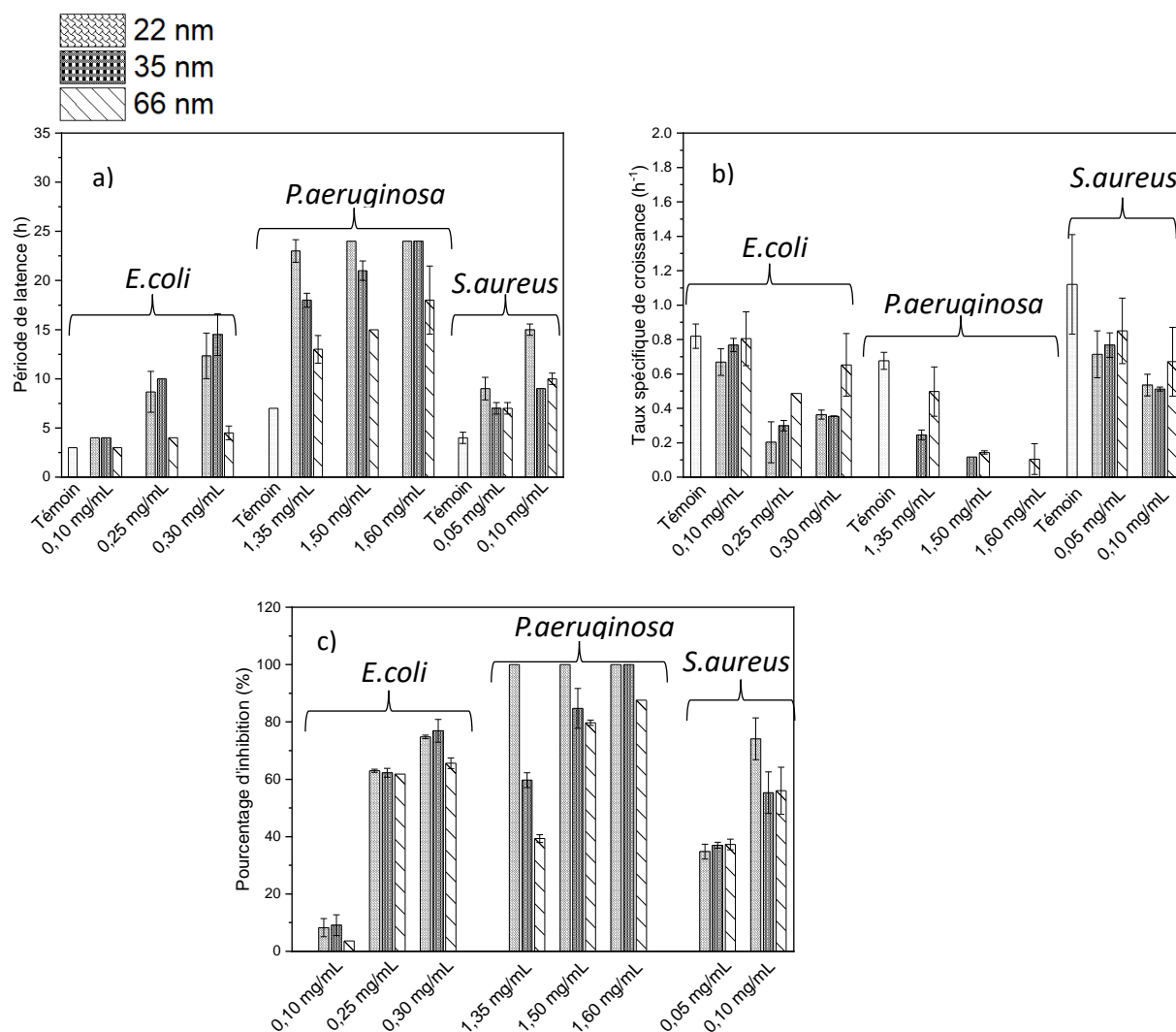


Figure 55 : Effet de la taille et de la concentration des NPs de ZnO sur les paramètres de croissance d'*E. coli*, *P. aeruginosa* et *S. aureus* : a) Période de latence; b) Taux de croissance spécifique ; et c) Pourcentage d'inhibition.

4.3.3. Influence de la taille des NPs sur l'inhibition de la croissance des bactéries

La **Figure 56** représente l'évolution de la densité optique des bactéries en présence de NPs de diverses tailles à différentes concentrations. Elle montre une augmentation de l'inhibition de la croissance bactérienne avec la diminution de la taille des NPs pour tous les microorganismes, à différentes concentrations de NPs de ZnO. Pour *E. coli*, l'inhibition était constante avec les NPs de 22 nm et 35 nm, et supérieure à celle observée avec les NPs de 66 nm. L'inhibition de *P. aeruginosa* augmente avec la diminution de la taille des NPs. De plus, à mesure que la concentration des NPs augmentait, l'inhibition tendait à converger pour les trois

tailles de NPs. Quant à *S. aureus*, l'inhibition est constante avec les NPs de 66 nm et 35 nm, mais plus faible qu'en contact avec les NPs de 22 nm.

Ces résultats confirment ceux obtenus pour les paramètres de croissance, la CMI et la CMB.

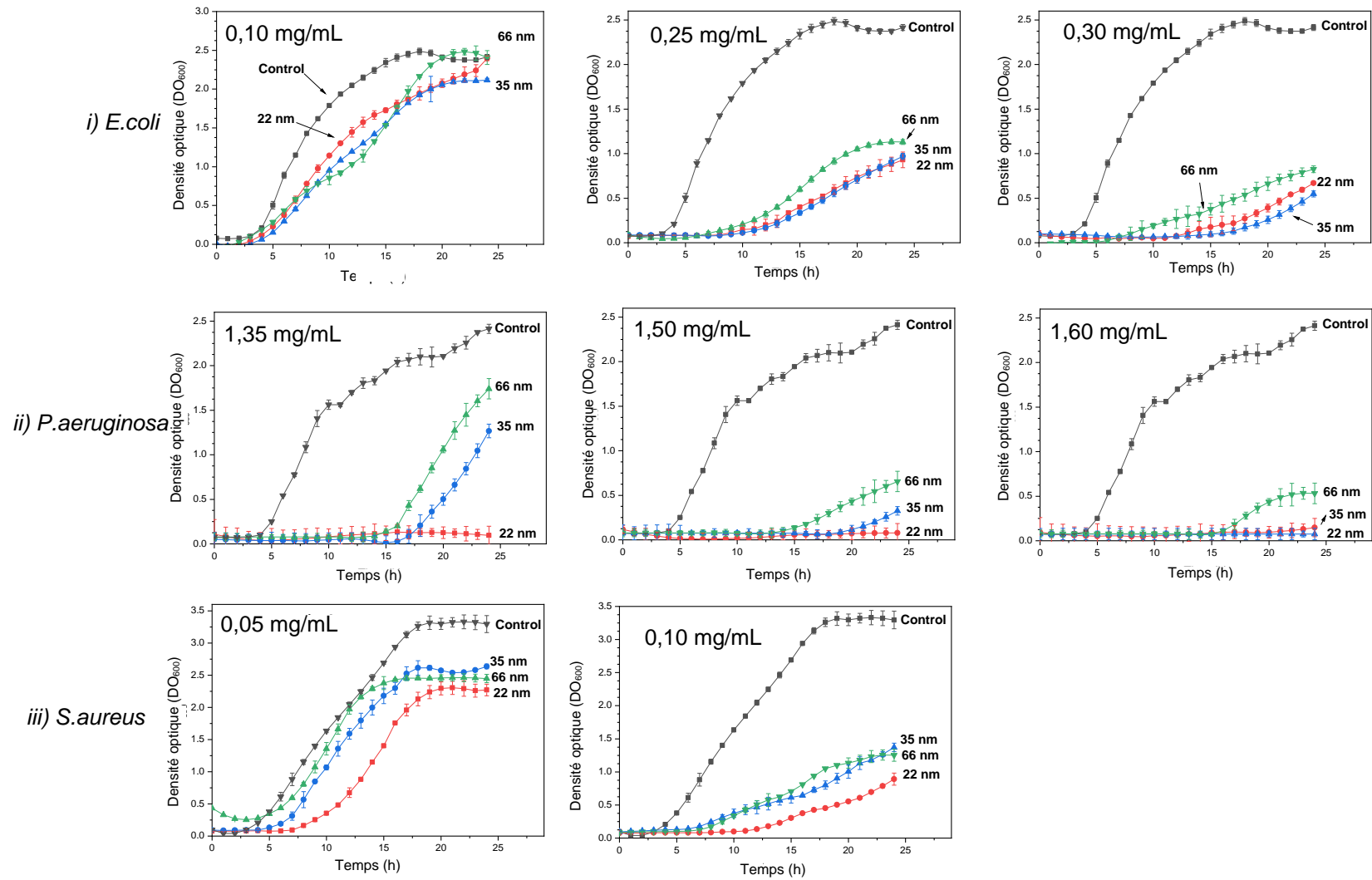


Figure 56 : Influence de la taille des NPs de ZnO à différentes concentrations sur l'inhibition de la croissance des bactéries.

4.4. Synthèse et interprétation des résultats

Les principaux résultats de cette étude peuvent être résumés comme suit :

- premièrement, la diminution de la taille des NPs de ZnO (22 nm, 35 nm et 66 nm) a amélioré leur efficacité antibactérienne en abaissant leur concentration minimale inhibitrice (CMI) et leur concentration minimale bactéricide (CMB). Il est à noter que *P. aeruginosa* a montré une susceptibilité plus faible aux NPs par rapport aux autres souches bactériennes, nécessitant des concentrations plus élevées pour un effet bactéricide. De plus, la réduction des CMI et CMB avec la diminution de la taille des NPs était particulièrement marquée chez *P. aeruginosa*.

Plusieurs études ont exploré les effets des NPs de ZnO sur les valeurs de CMI et de CMB [76, 232-236]. Conformément à nos résultats, la plupart des chercheurs ont observé une amélioration de l'efficacité antibactérienne avec des NPs plus petites. Par exemple, Pasquet et al. [76] ont rapporté une activité antimicrobienne supérieure avec des cristaux de ZnO plus petits contre *E. coli* et *P. aeruginosa*, notant une augmentation proportionnelle des CMI et CMB avec des NPs plus grandes.

Álvarez-Chimal et al. [237] ont observé des résultats similaires, indiquant que des NPs de ZnO de 7 nm, 10 nm, 16 nm et 30 nm montrent des valeurs de CMB accrues contre *S. aureus* et *E. coli* à mesure que leur taille augmente. Les valeurs de CMB rapportées dans leur étude, allant de 10 à 80 mg/mL, sont supérieures à celles observées dans la présente investigation, probablement en raison de différences dans la composition des NPs. Cependant, nos résultats concernant *S. aureus* divergent de ceux de Lallo Da Silva et al. [182], qui ont documenté des valeurs de CMI élevées avec des NPs plus grandes contre les souches de *S. aureus*. Palanikumar et al. [232] ont rapporté que des NPs de ZnO de 15 nm, 25 nm et 38 nm présentaient des CMI identiques contre *S. aureus* MRSA, avec une valeur de 0,2 mg/mL, ce qui est en accord avec nos résultats. Bien que *S. aureus* affiche des valeurs de CMI similaires quelle que soit la taille des NPs, nous avons observé une diminution de la viabilité cellulaire, comme l'indiquent les mesures de CMB, avec la diminution de la taille des particules. Les valeurs de CMI et de CMB obtenues dans cette étude sont inférieures ou égales à celles rapportées dans la littérature pour des NPs de ZnO de taille similaire à celles étudiées ici [238, 239].

Des études antérieures ont suggéré qu'*E. coli* est plus sensible aux NPs de ZnO que *P. aeruginosa*, tandis que *S. aureus* est plus sensible que *P. aeruginosa*. La variation de la susceptibilité entre *P. aeruginosa* et les autres bactéries peut être attribuée à une interaction complexe de facteurs, incluant la production de substances polymériques extracellulaires (EPS), les systèmes de détoxification et les réponses métaboliques et génétiques spécifiques

[240]. La grande capacité de codage du génome de *P. aeruginosa* permet une adaptabilité métabolique remarquable en réponse aux changements environnementaux [241]. Les différences structurales entre les bactéries Gram (-) et Gram (+) peuvent expliquer la sensibilité différente de *S. aureus* et *E. coli* aux NPs de ZnO. Chez les bactéries Gram (+), telles que *S. aureus*, il n'y a pas de membrane externe et la paroi cellulaire est épaisse, constituée de nombreux mucopeptides et de composants de surface des acides lipoteichoïques (LTA) [242]. En revanche, les bactéries Gram (-), comme *E. coli*, ont une paroi cellulaire relativement mince mais possèdent une membrane externe [242]. L'absence de membrane externe pourrait expliquer pourquoi *S. aureus* est plus sensible aux NPs de ZnO que *E. coli* [243, 244].

- Deuxièmement, l'étude a suggéré que la diminution de la taille des NPs de ZnO peut ralentir la croissance bactérienne. Peu d'études ont exploré le rôle de la taille des NPs de ZnO dans la cinétique de croissance des bactéries. Néanmoins, Baek et al. [245] ont découvert que le taux d'inhibition de la croissance (%) de *E. coli* augmentait à mesure que la taille des NPs de ZnO diminuait (12,7 nm, 15,7 nm et 17,2 nm). Ces résultats sont en accord avec ceux de Mirhosseini et al. [246] et Raghupathi et al. [231], qui ont également observé une inhibition importante de la croissance de *S. aureus* et *E. coli* avec des NPs de ZnO plus petites.

L'activité antibactérienne des NPs de ZnO repose sur plusieurs mécanismes. Elles libèrent des ions et des espèces ERO qui désactivent les enzymes et endommagent la structure cellulaire [247-249]. Elles interagissent physiquement avec les parois cellulaires, provoquant leur destruction et leur lyse [250, 251]. De plus, les interactions électrostatiques entre les NPs et la membrane cellulaire peuvent entraîner la dépolarisation et la destruction de la cellule. Les NPs peuvent également être internalisées par endocytose, capture non spécifique, diffusion membranaire et adsorption [12, 62].

La réduction de la taille des NPs peut influencer ces mécanismes et ralentir la croissance bactérienne de plusieurs façons. La haute réactivité des NPs de plus petite taille, en raison de leur plus grande surface spécifique, peut promouvoir une libération élevée d'ERO lors de l'interaction avec les bactéries. Cela entraîne une plus grande oxydation et dégradation des composants cellulaires essentiels, ralentissant ainsi la croissance bactérienne. De plus, la taille réduite des NPs peut entraîner une internalisation plus efficace dans les cellules bactériennes. Enfin, la diminution de la taille des NPs peut également augmenter la surface de contact direct avec la membrane cellulaire. Cela peut provoquer une perturbation plus importante de la membrane et une fuite des composants cellulaires, compromettant ainsi la viabilité bactérienne.

Les valeurs similaires de CMI des NPs contre *S. aureus* peuvent être attribuées au fait que *S. aureus* est une bactérie en forme de cocci qui tend à former des agrégats en grappes. Les cocci internes de ces grappes, par un effet de protection pourraient expliquer ces observations. En effet, il semble y avoir une taille maximale au-delà de laquelle les NPs ne peuvent pas pénétrer dans ces grappes, maintenant ainsi une activité antibactérienne inchangée. De plus, les effets inhibiteurs des NPs sur la croissance de *P. aeruginosa* tendent à converger à mesure que leur concentration augmente, probablement parce qu'elles sont proche de la CMI.

4.5. Conclusion

La diminution de la taille des NPs de ZnO augmente leur efficacité antibactérienne contre *E. coli*, *P. aeruginosa* et *S. aureus*, en abaissant leurs concentrations minimales inhibitrices et bactéricides. Elle ralentit la cinétique de croissance des bactéries en prolongeant leur période de latence, en réduisant leur taux spécifique de croissance et en augmentant leur pourcentage d'inhibition. Par exemple, à une concentration de 0,25 mg/mL, la phase de latence d'*E. coli* a diminué de 8,5 heures à 4 heures avec des NPs de tailles respectives de 22 nm, 35 nm, et 66 nm. Pour *P. aeruginosa*, à une concentration de 1,50 mg/mL, la phase de latence a été réduite à 24 heures, 21 heures, et 15 heures pour les NPs de 22 nm, 35 nm, et 66 nm, respectivement. De manière similaire, pour *S. aureus*, à une concentration de 0,1 mg/mL, la phase de latence s'est prolongée à 15 heures avec des NPs de 22 nm, tandis qu'elle est restée à 10 heures avec des NPs de 35 nm et 66 nm.

Dans la continuité de cette étude, nous explorons l'activité antifongique de NPs de ZnO contre une levure, le *Candida albicans*.

5. Activité antifongique des nanoparticules de ZnO contre *Candida albicans*

Dans cette section, nous examinons l'activité antifongique des NPs de ZnO de 22 nm contre *Candida albicans*.

5.1. Concentration Minimale Inhibitrice (CMI) des nanoparticules contre *C. albicans*

La **Figure 57** illustre l'évolution de la densité optique de *Candida albicans* en présence de différentes concentrations de NPs de ZnO d'une taille de 22 nm. Il est observé que la plus faible concentration au-delà de laquelle la densité optique de *C. albicans* reste constante est de 2,55 mg/mL, ce qui indique que la CMI des NPs de 22 nm contre *C. albicans* se situe entre 1,65 mg/mL et 2,55 mg/mL.

Les NPs de ZnO de 22 nm démontrent donc une activité antifongique contre *C. albicans*, bien que cette activité soit faible et inférieure à celle observée contre les bactéries, en raison d'une CMI significativement plus élevée.

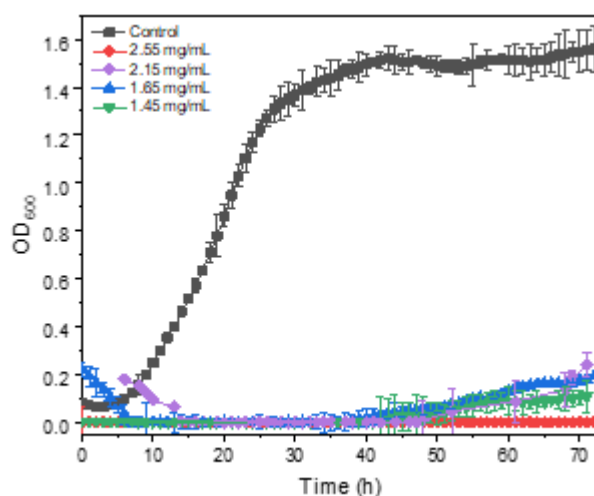


Figure 57 : Concentration Minimale Inhibitrice (CMI) de nanoparticules de ZnO contre *C. albicans*.

Les témoins positifs concernant l'évolution de la densité optique des microorganismes seuls et en présence de PAAS sont présentés en **Annexe 4**.

5.2. Kill-Time test de *Candida albicans* en contact avec de nanoparticules de ZnO

Les résultats du test de mortalité cellulaire sont représentés sur la **Figure 58**. La concentration de *Candida albicans* est restée constante pendant 72 heures en contact avec des NPs à des concentrations de 20 mg/mL et 30 mg/mL, indiquant que les NPs à ces concentrations présentent une activité fongistatique contre *C. albicans*. L'évolution de la concentration du *C. albicans* en fonction du temps de présence des NPs est illustré qualitativement en **Annexe 5**.

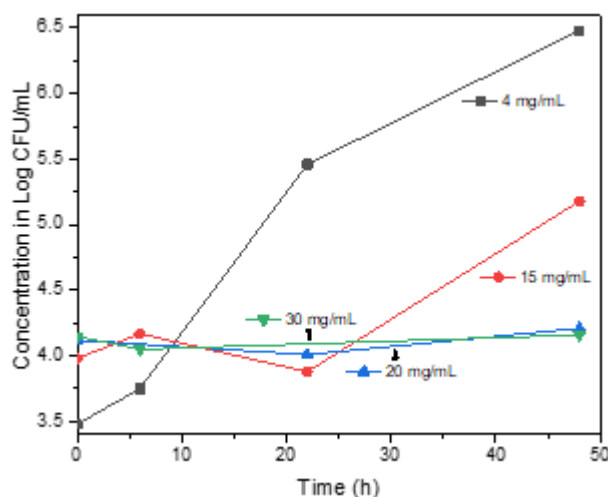


Figure 58 : Mesure de l'activité antifongique des nanoparticules de ZnO à l'aide du test de mortalité.

Ces observations sont en accord avec celles de Dadi et al. [31], qui ont constaté l'absence d'activité des solutions colloïdales de NPs de ZnO contre *C. albicans*.

L'enveloppe cellulaire de la levure *C. albicans* est composée d'une couche interne de polysaccharides, notamment de β -glucanes et de chitine, et d'une couche externe de mannoprotéines [252, 253]. Cette composition structurale aide probablement à résister à la toxicité de NPs de ZnO.

5.3. Conclusion

Les NPs de ZnO de 22 nm ont montré une activité antifongique contre *C. albicans*, bien que cette activité soit inférieure à celle observée contre les bactéries. La concentration minimale inhibitrice (CMI) de ces NPs contre *C. albicans* est de 2,55 mg/mL.

L'analyse par le test de kill-time a révélé que les nanoparticules exercent une activité fongistatique à des concentrations d'environ 20 mg/mL, soit 8 fois supérieures à la CMI, et à 30 mg/mL, soit 12 fois supérieures à la CMI. La composition de la paroi cellulaire de la levure *C. albicans*, constituée de polysaccharides tels que les β -glucanes et la chitine, ainsi que de mannoprotéines en couche externe, semble contribuer à la résistance à la toxicité des NPs de ZnO.

L'application potentielle des NPs en tant qu'agents antimicrobiens incite à étudier leur innocuité. Par conséquent, la suite de ce travail est consacrée à l'exploration de l'innocuité des NPs.

5.4. Activité cytotoxique des nanoparticules de ZnO

La réduction cellulaire des fibroblastes dermiques humains en fonction de la concentration des NPs de ZnO est présentée dans la **Figure 59**.

Les concentrations de 0,06 à 13,9 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ présentent des densités optiques moyennes identiques à celles du témoin, indiquant une absence de toxicité des NPs contre les cellules à ces concentrations.

La réduction cellulaire commence à 16% à la concentration de 27,8 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$. Cette réduction augmente à 58% à la concentration de 55,6 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ et atteint 65% à la concentration de 123 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$. L'IC₅₀, la concentration inhibitrice à 50%, est estimée à 71 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Cette valeur est proche de celles rapportées dans la littérature [254, 255].

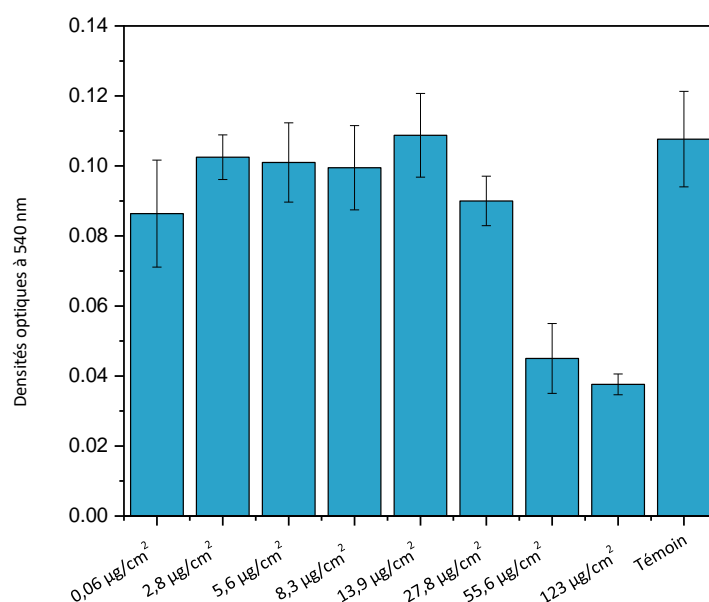


Figure 59 : Densité optique des fibroblastes dermiques en fonction de la concentration en nanoparticules de ZnO de 22 nm.

Meyer et al. [256] ont observé une réduction de plus de 85 % de la viabilité cellulaire des fibroblastes dermiques humains exposés à des NPs de ZnO de 23 nm, à des concentrations allant de 25 à 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$. De même, Ramasamy et al. [257] ont montré que les NPs de ZnO de 77 nm présentent une cytotoxicité élevée contre les fibroblastes dermiques, avec une augmentation des concentrations de 10 à 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$. D'autres auteurs ont également rapporté des résultats similaires avec des NPs de ZnO (30-70 nm) à des concentrations très faibles (ppm) [258, 259]. La toxicité des NPs de ZnO est liée à trois facteurs majeurs : 1) les interactions étendues de leur

grande surface avec les cellules, 2) la libération d'ions de zinc provenant des NPs de ZnO, et 3) la nature hydrophile de leur surface [254].

5.5. Conclusion

Cette section a montré l'impact des NPs de ZnO de 22 nm sur la viabilité des cellules de fibroblastes dermiques humaines, avec des pourcentages de réduction cellulaires allant de 0 à 65%. L'IC₅₀, estimée à 71 µg/mL, indique une activité cytotoxique modérée, conforme aux données de la littérature. La toxicité des NPs de ZnO est attribuée aux interactions de surface, à la libération d'ions de zinc, et à la nature hydrophile des nanoparticules [254].

6. Conclusion générale

Dans cette étude, nous avons avancé notre compréhension des nanoparticules de ZnO et leur application potentielle en tant qu'agents antimicrobiens. Tout d'abord, nous avons examiné le processus de synthèse par le procédé sol-gel, en analysant l'influence des paramètres tels que la température, le ratio [MEA]/[Zn²⁺], le taux d'hydrolyse et la durée de synthèse. Le taux d'hydrolyse et le ratio [MEA]/[Zn²⁺] se sont révélés être les paramètres optimaux pour faire varier la taille des nanoparticules de ZnO. La gamme de taille obtenue est de 22 nm à 66 nm.

Ensuite, nous avons étudié la dispersion des nanoparticules dans des milieux aqueux, en mettant en avant le potentiel du polyacrylate de sodium (PAAS) comme agent dispersant efficace.

Nous avons également observé une corrélation entre la taille des particules et leur efficacité antibactérienne et antifongique. La réduction de la taille des particules a entraîné une amélioration de leur activité antibactérienne, avec une augmentation de leur capacité à inhiber la croissance des bactéries. Cependant, bien que cette réduction de taille ait eu un impact positif sur leur activité antibactérienne. L'activité antifongique contre *C. albicans* est restée relativement moins prononcée

Cependant, il est important de noter que malgré leur potentiel antimicrobien, les NPs de ZnO ont montré une certaine toxicité pour les cellules humaines, soulignant la nécessité de recherches futures sur leur sécurité et leur utilisation.

Chapitre 4

Activité antimicrobienne de couches minces de ZnO et élaboration d'une peinture biocide

La contamination des surfaces hospitalières ou des dispositifs médicaux joue un rôle significatif dans la propagation des agents pathogènes et a été identifiée comme une voie de transmission probable [4]. Les analyses précédentes présentées au *Chapitre 3* ont montré que, bien que les NPs de ZnO en suspension possèdent des propriétés antimicrobiennes, elles peuvent également avoir des effets néfastes sur les cellules de fibroblastes dermiques humaines. Il est bien documenté que le relargage des NPs entraîne leur bioaccumulation et présente une menace pour les organismes vivants [260-263]. Cette bioaccumulation peut survenir par inhalation, ingestion ou contact cutané.

Pour pallier ces risques, l'utilisation de surfaces antimicrobiennes contenant des NPs constitue une alternative prometteuse, à condition que les NPs ne se relarguent pas et conservent leurs propriétés antimicrobiennes. Dans le cadre de ce travail, deux stratégies sont alors explorées pour élaborer des surfaces antimicrobiennes à base de NPs de ZnO : l'élaboration de couches minces nanostructurées de ZnO et la formulation de peintures contenant des NPs de ZnO.

Dans une première partie de ce chapitre, nous nous intéressons à l'élaboration de couches minces de ZnO et à l'étude de l'influence des paramètres de synthèse, tels que la concentration et le type de solvant, sur la microstructure et la rugosité de surface. La deuxième partie explore l'impact de la microstructure sur l'activité antimicrobienne, tandis que la troisième partie est consacrée à l'analyse de l'activité antibactérienne d'une peinture formulée avec des NPs de ZnO.

1. Elaboration de films minces nanostructurés de ZnO : Etude de l'influence des paramètres de synthèse sur la microstructure, la morphologie et la rugosité des films

Certains auteurs ont montré l'influence de la concentration et du type de solvants sur les microstructures de films minces de ZnO, notamment au niveau de l'orientation préférentielle, la morphologie et la rugosité [264-266]. Dans cette première partie, nous nous concentrons, en nous appuyant sur la littérature, sur l'élaboration de films minces de ZnO nanostructurés présentant différentes microstructures et morphologies. Nous étudions l'influence des paramètres d'élaboration, tels que le type de solvant et la concentration en précurseur, afin d'obtenir des films aux caractéristiques microstructurales différentes.

Tout d'abord, la caractérisation des films par microscopie électronique à balayage (MEB) est présentée dans la section suivante.

1.1. Analyse par microscopie électronique à balayage (MEB)

La **Figure 60** représente des images MEB de couches minces de ZnO. Sur la **Figure 60-a** est présentée une image MEB de l'échantillon 0,25 M Propanol. L'image révèle des films homogènes composés de petits grains continus, avec la présence de quelques amas dispersés à la surface, identifiés comme des agglomérats de grande taille. L'épaisseur mesurée des films est de 93 nm. La **Figure 60-b** illustre une image MEB de films 0,25 M Butanol. Cette image montre des particules colonnaires de petite taille, à la surface rugueuse, orientées perpendiculairement au substrat.

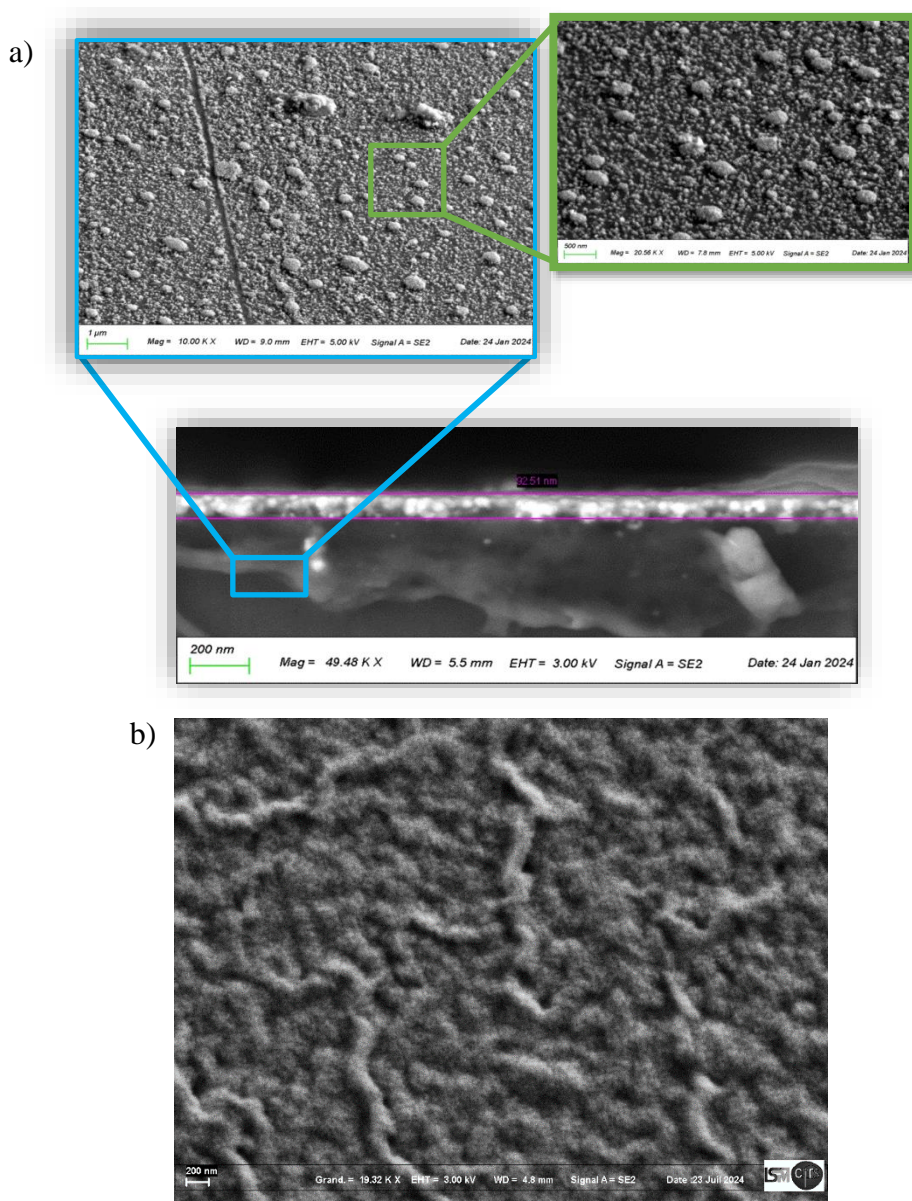


Figure 60 : Image MEB de couches minces de ZnO a) 0,4 M dans le propanol et b) 0,25 M butanol.

Dans les sections suivantes, nous analyserons plus en détail la structure, la microstructure et la morphologie des films à l'aide de la DRX et de la microscopie à force atomique (AFM), en évaluant l'influence des paramètres d'élaboration sur leurs caractéristiques.

1.2. Analyse structurale et microstructurale des films minces par diffraction des rayons X

1.2.1. Influence de la concentration en précurseur

Dans cette section, nous examinons l'influence de la concentration du précurseur de zinc sur la structure cristalline des couches minces de ZnO. Cette étude a été menée avec trois solvants : éthanol, propanol et butanol. Les échantillons obtenus à partir du butanol n'ont pas montré une reproductibilité satisfaisante, probablement en raison de sa forte viscosité, qui entrave l'adhésion des solutions sur les substrats. Néanmoins, les résultats concernant l'effet de la concentration, avec le butanol comme solvant, sur la structure cristallographique sont présentés en **Annexe 6**, ceux sur la morphologie par AFM en **Annexe 7**, et ceux sur la rugosité en **Annexe 8**. Par conséquent, seuls les résultats obtenus avec le propanol et l'éthanol seront présentés en détail dans cette partie.

a) Cas du propanol

- **Analyse de phase et texturation**

La **Figure 61** présente les diffractogrammes DRX d'échantillons élaborés à partir de différentes concentrations de précurseurs (0,1 M ; 0,25 M et 0,4 M) dans le propanol. On remarque des pics aux angles 2θ de 36° , 40° , 42° , 56° , 67° , 75° et 81° , correspondant respectivement aux plans réticulaires (100), (002), (101), (102), (110), (103) et (112) de la structure hexagonale du ZnO wurtzite, sans présence de phases secondaires, indiquant ainsi la formation d'un échantillon pure et bien cristallisé.

On observe que tous les pics caractéristiques du ZnO Wurtzite ne sont pas présents dans l'échantillon élaboré à la concentration de 0,1 M, à l'exception du pic du plan (002), indiquant une orientation préférentielle/texturation potentielle le long de cet axe.

L'apparition des autres pics a eu lieu lorsque la concentration du précurseur a été augmentée à 0,25 M et 0,4 M, avec une augmentation de leur intensité proportionnelle à la concentration. Cette augmentation de l'intensité des pics est cohérente avec les observations rapportées dans la littérature [267-270]. Ce phénomène est probablement dû à une quantité de matière déposée de ZnO plus importante et donc à une densité du film plus importante. Malgré la présence des autres pics, le pic correspondant au plan réticulaire (002) est beaucoup plus intense par rapport

aux autres pics dans les deux échantillons, indiquant une croissance préférentielle le long de l'axe c.

Les échantillons de couches minces provenant des trois différentes concentrations sont donc bien orientés préférentiellement le long de l'axe c. Cette organisation préférentielle des cristallites de ZnO le long de l'axe c (002) est potentiellement liée à sa plus faible énergie libre de surface [271].

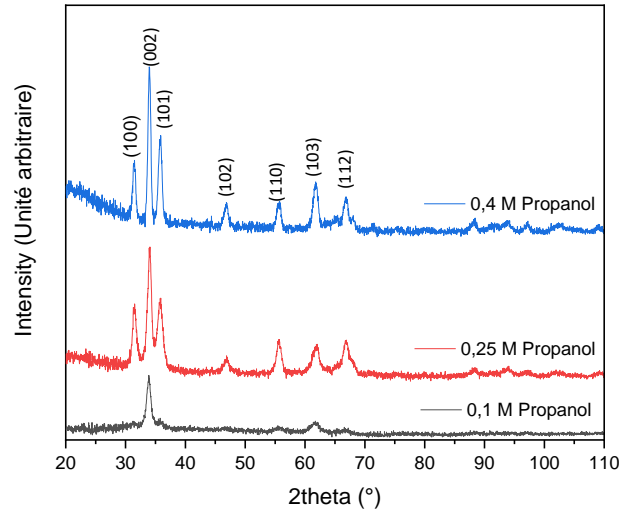


Figure 61 : Diffractogrammes RX de couches minces de ZnO en fonction de la concentration du précurseur de zinc dissout dans le propanol.

Le degré d'orientation des films est caractérisé par le coefficient de texture (CT) calculé à partir de la formule suivante tirée de [272] :

$$TC_{hkl} = \frac{I_{meas}(hkl)/I_0(hkl)}{1/N \sum_{h'h'l'} I_{meas}(h'k'l')/I_0(h'k'l')} \quad (30)$$

où $I_{meas}(hkl)$ sont les intensités mesurées de chaque pic (hkl), $I_0(hkl)$ est l'intensité relative théorique fournie par Crystallography Open Database (Ref 2300450), et N est le nombre de réflexions considérées. Dans notre cas, $N = 7$ pour les échantillons préparés dans 0,25 M et 0,4 M car nous avons sélectionné les sept réflexions les plus intenses, à savoir les pics (100), (002), (101), (102), (110), (103) et (112). Ainsi, pour un échantillon extrêmement texturé, l'une des valeurs de $TC_{(hkl)}$ serait égale à 7 tandis que les autres seraient égales à 0. Exceptionnellement $N=2$ pour l'échantillon préparé dans 0,1 M car il ne présente que deux réflexions. Une CT supérieur à 1 indique une abondance de cristallites dans une direction donnée (hkl), tandis qu'une CT égal ou inférieur à 1 indique des cristaux orientés de manière aléatoire [273].

Les degrés d'orientation des plans des films sont représentés sur la **Figure 62**. Pour les différentes concentrations, les valeurs des CT sont inférieures à 1 à l'exception de celles du plan (002), confirmant l'orientation préférentielle des films le long de cet axe. Le film élaboré avec la plus grande concentration présente un CT légèrement plus élevé le long de l'axe c, indiquant un degré d'orientation légèrement supérieur. Ces résultats suggèrent que la concentration en précurseur n'a pas d'impact significative sur la texturation des films sur l'axe c.

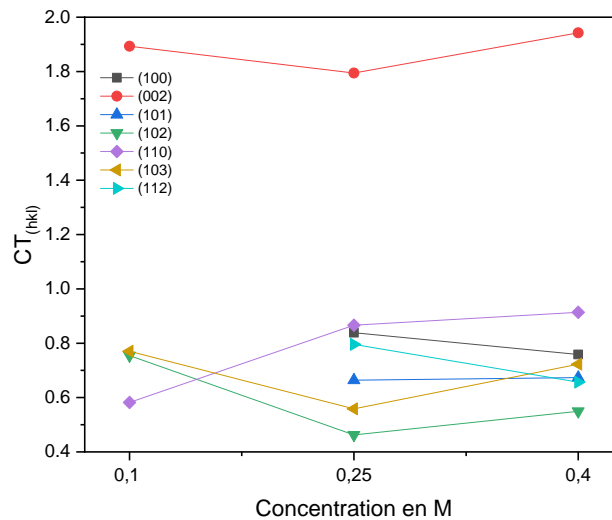


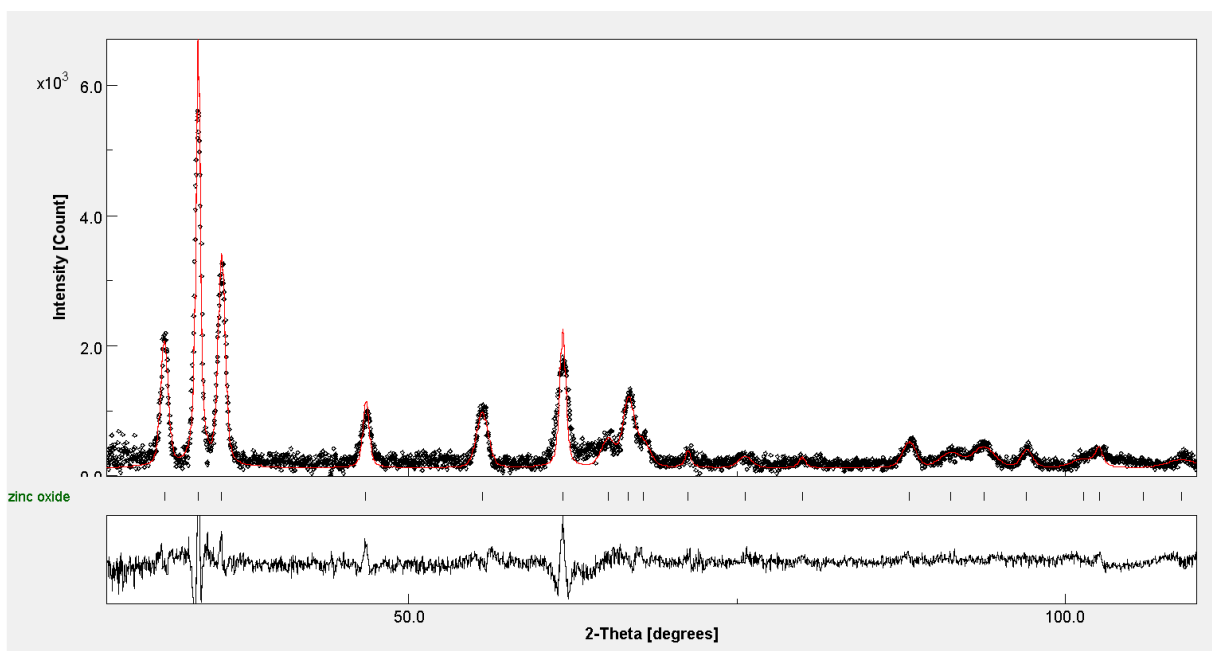
Figure 62 : Coefficient de texturation des plans réticulaires des couches minces en fonction de la concentration du précurseur de zinc dissous dans le propanol.

- **Taille des cristallites constituant le film**

Le **Tableau 12** présente les paramètres de maille, la taille des grains et la microcontrainte des films en fonction de la concentration du précurseur dissous dans le propanol. L'affinement de Rietveld d'un échantillon obtenu à partir d'une solution colloïdale contenant 0,4 M de précurseur dissous dans le propanol est présenté à la **Figure 63**.

Tableau 12 : Résultats de l'analyse Rietveld de couches minces de ZnO en fonction de la concentration du précurseur dissous dans le propanol.

Concentrations	a (Å)	c (Å)	Taille (nm)	μ -déformations	Sig
0,1 M	3,30	5,29	17	0,0112	7,17
0,25 M	3,25	5,21	12	0,0035	6,75
0,4 M	3,25	5,20	24	0,0082	7,29

**Figure 63**: Affinement de Rietveld de l'échantillon issu d'une solution colloïdale de précurseur à 0,4 M de précurseur dissous dans le propanol.

Nous observons des valeurs de Sigma nettement plus élevées que celles obtenues avec les poudres; néanmoins, les résultats restent exploitables. Cette moindre précision du modèle est attribuable à la faible quantité de matière présente sur les échantillons, ce qui a conduit à une collecte de données moins importante. De plus, la contribution significative du substrat, que nous avons tenté de minimiser au mieux, a également joué un rôle. Les paramètres de maille (a et c) restent stables et correspondent à ceux du ZnO de structure Wurtzite théorique, confirmant ainsi la formation d'une phase homogène de ZnO dans cette structure. La taille des grains est plus réduite pour l'échantillon préparé à partir d'une concentration de 0,25 M, mesurant 12 nm, en comparaison avec 17 nm et 24 nm pour les échantillons issus des concentrations de 0,1 M et 0,4 M respectivement. Ce résultat concorde avec les observations de la **Figure 62**, où l'on note

une largeur à mi-hauteur des pics de diffraction plus importante pour l'échantillon préparé à partir de la concentration de 0,25 M. Ces résultats suggèrent l'existence d'une concentration optimale dans le propanol à laquelle la taille des grains est minimale. Cependant, pour valider cette hypothèse, des expériences supplémentaires sur d'autres concentrations seraient nécessaires, mais cela n'a pas pu être réalisé dans le délai imparti à ce travail de thèse.

Le taux de microdéformation reste relativement faible pour tous les échantillons bien que les valeurs soient plus élevées que pour les poudres précédemment analysées.

b) Cas de l'éthanol

- *Analyse de phase et texturation*

La **Figure 64** représente les diffractogrammes DRX de films de ZnO élaborés à différentes concentrations (0,1 M ; 0,25 M et 0,4 M) dans l'éthanol. Les pics observés sont caractéristiques du ZnO Wurtzite, comme expliqué précédemment. Aucune phase secondaire n'apparaît, indiquant la formation de ZnO Wurtzite bien cristallisé monophasé.

À une concentration de 0,1 M, seuls deux pics caractéristiques du ZnO Wurtzite sont présents aux angles 2θ de 36° et 67° , correspondant aux familles de plans réticulaires (002) et (103). Comme observé avec les films élaborés dans le propanol, le pic du plan (002) est le plus intense, indiquant une potentielle orientation préférentielle le long de cet axe.

En augmentant la concentration à 0,25 M et 0,4 M, d'autres pics apparaissent et leur intensité augmente proportionnellement à la concentration, en accord avec les résultats précédents. Le pic de la famille de plans (002) reste le plus intense, suggérant comme précédemment une orientation préférentielle des films le long de ce plan.

Ainsi, les trois échantillons de films minces élaborés à différentes concentrations montrent tous une orientation préférentielle le long de l'axe c, en accord avec les observations faites précédemment sur le propanol. Le degré d'orientation des cristallites dans le plan (002) augmente à la concentration de 0,25 M, puis diminue à la concentration de 0,4M.

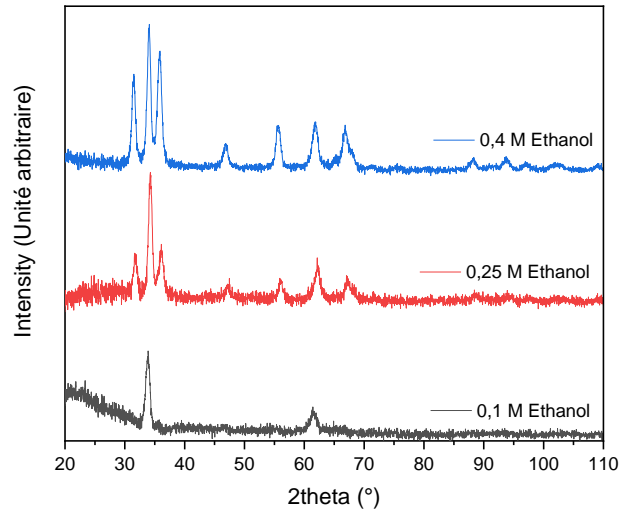


Figure 64: Diffractogrammes RX de couches minces de ZnO en fonction de la concentration du précurseur de zinc dissout dans l'éthanol.

Les valeurs des coefficients de texture ont été calculées conformément à la formule (1) et sont présentées sur la **Figure 65**. Le CT du plan (002) est supérieur à 1, confirmant l'orientation préférentielle des cristallites dans ce plan. Cette valeur augmente lorsque la concentration passe de 0,1 M à 0,25 M, puis diminue lorsque la concentration atteint 0,4 M.

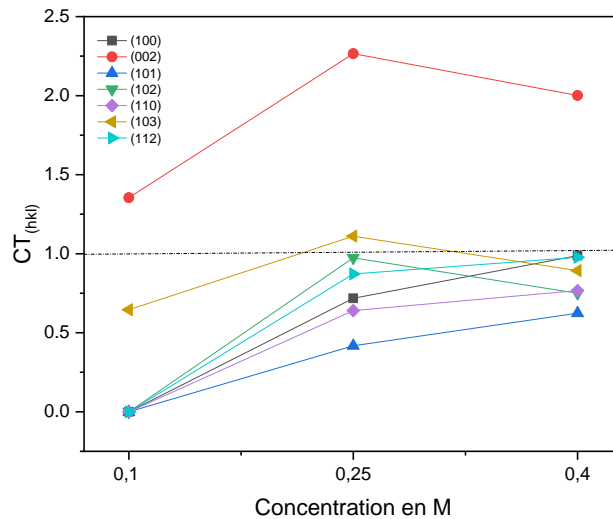


Figure 65: Coefficient de texturation des plans réticulaires des couches minces de ZnO en fonction de la concentration du précurseur de zinc dissout dans l'éthanol.

Ces résultats concordent avec ceux de R. Amari et al. [274] qui ont observé que le CT du plan (002) augmentait avec la concentration de précurseur dissout dans l'éthanol, passant de 0,3 M à 0,7 M, puis diminuait avec l'augmentation de la concentration en précurseur au-delà de 0,7 M. Znaïdi et al. [275] ont montré que la fraction volumique de la composante fibre

$\langle 00.2 \rangle$ diminue à mesure que la concentration en précurseur dissous dans l'éthanol augmente, pour des concentrations de 0,25 M ; 0,50 M et 0,75M. Une autre tendance a été observée par Murugesan et al. [273] : ils ont trouvé que le CT diminuait lorsque la concentration en précurseur de zinc dissous dans l'éthanol augmentait de 0,025 M à 0,075 M, puis augmentait à nouveau lorsque la concentration atteignait 0,125 M. Aryanto et al. [276] ont trouvé que le CT augmentait avec la concentration en précurseur de zinc dissous dans l'éthanol, à des concentrations de 0,5 M, 0,75 M et 1 M. Bouderbala et al. [277] ont découvert que les films de ZnO, obtenus par la même méthode que celle décrite dans ce document, avec des concentrations variant de 0,1 à 0,5 M, ne présentent pas d'orientation préférentielle. Ainsi, l'influence de la concentration du précurseur sur le degré de texturation des films de ZnO n'est pas encore bien élucidée dans la littérature. Il semble néanmoins qu'il existe une concentration maximale à laquelle le phénomène de texturation est plus marqué.

- **Taille des cristallites constituant le film**

Le **Tableau 13** présente les paramètres de maille, la taille des grains et la microcontrainte des films en fonction de la concentration du précurseur dissous dans l'éthanol. L'affinement de Rietveld d'un échantillon obtenu à partir d'une solution colloïdale contenant 0,25 M de précurseur dissous dans l'éthanol est présenté à la **Figure 66**.

Tableau 13 : Résultats de l'analyse Rietveld de couches minces de ZnO en fonction de la concentration du précurseur dissous dans l'éthanol.

Concentrations	a (Å)	c (Å)	Taille (nm)	μ -déformations	Sig
0,1 M	3,333	5,259	22	0,0086	8,41
0,25 M	3,291	5,279	17	0,0069	8,41
0,4 M	3,248	5,206	20	0,0042	5,09

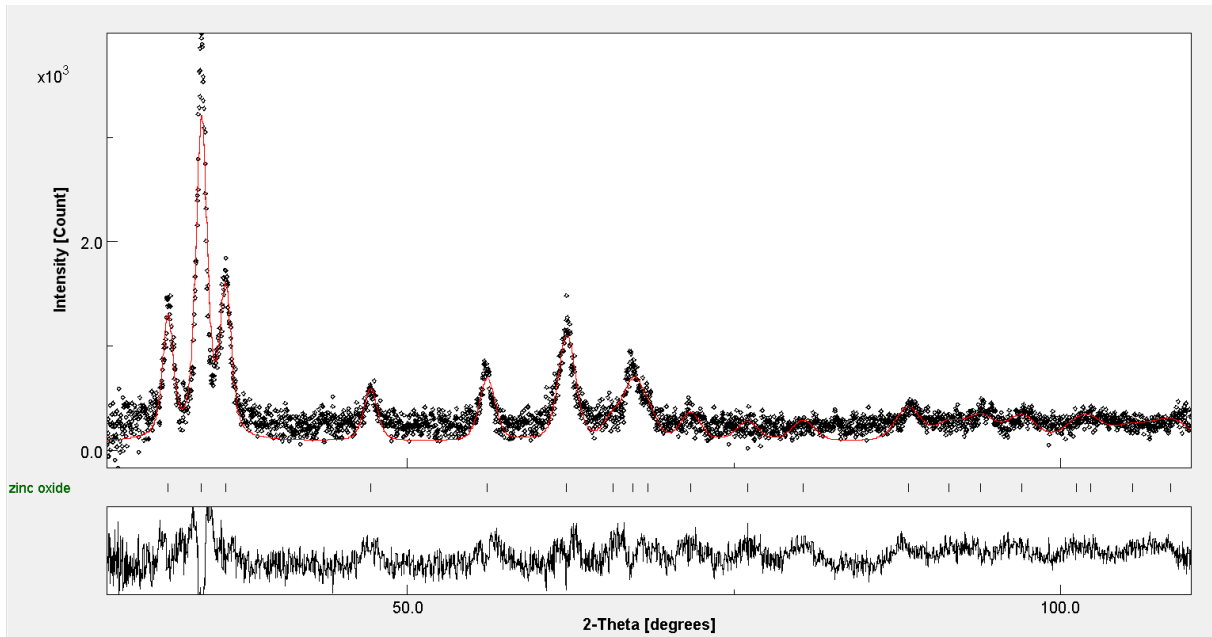


Figure 66: Affinement de Rietveld de l'échantillon issu d'une solution colloïdale de précurseur à 0,25 M de précurseur dissous dans l'éthanol.

La qualité de l'affinement, en lien avec la valeur de Sigma, est également modérée pour les mêmes raisons évoquées précédemment, confirmant ainsi la formation de films de ZnO avec cette structure. Les paramètres de maille restent globalement constants et correspondent à ceux du ZnO Wurtzite. Les taux de microdéformations restent également relativement faibles. La taille des grains reste relativement stable autour de la vingtaine de nanomètre en fonction de la concentration du précurseur : 22 nm, 17 nm et 20 nm pour les échantillons préparés respectivement à partir des concentrations 0,1 M ; 0,25 M et 0,4 M. Ces résultats suggèrent que la concentration en précurseur n'a pas d'impact notable sur les paramètres cristallographiques des films préparés à partir de l'éthanol ainsi que sur la taille des cristallites constituant le film.

1.2.2. Influence du type de solvant

Dans cette partie, nous explorons l'influence du type de solvant sur la structure cristalline des couches minces de ZnO. Les solvants étudiés sont l'éthanol, le propanol et le butanol.

- **Analyse de phase et texturation**

Les diffractogrammes RX des échantillons préparés dans différents solvants (éthanol, propanol et butanol) sont présentés dans la **Figure 67**.

Tous les pics visibles sont caractéristiques du ZnO wurtzite. On observe cependant des modifications des ratios d'intensité des pics importants d'un échantillon à l'autre en fonction du solvant.

Le pic correspondant à la famille de plans (002) est le plus intense pour les échantillons provenant de l'éthanol et du propanol, indiquant une orientation préférentielle selon la direction perpendiculaire à cette famille de plan. Comparé à l'échantillon issu du propanol, celui provenant de l'éthanol montre une diminution des ratios d'intensités des pics de diffraction autres que celui du plan (002), ce qui entraîne une augmentation de la longueur de l'axe c. Cela suggère une texturation plus prononcée sur cet axe dans l'échantillon préparé avec l'éthanol par rapport à celui issu du propanol.

Pour l'échantillon provenant du butanol, les ratios d'intensités des pics de diffraction sont plus faibles, avec un pic du plan (100) prédominant, suggérant une orientation préférentielle dans ce plan. La diminution des ratios d'intensités peut s'expliquer par la grande viscosité du butanol, qui réduit la quantité de matière déposée sur le substrat

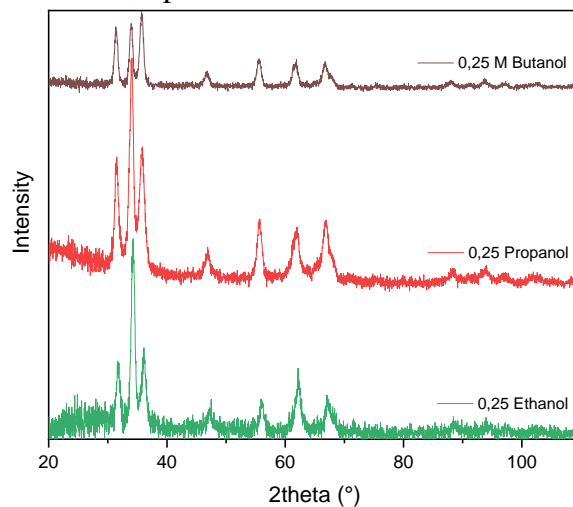


Figure 67 : Diffractogrammes RX de films minces en fonction du type de solvant.

L'analyse du CT (**Figure 68**) a révélé une orientation préférentielle du plan (002) dans les échantillons préparés avec l'éthanol et le propanol. Le CT du plan (002) est plus élevé pour l'échantillon provenant de l'éthanol que pour celui provenant du propanol, indiquant un degré d'orientation supérieur. Pour l'échantillon préparé avec le butanol, le plan ayant un CT supérieur à 1 est le (100), montrant une orientation préférentielle dans cette direction, bien que le degré d'orientation soit moindre car le CT est proche de 1.

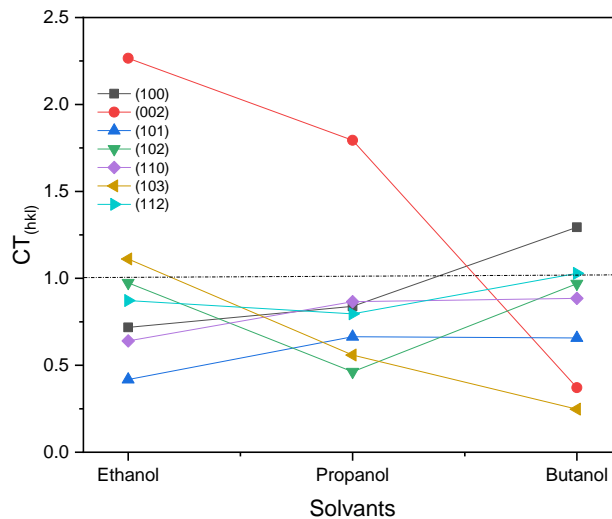


Figure 68 : Evolution du coefficient de texture en fonction du type de solvant.

Des auteurs ont trouvé des résultats similaires, c'est-à-dire que la texturation des films de ZnO selon l'axe c augmentait lorsque la longueur de la chaîne carbonée des solvants diminuait [278-280]. Les différentes orientations cristallographiques sont probablement dues aux propriétés physiques du solvant telles que leur polarité et leur viscosité [280].

- **Taille des cristallites constituant le film**

Le **Tableau 14** présente les paramètres de maille, la taille des grains et le taux de microdéformation des films en fonction du type de solvant.

Tableau 14: Résultats de l'analyse Rietveld de couches minces de ZnO en fonction du type d'alcool.

Alcool	a (Å)	c (Å)	Taille (nm)	μ -déformations	Sig
Ethanol	3,29	5,28	17	0,0069	8,41
Propanol	3,25	5,21	12	0,0035	6,75
Butanol	3,24	5,20	19	0,0049	9,06

La valeur du Sigma est modérée pour l'échantillon préparé à partir du butanol, confirmant ainsi la formation de ZnO de structure wurtzite. Les particules présentent une taille globalement uniforme, avec 17 nm pour l'éthanol, 12 nm pour le propanol, et 19 nm pour le butanol, ce qui suggère que les processus de nucléation et de croissance sont comparables d'un solvant à l'autre.

Des analyses complémentaires sur le Raman ont été réalisées sur les films et sont présentées en **Annexe 9**. La section suivante aborde l'influence des paramètres précédemment étudié (Concentration en précurseur et type de solvant) sur la morphologie des couches minces.

1.3. Influence sur la morphologie et la rugosité

Cette section aborde l'influence de la concentration du précurseur de zinc et du type de solvant sur la morphologie et la rugosité des films de ZnO.

1.3.1. Influence de la concentration du précurseur

a) Cas du propanol

Les images tridimensionnelles de microscopie à force atomique (AFM) de films de ZnO élaborés dans le propanol à différentes concentrations (0,1M ; 0,25M et 0,4M) sont présentées dans la **Figure 69**. Les films présentent une morphologie colonnaire. On y observe des particules en forme de cône plus ou moins large et pointu sur les trois échantillons. Les films préparés à partir de solutions de concentrations respectives de 0,1 M et 0,4 M présentent une structure homogène, avec des hauteurs maximales des grains de 20 nm et 14 nm, respectivement. En revanche, le film obtenu à 0,25 M se caractérise par des grains plus volumineux et la présence de creux, signalant une non-homogénéité du film, avec une hauteur maximale atteignant 43 nm. Le film issu de la solution à 0,4 M se distingue par une rugosité inférieure à celle du film à 0,1 M, en raison de la plus petite hauteur des grains et d'un nombre réduit de creux, indiquant ainsi une meilleure homogénéité.

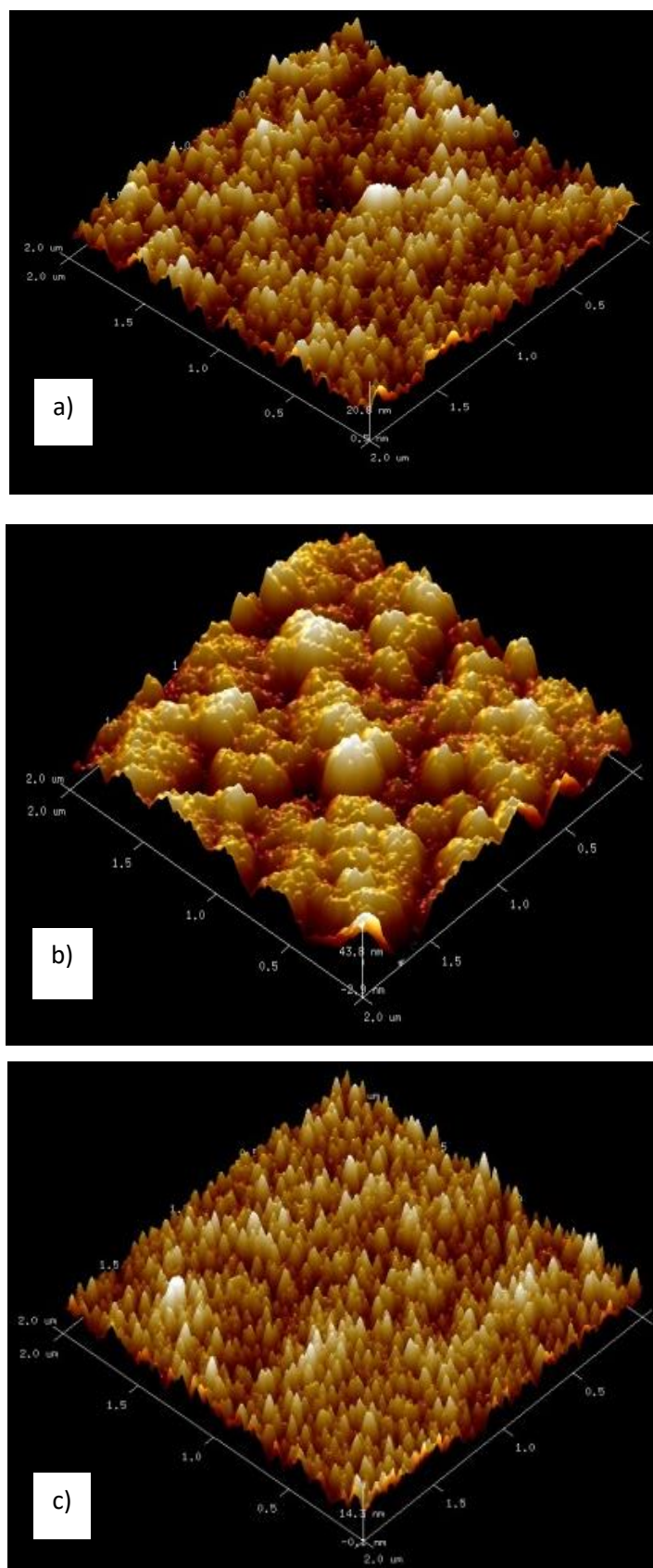


Figure 69 : Image AFM de : a) 0,1 M Propanol ; b) 0,25 M Propanol et c) 0,4 M Propanol.

Les valeurs de rugosités calculées sont présentées dans le **Tableau 15**.

Tableau 15: Effet de la concentration du précurseur de zinc sur la rugosité des films de ZnO préparés dans le propanol.

Concentrations	R _a (nm)	R _q (nm)	R _{max} (nm)
0,1 M	8,3	10,3	65,6
0,25 M	12,3	15,6	129
0,4 M	6,6	8,3	55,2

On observe que la surface de l'échantillon déposé dans la solution de 0,4 M dans le propanol est la plus lisse, avec une rugosité (R_a) d'environ 6,55 nm. Pour l'échantillon déposé à 0,1 M dans le propanol, la rugosité de la surface est presque similaire à celle de l'échantillon déposé à 0,4 M dans le propanol, avec une rugosité de 8,28 nm. Cependant, lorsque la concentration du précurseur dans le propanol est de 0,25 M, la rugosité est augmentée de manière significative

b) Cas de l'éthanol

Ci-contre (**Figure 70**) se trouvent les images par AFM de films de ZnO élaborés dans l'éthanol à différentes concentrations (0,1 M, 0,25 M et 0,4 M). Les grains croissent perpendiculairement au substrat et leur hauteur maximale augmente en fonction de la concentration : elle passe de 17 nm à 27 nm, puis à 50 nm, lorsque la concentration augmente respectivement de 0,1 M à 0,25 M, puis à 0,4 M. De plus, les irrégularités de hauteur entre les grains deviennent de plus en plus prononcées à mesure que la concentration en précurseur augmente, indiquant une augmentation de la rugosité.

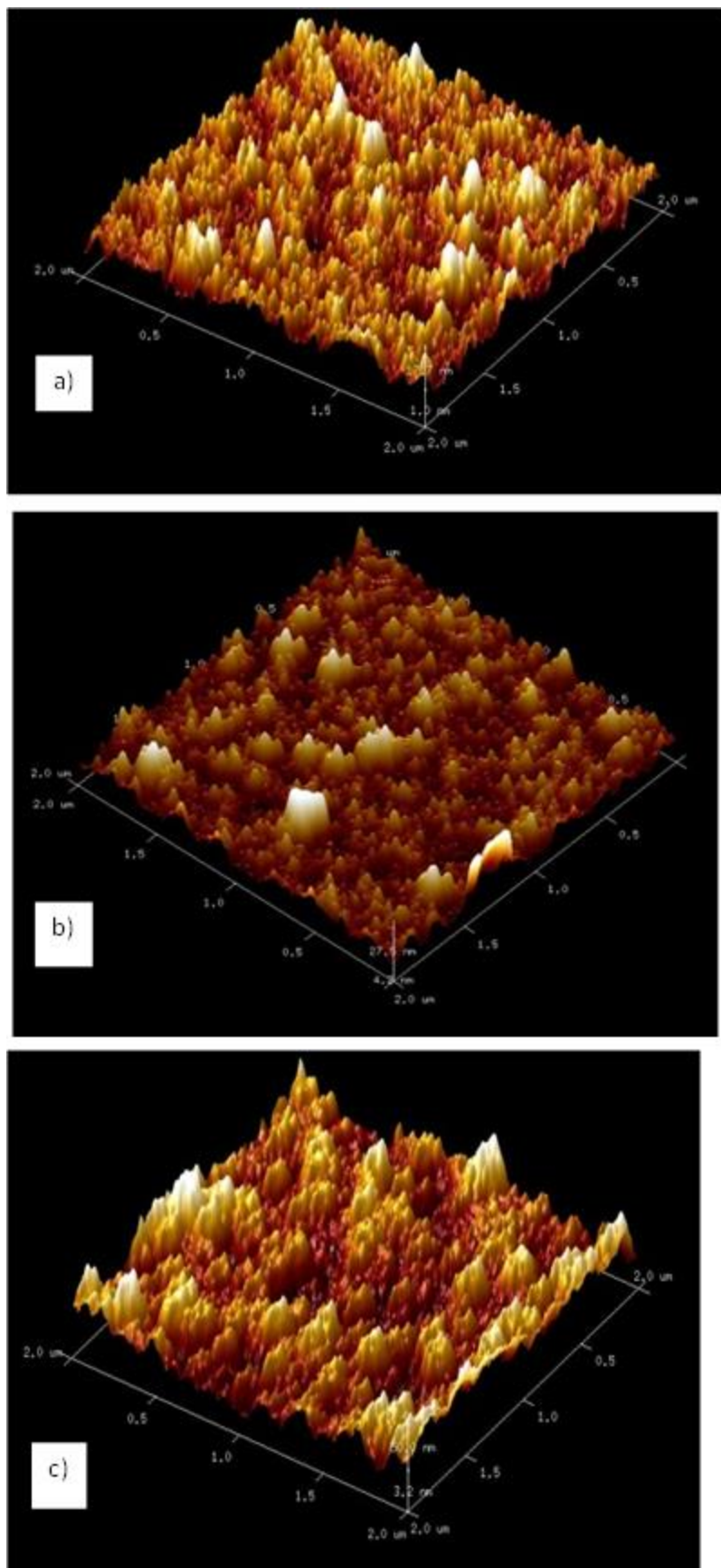


Figure 70: Image AFM: a) 0,1 M Ethanol ; b) 0,25 M Ethanol et c) 0,4 M Ethanol.

Les valeurs des rugosités sont présentées sur le **Tableau 16**.

Tableau 16: Effet de la concentration du précurseur de zinc sur la rugosité des films de ZnO préparés dans l'éthanol.

Concentrations	R _a (nm)	R _q (nm)	R _{max} (nm)
0,1 M	7,2	8,7	58,5
0,25 M	6,9	8,7	62,9
0,4 M	12,4	15,4	110

La rugosité Ra diminue légèrement de 7,2 nm à 6,9 nm lorsque la concentration du précurseur augmente de 0,1 M à 0,25 M. Ensuite, elle augmente de manière significative pour atteindre 12,4 nm à une concentration de 0,4 M. Cela montre que, bien qu'il y ait une réduction initiale de la rugosité à des concentrations plus faibles, la tendance générale est que la rugosité des films augmente avec l'augmentation de la concentration du précurseur. La rugosité observée dans cette étude pourrait être attribuée à l'augmentation de la taille des grains lorsque les films sont déposés à partir de solutions plus concentrées en soluté [281]. Concernant l'influence de la concentration sur la rugosité des films préparés à partir du propanol, aucune étude spécifique abordant cette question n'a été trouvée dans la littérature. Toutefois, la tendance observée suggère l'existence d'une concentration optimale pour atteindre une rugosité maximale. Des recherches supplémentaires sont nécessaires pour mieux comprendre l'effet de la concentration sur la rugosité des films lorsque le propanol est utilisé comme solvant, afin d'élucider pleinement l'impact de ce paramètre.

1.3.2. Influence du type de solvant

L'influence du type de solvant sur la microstructure des films de ZnO, analysée par AFM, est présentée dans la **Figure 71**.

Les micrographies AFM des films minces révèlent une structure granulaire pour ceux déposés dans l'éthanol et le propanol. Cependant, dans le cas des films déposés dans le butanol, une morphologie totalement différente est observée avec une alternance de longue rangée de grains et de sillons, donnant une structure « ridée ». La structure de type ridé est probablement causée par la combinaison de la variation du coefficient de dilatation pendant le traitement pré- et post-thermique, ainsi que la faible volatilité du solvant. Cela entraîne une compression du film

déposé pendant la période de séchage, conduisant à la formation de rides désordonnées [282]. La hauteur maximale des grains est respectivement de 27 nm, 43 nm et 47 nm pour les échantillons issus de l'éthanol, du propanol et du butanol, ce qui révèle une augmentation progressive de la rugosité de surface en corrélation avec la longueur croissante de la chaîne carbonée.

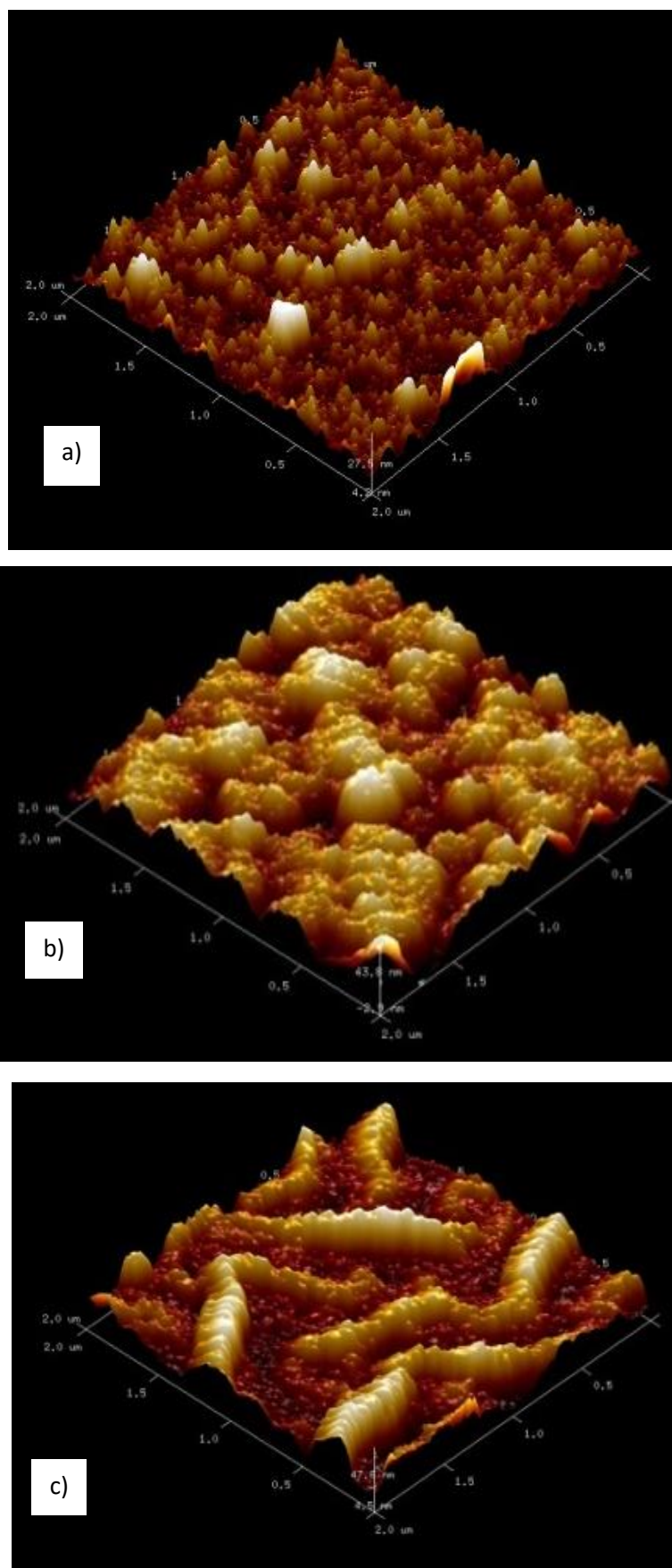


Figure 71: Image AFM de films provenant de : a) l'éthanol ; b) le propanol et c) le butanol.

Les valeurs des rugosités sont présentées sur le **Tableau 17**.

Tableau 17: Effet du type de solvant sur la rugosité des films de ZnO.

Solvant	R_a (nm)	R_q (nm)	R_{max} (nm)
Ethanol	6,9	8,7	62,9
Propanol	12,3	15,6	129
Butanol	14,3	17,4	96,8

La rugosité augmente de 6,9 nm à 12,3 nm, puis à 14,3 nm lorsque la longueur de la chaîne carbonée du solvant augmente, en passant de l'éthanol au propanol, puis au butanol, respectivement. L'augmentation de la rugosité avec la longueur de la chaîne carbonée du solvant peut être expliquée par la faible volatilité des solvants à chaînes carbonées plus longues. En effet, une évaporation plus lente favorise une répartition moins uniforme des grains, ce qui entraîne une surface plus rugueuse [283-284].

1.4. Conclusion

Cette partie nous a permis de mettre en place un procédé de préparation des films minces de ZnO avec différentes microstructures et morphologies. Les analyses microstructurales complémentaires (MEB) ont confirmé la formation de films denses et continus avec des morphologies colonnaires. L'influence des concentrations et des solvants de synthèse a été étudiée. La concentration en précurseur de zinc n'a pas significativement influencé la structure cristalline des films préparés à partir du propanol le long de l'axe c. En revanche, pour les films préparés avec de l'éthanol, le coefficient de texture a initialement diminué à une concentration de 0,25 M, puis a augmenté à 0,4 M. L'analyse topographique de la surface a révélé qu'il existe une concentration optimale (0,25 M) à laquelle la rugosité des films préparés avec du propanol est la plus élevée. Concernant l'effet de la concentration sur les films préparés dans l'éthanol, la rugosité augmentait de manière linéaire avec la concentration, due à l'augmentation de la taille des grains polycristallins.

L'étude sur l'influence du solvant a montré que la longueur de la chaîne carbonée et la volatilité des solvants impactaient l'orientation préférentielle des films de ZnO et la morphologie. En effet, les films provenant du solvant le moins volatile, le butanol, présentaient moins de texturation et était le plus rugueux.

L'élaboration de couches minces présentant des caractéristiques différentes permettra d'examiner l'influence de la microstructure sur ces propriétés antibactériennes. Mais avant cela, une étude préliminaire a été réalisée pour valider une méthode d'évaluation de l'activité antimicrobienne des surfaces.

2. Mise en place d'un protocole de mesure de l'activité antimicrobienne des surfaces

L'élaboration d'une méthode fiable pour mesurer l'activité antimicrobienne des surfaces est essentielle afin d'assurer la reproductibilité des résultats. Dans les sections suivantes, nous examinons la reproductibilité des normes employées dans cette étude, en les adaptant aux conditions expérimentales spécifiques du laboratoire. Cette démarche permet d'établir une méthodologie robuste et appropriée pour évaluer l'activité antimicrobienne des matériaux élaborés dans le cadre de cette recherche.

2.1. Validation de la norme ISO 7581 : 2023

Les résultats concernant la norme ISO 7581 : 2023 sont présentés dans le **Tableau 18**. On observe une réduction de la concentration bactérienne entre celle de l'inoculum déposé sur les lames et celle dénombrée sur les lames à l'instant T_0 après séchage (environ 3 minutes), indiquant une perte de bactéries lors du dépôt sur les lames. Cependant, la concentration après 1 heure (T_1) est supérieure ou égale à la concentration à l'instant initiale (T_0), ce qui indique un bon décrochage des bactéries et une bonne viabilité. De ces observations, nous concluons que la méthode de décrochage des bactéries décrite par la norme ISO 7581 :2023 a été validée. Néanmoins, quelques ajustements sur le volume à déposer deviennent nécessaires pour éviter les fuites.

Tableau 18: Évaluation de la concentration bactérienne en Log_{10} UFC/mL selon la norme ISO 7581 :2023.

Microorganismes	<i>E.coli</i>	<i>S.aureus</i>
Concentration de l'inoculum	4,91	5,18
Concentration à T_0	3,90	3,59
Concentration à T_1	3,98	4,21

2.2. Méthode Validation de la méthode des lames gélosées

Les résultats obtenus pour les lames gélosées sont présentés dans le **Tableau 19**. Une diminution de la concentration des bactéries est observée entre l'inoculum et la concentration sur les lames à T₀. Les concentrations entre T₀ et T₁ restent inchangées, ce qui confirme les observations faites précédemment avec la norme ISO 7581:2023.

Tableau 19: Évaluation de la concentration bactérienne en Log₁₀ UFC/mL selon la méthode des lames gélosées.

Microorganismes	<i>E.coli</i>	<i>S.aureus</i>
Concentration de l'inoculum	5	
Nombre de colonies à T ₀ / Concentration	35 $3 < C_0 \leq 4$	22 $3 < C_0 \leq 4$
Nombre de colonies à T ₁ / Concentration	42 $3 < C_0 \leq 4$	32 $< C_0 \leq 4$

2.3. Validation de la norme ISO 22196 :2011

La norme ISO 22196:2011 a été appliquée à *E. coli* et *S. aureus* avec quelques légères modifications, en particulier en modifiant la surface (10 cm²) et le volume de la suspension bactérienne à inoculer (0,1 mL). La concentration de bactéries déposées sur les lames à T₀ était légèrement inférieure à la concentration théoriquement calculée sur la base des données expérimentales de l'inoculum, indiquant une perte de volume lors du recouvrement du film de couverture. Après 24 heures d'incubation, la totalité de la suspension de départ de *S. aureus* a été récupérés, mais la récupération des *E.coli* était encore insuffisante (Voir **Tableau 20**).

Tableau 20: Évaluation de la concentration bactérienne en Log₁₀ UFC/cm² selon la norme ISO 22196 :2011.

Microorganismes	<i>E. coli</i>	<i>S. aureus</i>
Concentration de l'inoculum	5,82	4,98
Concentration à T0	4,78 ± 0,38	4,00 ± 0,11
Concentration à T24	0,40 ± 0,159	4,13 ± 0,44
$(T_{24}/T_0) * 100$ (%)	8,31	100

Afin d'optimiser le taux de récupération des *E. coli*, deux tests ont été réalisés : l'un impliquant l'agitation au vortex du mélange échantillon-surfactant, et l'autre utilisant des billes de 1 mm lors de l'agitation au vortex du même mélange.

Les résultats présentés dans le **Tableau 21** montrent une amélioration du taux de décrochage des bactéries *E. coli* en utilisant une méthode combinée d'une agitation au vortex, de billes et de surfactant, conformément à la norme ISO 22 196:2011. L'agitation mécanique générée par l'agitation au vortex crée des forces de cisaillement, facilitant le détachement des bactéries des surfaces. Les billes renforcent cet effet en agissant comme des abrasifs qui frottent les bactéries, aidant à leur détachement mécanique. En outre, l'utilisation d'un surfactant tel que l'Eugon LT Sup intercale des molécules amphiphiles entre les bactéries et la surface, réduisant les forces d'adhésion et facilitant ainsi leur décrochement.

Tableau 21: Amélioration du taux de récupération des bactéries *E.coli* par agitation mécanique.

Microorganismes	<i>E. coli</i>	
Concentration de l'inoculum	7,33	
Méthode	Vortex	Vortex + Billes
Concentration à T0	6,71 ± 0,52	
Concentration à T24	5,26 ± 0,63	5,53 ± 0,02
$(T_{24}/T_0) * 100$ (%)	78,32	84,41

Cette nouvelle méthode de décrochage est validée pour les 3 autres microorganismes qui feront également l'objet d'étude sur les films de ZnO. Les résultats présentés dans le **Tableau 22** montrent un bon taux de décrochage des microorganismes *S. aureus*, *P. aeruginosa* et *C. albicans*, ainsi qu'une augmentation des concentrations après 24 heures, indiquant une multiplication des microorganismes, surtout pour *P. aeruginosa*. Les bactéries *P. aeruginosa* sont connues pour leur capacité à se développer facilement même dans des environnements hostiles, notamment dans des zones à haute humidité.

Tableau 22: Validation d'une nouvelle méthode de décrochage de germes conforme à la norme ISO pour *S. aureus* ; *P. aeruginosa* et *C. albicans*.

Microorganismes	<i>S.aureus</i>	<i>P.aeruginosa</i>	<i>C.albicans</i>
Concentration de l'inoculum	6,31	6,25	5,78
Concentration à T ₀	4,90 ± 0,15	5,63 ± 0,04	4,91 ± 0,07
Concentration à T ₂₄	5,04 ± 0,16	7,16 ± 0,11	4,75 ± 0,15
$(T_{24}/T_0) * 100$ (%)	103 %	127 %	%

La **Figure 72** récapitule le protocole établi.

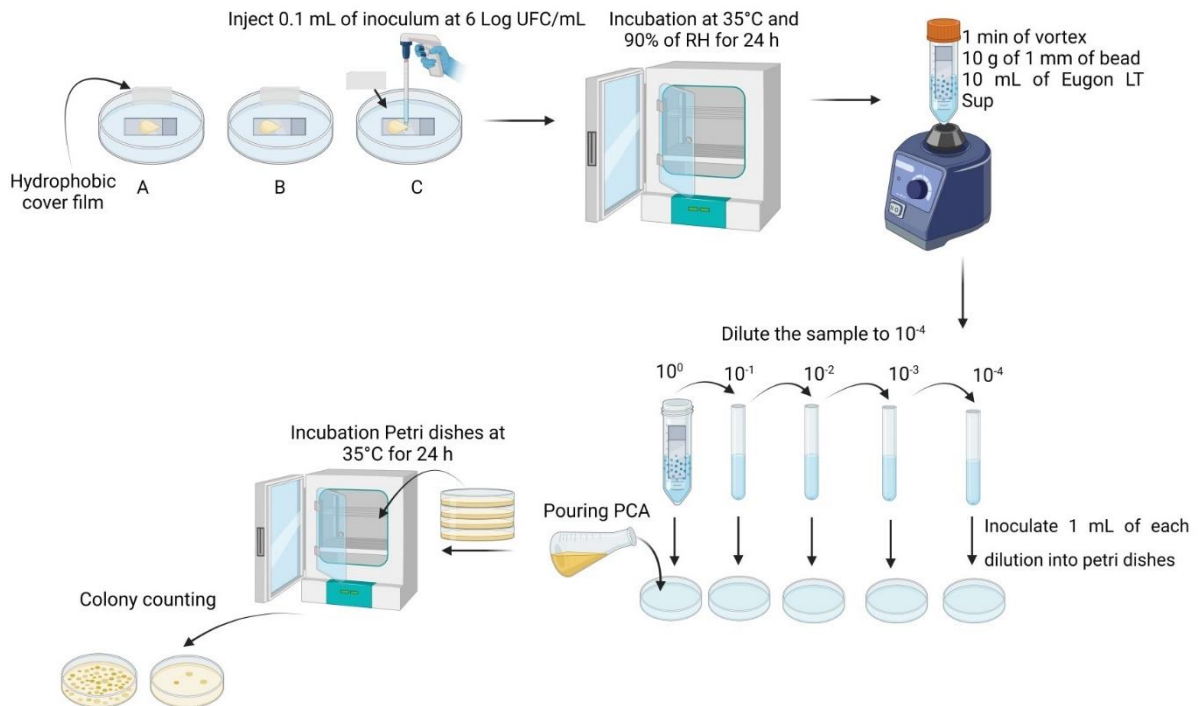


Figure 72: Schéma synoptique du protocole de mesure de l'activité antimicrobienne des surfaces, basé sur la méthode développée dans ce travail et inspirée de la norme ISO 22196:2011.

La section suivante examine la lixiviation des nanoparticules de ZnO dans les conditions expérimentales spécifiques, ainsi que la validation de leur neutralisation.

2.4. Analyse de la lixiviation des nanoparticules de ZnO et validation de leur neutralisation

a) Estimation de la concentration en ions Zn^{2+} dans une solution d'Eugon LT Sup agité au vortex en présence de films minces de ZnO et de billes

Dans cette section, nous analysons la lixiviation des NPs des films dans une solution d'Eugon LT Sup après avoir été agités au vortex en présence de billes, conformément à la nouvelle méthode de décrochage établie sur la base de la norme ISO 22196:2011.

L'analyse par ICP d'une solution d'Eugon LT Sup, après avoir agité au vortex un film de ZnO en présence de billes, a révélé une concentration de Zn^{2+} de 25 ppm (**Tableau 23**). Le relargage des NPs de ZnO peut être expliquée par le traitement physique auquel les films sont soumis, ce qui peut décrocher les NPs et les remettre en suspension.

Tableau 23: Analyse élémentaire et quantitative par ICP d'une solution d'Eugon LT Sup après avoir été soumise au vortex en présence de billes et de films de ZnO.

Eléments	Concentrations	CV
Zn2138	25,10 ± 0,09 ppm	0,3776

CV : Coefficient de variation.

Bien que cette concentration soit relativement faible, la neutralisation de leur activité antimicrobienne reste à valider, et fait l'objet de la section suivante.

b) Validation de la neutralisation de l'activité antibactérienne des nanoparticules par l'Eugon LT Sup

La concentration des *S. aureus* reste inchangée avant et après le contact avec la solution d'Eugon contenant les ions de zinc, ce qui suggère soit une efficacité de l'Eugon LT Sup à neutraliser l'activité antimicrobienne des NPs lixiviées, soit une concentration insuffisante pour inhiber les bactéries (**Tableau 24**). Ce résultat indique également que les données obtenues à partir de la méthode établie précédemment refléteront uniquement l'activité antimicrobienne des films de ZnO lorsque ceux-ci étaient en contact avec les bactéries pendant 24 heures à une humidité supérieure à 90% à 35°C.

Tableau 24: Validation de la neutralisation des nanoparticules de ZnO lixiviées par l'Eugon LT Sup.

Echantillons	Concentrations
Témoin	5,88 Log ₁₀ UFC/mL
L _i moyen	5,70 ± 0,01 Log ₁₀ UFC/mL

2.5. Conclusion

La validation d'une méthode de mesure de l'activité antimicrobienne des films est cruciale pour établir des conditions de test qui soient à la fois représentatives et reproductibles, garantissant ainsi la fiabilité des résultats obtenus. Cette étude a exploré l'application des normes ISO 7581:2023 et ISO 22196:2011 ainsi qu'une méthode semi-quantitative pour évaluer l'activité antimicrobienne de surfaces non poreuses en verre.

La norme ISO 7581:2023 et la méthode des lames gélosées ont démontré leur efficacité à décrocher les microorganismes des surfaces en verre. Quant à la norme ISO 22196:2011, elle a été adaptée et optimisée pour assurer un bon taux de décrochage des microorganismes, en particulier en combinant des procédés mécaniques et chimiques, incluant l'agitation au vortex en présence de billes de 1 mm dans l'Eugon LT Sup. Cette approche a permis de détacher intégralement les microorganismes des surfaces de verre.

L'analyse préliminaire par ICP a montré une faible concentration de Zn^{2+} dans la solution d'Eugon LT Sup après l'agitation au vortex des films de ZnO, suggérant une lixiviation des NPs. Toutefois, il a été confirmé que l'activité antimicrobienne des NPs était neutralisée.

Dans la suite de ce travail, nous appliquerons la méthode de la norme ISO 22196:2011 dans des conditions d'humidité relative $> 90\%$, utilisant une agitation mécanique au vortex en présence de 10 g billes de 1 mm dans l'Eugon LT Sup, non seulement parce qu'elle est couramment utilisée par les fournisseurs d'équipements de soins de santé, mais aussi parce qu'elle permet une période de contact prolongée entre les microorganismes et les NPs, favorisant ainsi l'observation de l'effet antimicrobien à long terme.

La norme ISO 22196:2011 utilisant des conditions d'exposition en condition d'humidité pourrait ne pas prédire de manière efficace l'efficacité des surfaces antimicrobiennes, car elle ne reflète pas fidèlement la réalité. Elle nécessite l'utilisation de conditions de test maintenant des quantités importantes de liquide pour permettre la diffusion des composés antimicrobiens, ainsi que des températures pouvant atteindre $37^{\circ}C$ [207, 285]. Cependant, malgré ces limitations, les résultats des tests conformes aux normes ASTM 2180 et ISO 22196 sont souvent utilisés par les fournisseurs d'équipements de soins de santé tel que le cathéter pour affirmer une activité antimicrobienne.

3. Etude de l'activité antimicrobienne de couches minces de ZnO : Effet de la microstructure des couches sur leur propriété antimicrobienne

La littérature existante a montré l'influence des paramètres tels que le taux de dopage [286-288], la concentration de précurseur [289], le ratio Zn/O [290], la morphologie et la taille des NPs des films minces de ZnO [291] sur leur activité antibactérienne. Certains auteurs suggèrent que les nanoplaques triangulaires ont la plus forte activité biocide, tandis que d'autres suggèrent que les NPs cubiques sont les plus efficaces en raison des plans réticulaires/facettes exposés [292]. De nombreuses études ont démontré qu'une forte croissance préférentielle des nanocristaux de ZnO le long de l'axe c (002) améliore leurs propriétés finales [293- 295]. Une

orientation plus élevée du pic de l'axe c (002) indique la minimisation des contraintes internes et de l'énergie de surface libre des films, ainsi qu'un empilement atomique dense [295]. Cependant, il y a peu de rapports qui se concentrent sur l'influence de la microstructure des films minces de ZnO sur leurs performances antimicrobiennes. La structure de surface détermine la zone de contact et la force d'adhérence entre la cellule bactérienne et la surface [296]. Les caractéristiques telles que l'hydrophobie [297], le potentiel et la charge [298], le motif [299] et la rugosité [300-301] ont démontré un impact sur l'adhésion des microorganismes. Yoda et al. [302] ont constaté que l'adhésion des *S. aureus* était plus importante sur les surfaces grossières que sur les surfaces fines. Silva et al. ont montré que la rugosité est le principal facteur déterminant l'adhésion bactérienne [303]. En général, les surfaces présentant une mouillabilité modérée sont plus aptes à fixer les bactéries ou les cellules que les surfaces extrêmement hydrophobes ou hydrophiles [304]. Li et al. [305] ont étudié l'adhésion de bactéries sur des surfaces en oxyde métallique. Ils ont montré que l'adhésion des bactéries est plus forte sur les surfaces les plus hydrophobes et augmente avec la force ionique.

De telles caractéristiques sur les films de ZnO, en plus de l'activité antimicrobienne intrinsèque du ZnO, pourraient améliorer leur activité antimicrobienne. C'est dans ce cadre que l'étude de l'influence de la microstructure des films de ZnO sur leur activité antimicrobienne sera présentée.

3.1. Influence sur l'activité antibactérienne

Les paramètres de synthèse des couches minces de ZnO étudiées sur les bactéries ainsi que leur rugosité sont récapitulés dans le **Tableau 25**.

Tableau 25: Caractéristiques des couches minces de ZnO sélectionnées dans le cadre de l'étude des propriétés antibactérienne

Solvants	Concentration	Ra (nm)
Propanol	0,1 M	8,3
	0,25 M	12,3
	0,4 M	6,6
Butanol	0,25 M	14,3
Ethanol	0,25 M	6,9

La **Figure 73** représente des images de boîtes gélosées où les échantillons ont été ensemencés après avoir été en contact avec les bactéries.

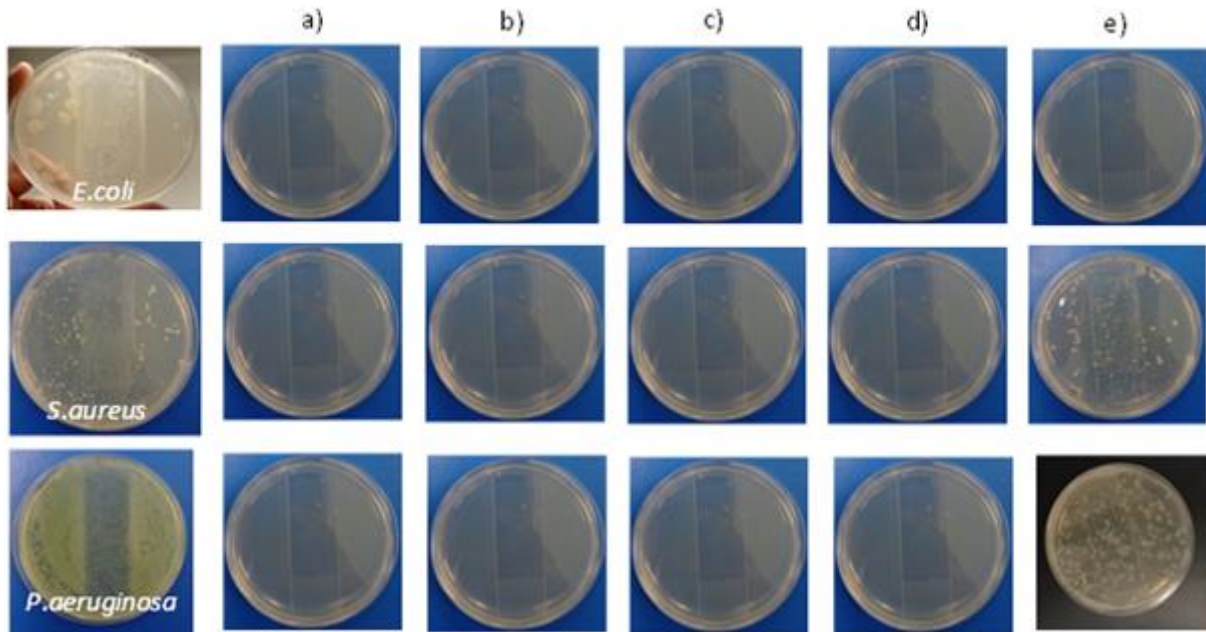


Figure 73: Activité antibactérienne de films minces de ZnO : a) 0,1 M Propanol ; b) 0,25 M Propanol ; c) 0,25 M Ethanol ; d) 0,25 M Butanol et e) 0,4 M Propanol.

L'absence de colonies de *E. coli*, *S. aureus*, et *P. aeruginosa* sur les boîtes des échantillons a) 0,1 M Propanol ; b) 0,25 M Propanol ; c) 0,25 M Ethanol et d) 0,25 M Butanol indique que la croissance de ces bactéries a été complètement inhibée.

Une observation similaire a été faite pour l'échantillon e) 0,4 M Propanol concernant *E. coli*, où les bactéries ont également été inhibées. En revanche, la présence de colonies de *S. aureus* et *P. aeruginosa* sur les échantillons indique un effet inhibiteur moins prononcé. Toutefois, cet effet reste significatif, car le nombre de colonies de *S. aureus* et *P. aeruginosa* sur les échantillons est inférieur à celui observé sur les témoins positifs.

L'activité antibactérienne des films est calculée et présentée dans le **Tableau 26**.

Tableau 26: Activité antibactérienne (R) de films minces de ZnO en Log₁₀ UFC/cm².

Bactéries	Témoin (U _t)	0,1 M Propanol	0,25 M Propanol	0,25 M Ethanol	0,25 M Butanol	0,4 M Propanol
<i>E. coli</i>	6,63 ± 0,10	< 0,1				
<i>S. aureus</i>	5,84 ± 0,16	< 0,1				4,09
<i>P. aeruginosa</i>	6,25 ± 0,24	< 0,1				4,61

L'activité antibactérienne de tous les échantillons contre *E. coli* est inférieure à 0.1 Log₁₀ UFC/cm², signifiant une inhibition de la croissance bactérienne. Des résultats similaires sont observés pour les deux autres bactéries, à l'exception de l'échantillon provenant de 0,4 M de propanol, qui a montré une activité antibactérienne de 4,09 Log₁₀ UFC/cm² et 4,61 Log₁₀ UFC/cm² sur *S. aureus* et *P. aeruginosa*, respectivement. Les échantillons préparés avec 0,4 M de propanol et 0,25 M d'éthanol présentent des rugosités similaires, évaluées respectivement à 6,6 nm et 6,9 nm. Cette observation suggère que la rugosité n'est pas le seul paramètre influençant l'efficacité antimicrobienne des films. En effet, la rugosité moyenne (Ra) correspond à la moyenne arithmétique des écarts absolus par rapport à la ligne médiane du profil et ne permet pas de différencier les pics des vallées. Par conséquent, d'autres facteurs, tels que la texturation de la surface et la morphologie des microorganismes, peuvent jouer un rôle significatif dans l'activité antimicrobienne des films.

L'analyse des **Figure 70-b** et **Figure 69-c**, représentant les images AFM des échantillons à 0,4 M de propanol et 0,25 M d'éthanol, révèle que la surface de l'échantillon à 0,25 M d'éthanol est globalement moins lisse. Cette surface présente un plus grand nombre de points de contact entre les microorganismes et les films minces, ce qui favorise l'adhésion des microorganismes et, en conséquence, améliore l'activité biocide des films.

La section suivante aborde de l'influence de la microstructure des films sur leur activité antifongique.

3.2. Influence sur l'activité antifongique contre *Candida albicans*

Les paramètres de synthèse des couches minces de ZnO étudiées sur *C. albicans* sont récapitulés dans le **Tableau 27**.

Tableau 27: Conditions de synthèse et rugosité des échantillons de couches minces étudiées sur le *C. albicans*.

Solvant	Concentration	Nomenclature	Ra (nm)
Propanol	0,1 M	0,1 M Propanol	8,28
	0,25 M	0,25 M Propanol	12,3
	0,4 M	0,4 M Propanol	6,55

La **Figure 74** montre des boîtes de Pétri contenant des milieux gélosés, dans lesquelles ont été ensemencées des solutions issues du vortex du mélange échantillon + Eugon LT Sup après la période de contact. Le nombre de colonies de *Candida albicans* présentes sur les boîtes varie considérablement en fonction des échantillons. L'échantillon 0,25 M Propanol présente le plus faible nombre de colonies, indiquant un meilleur effet inhibiteur contre *C. albicans*. Il existe une corrélation observable entre la rugosité des films et leur effet inhibiteur contre *C. albicans*. En effet, après l'échantillon à 0,25 M, l'échantillon à 0,1 M présente moins de colonies que l'échantillon à 0,4 M, suggérant que la rugosité influence l'effet inhibiteur des films.

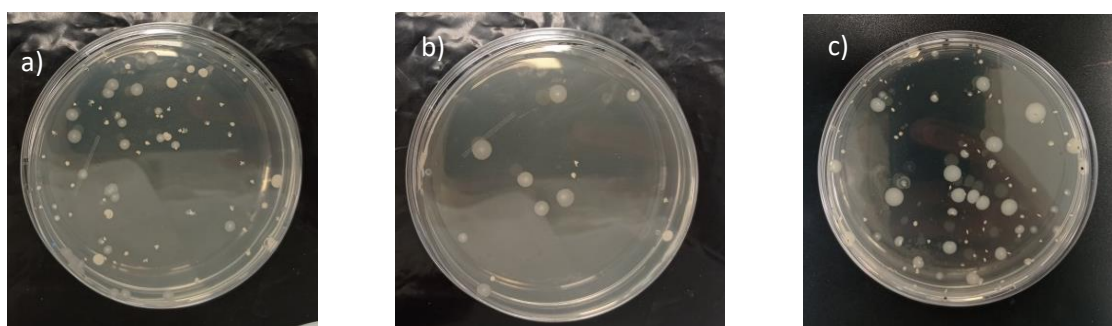


Figure 74: Activité antifongique de films minces de ZnO contre *C. albicans* : a) 0,1 M Propanol ; b) 0,25 M Propanol et c) 0,4 M Propanol.

Le **Tableau 28** met en évidence l'activité antifongique des films de ZnO *C. albicans*. L'activité antifongique est plus élevée ($R=0,72 \text{ Log}_{10} \text{ UFC/cm}^2$) pour l'échantillon à 0,25 M Propanol présentant la rugosité la plus élevée, ce qui confirme les résultats énoncés précédemment. Selon la réglementation sur l'effet antimicrobien des surfaces, une surface a un effet antimicrobien à partir d'une réduction logarithmique d'au moins $0,5 \text{ Log}_{10} \text{ UFC/cm}^2$. Dans ce contexte, les échantillons à 0,1 M Propanol et 0,4 M Propanol pourraient être considérés comme n'ayant pas d'effet significatif sur *C. albicans*. Cependant, l'activité antifongique de l'échantillon à 0,1 M Propanol (avec une réduction $R= 0,41 \text{ Log}_{10} \text{ UFC/cm}^2$) est supérieure à celle de l'échantillon à 0,4 M Propanol ($R = 0,22 \text{ Log}_{10} \text{ UFC/cm}^2$). Cela confirme que l'effet inhibiteur s'améliore avec l'augmentation de la rugosité des films, bien que ces échantillons n'atteignent pas le seuil requis pour être classés comme antimicrobiens.

Tableau 28: Activité antifongique de films minces de ZnO en $\text{Log}_{10} \text{ UFC/cm}^2$.

Microorganisme	Témoin (U_t)	0,1 M Propanol	0,25 M Propanol	0,4 M Propanol
<i>C. albicans</i>	$4,37 \pm 0,26$	0,41	0,72	0,22

3.3. Synthèse et analyse des résultats

Les résultats obtenus dans cette étude ont montré que l'activité antimicrobienne des films de ZnO variait selon leur microstructure.

L'amélioration de l'inhibition des films dans cette étude peut s'expliquer par la différence de leur rugosité, leur texture et de leur morphologie. De plus, l'interaction entre les microorganismes et les surfaces à motifs dépend de la géométrie, de la taille et de la hauteur de la surface à motifs [296].

La **Figure 75** illustre les différents mécanismes antibactériens des surfaces, sans se limiter qu'aux bactéries, en fonction de la taille des motifs.



Figure 75: L'efficacité antibactérienne et la taille des différents motifs de surface [296].

Selon Yang et al. [296], il existe trois (3) mécanismes antibactériens:

- Capacité bactéricide : Les structures, extrêmement petites et fines, percent ou déforment les membranes bactériennes, entraînant ainsi leur destruction physique.
- Aptitude à l'anti-adhésion bactérienne : La taille des motifs avoisine 1 μm . Leur surface rend difficile l'accrochage des bactéries, les forçant à glisser sans pouvoir se fixer, conférant ainsi des propriétés anti-adhésives.
- Piégeage des bactéries dans les vallées : Les motifs sont plus larges. Ils réduisent la capacité des bactéries à former des colonies en les piégeant dans des dépressions ou creux.

Bohinc et al. [306] ont étudié différents niveaux de rugosité (0,07 μm , 0,58 μm , 0,99 μm , 2,5 μm et 5,8 μm) et ont observé que le taux d'adhésion d'*E. coli*, de *P. aeruginosa* et de *S. aureus* augmentait proportionnellement à la rugosité de la surface. Une rugosité élevée augmente la surface de contact entre les microorganismes et les films de ZnO, augmentant ainsi la probabilité que les NPs interagissent avec les cellules et les tuent. Des films minces présentant des rugosités similaires ont démontré des activités antibactériennes distinctes contre *P.aeruginosa* et *S.aureus*. Cette différence peut probablement être attribuée à un plus grand nombre de points de contact présents sur le film ayant montré une efficacité supérieure. Enfin, la rugosité élevée ($R_a = 12,3 \text{ nm}$) de l'échantillon à 0,25 M Propanol a permis d'améliorer l'effet inhibiteur des films de ZnO contre *C. albicans*.

3.4. Conclusion

Dans cette étude, nous avons exploré la corrélation entre les propriétés structurales des films de ZnO et leur activité antimicrobienne. Nous avons mis en évidence l'impact de la rugosité des films sur l'augmentation de leur activité antimicrobienne. Des films présentant une rugosité de 6,9 à 14,3 nm ont inhibé les bactéries *E. coli*, *P. aeruginosa*, et *S. aureus*. Une réduction notable ($R = 0,72 \text{ Log}_{10} \text{ UFC/cm}^2$) des cellules de *Candida* a été observée sur l'échantillon de ZnO présentant la plus grande rugosité ($R_a = 12,3 \text{ nm}$), soulignant ainsi l'importance de ce paramètre.

Ainsi, les nanotopographies à motif créent une surface physiquement hostile pour les bactéries, tuant les cellules par des dommages biomécaniques [292]. Les résultats observés ouvrent la voie vers la conception de surfaces ultrabiocides et durables à base de NPs.

La section suivante examine l'activité antibactérienne des films d'une peinture formulée avec des poudres de NPs de ZnO.

4. Activité antibactérienne de la peinture formulée avec les nanoparticules de ZnO

Cette partie explore l'activité antibactérienne d'une peinture à base d'eau formulée avec des NPs de ZnO de 22 nm (Voire *Chapitre 3*).

La **Figure 76** représente un film de peinture sur lequel a été déposée une suspension de bactéries, ensuite recouvert d'un film en polypropylène. La concentration de NPs sur le film est estimée à 123 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ en supposant que la peinture a été dispersée de manière homogène.

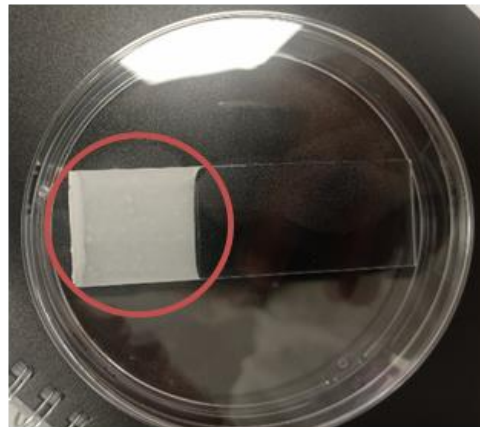


Figure 76: Film de peinture formulée avec des nanoparticules de ZnO.

La **Figure 77** illustre l'effet antibactérien de la peinture formulée avec des NPs. En comparaison avec les témoins, les géloses contenant la peinture formulée avec les NPs ne montrent pas de colonies de *S. aureus* ni d'*E. coli*, ce qui illustre l'effet inhibiteur de la peinture contre ces bactéries (**Figure 77-a et b**).

Le nombre de colonies sur des plaques de gélose ensemencées avec des échantillons dilués à 10^{-4} a été comparé au témoin pour mieux observer l'activité des NPs dans la peinture sur *P. aeruginosa*. La boîte de gélose contenant l'échantillon (**Figure 77-c**) présente moins de colonies comparées au témoin, mettant en évidence un effet des NPs contre *P. aeruginosa*. Cependant, cet effet reste insuffisant, comme le montre le **Tableau 19** où l'activité antibactérienne est inférieure à 0,5 Log_{10} UFC/ cm^2 .

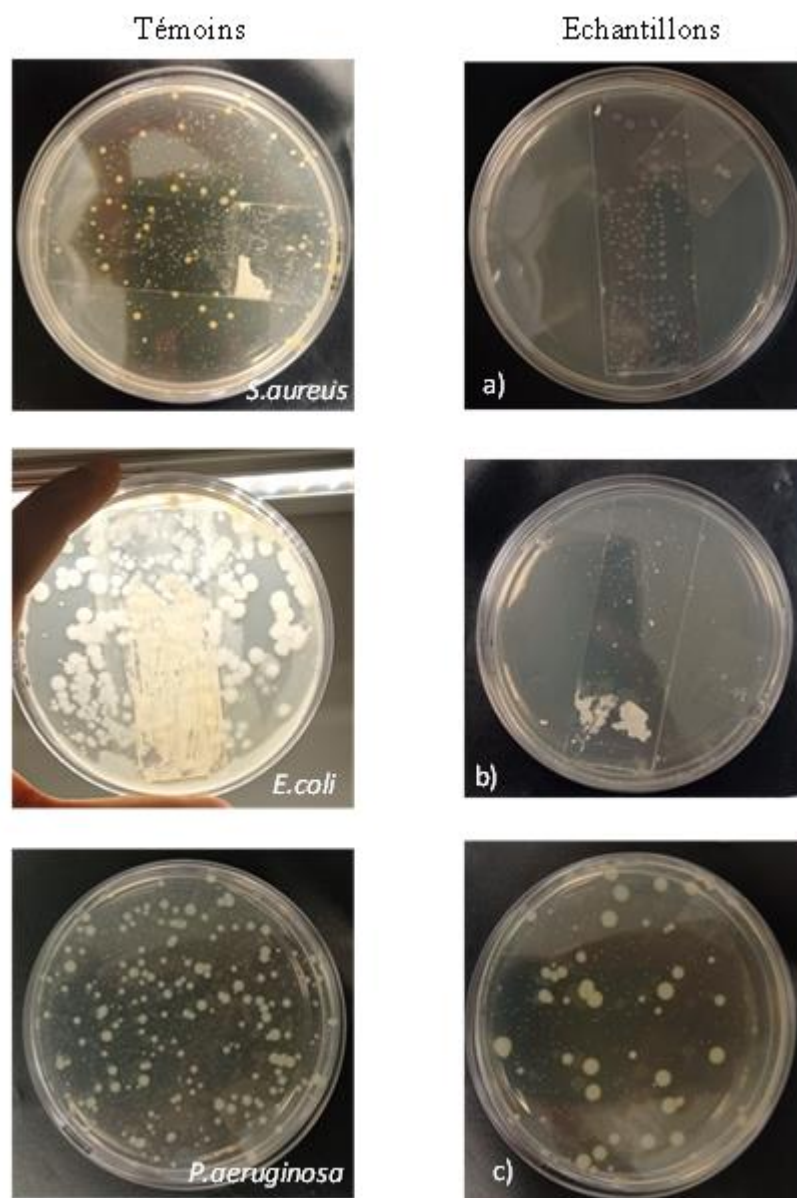


Figure 77: Effet antibactérien d'une peinture formulée avec des nanoparticules de ZnO contre a) *S. aureus* ; b) *E. coli* et c) *P. aeruginosa*.

L'activité antibactérienne de la peinture est calculée et présentée sur le **Tableau 29**.

Tableau 29: Activité antibactérienne d'une peinture formulée avec de nanoparticules de ZnO.

Type de bactéries	Témoins (U_t)	R
<i>S. aureus</i>	$4,55 \pm 0,32 \text{ Log}_{10} \text{ UFC/cm}^2$	$4,55 \text{ Log}_{10} \text{ UFC/cm}^2$
<i>E. coli</i>	$3,90 \pm 0,02 \text{ Log}_{10} \text{ UFC/cm}^2$	$3,90 \text{ Log}_{10} \text{ UFC/cm}^2$
<i>P. aeruginosa</i>	$6,41 \pm 0,11 \text{ Log}_{10} \text{ UFC/cm}^2$	$0,23 \text{ Log}_{10} \text{ UFC/cm}^2$

L'activité antibactérienne est plus élevée contre *S. aureus*, suivie par *E. coli*, tandis qu'aucun effet inhibiteur n'a été observé sur *P. aeruginosa*. Ces résultats sont cohérents avec les observations précédentes. La différence de sensibilité des bactéries vis-à-vis de la peinture s'explique par la variation de leur structure pariétale, notamment au niveau de la paroi, ainsi que par des différences génétiques entre ces espèces bactériennes. En effet, *S. aureus*, étant une bactérie à Gram positif, possède une paroi cellulaire plus facilement perméable que celle d'*E. coli*, une bactérie à Gram négatif. De plus, *P. aeruginosa* a un génome plus large que les deux autres bactéries, ce qui contribue à sa plus grande résistance.

4.1.Conclusion

Les résultats obtenus sur cette partie ont montré le potentiel antibactérien de films de peinture contenant $123\mu\text{g/cm}^2$ de NPs de ZnO. L'activité antibactérienne des NPs immobilisées sur les films de peintures a démontré une efficacité contre *S. aureus* et *E. coli*, tandis qu'elle s'est révélée moins efficace contre *P. aeruginosa*.

Des études futures devraient explorer des stratégies pour augmenter le pourcentage massique de NPs de ZnO dans la peinture tout en respectant les réglementations sur les biocides, ainsi que pour optimiser les caractéristiques des NPs afin d'améliorer encore leur efficacité antibactérienne contre cette bactérie.

Une augmentation du pourcentage massique permettrait d'améliorer l'activité antibactérienne contre *P. aeruginosa*. Néanmoins, cette expérimentation n'a pas été réalisée en raison de la quantité limitée de NPs produites par le procédé mis en place. Une étude de scale-up est nécessaire pour y parvenir, en tenant compte de la concentration maximale d'additif biocide réglementée. Une autre alternative serait de réduire la taille des NPs et de modifier leurs

caractéristiques structurales, comme leur morphologie, afin d'améliorer leur activité contre *P. aeruginosa* à un pourcentage massique identique ou à des concentrations plus faibles.

5. Conclusion générale

Ce travail a permis de mettre en place un procédé pour la préparation de films minces de ZnO avec différentes microstructures, influencées par les concentrations de précurseur et les types de solvants de synthèse. Les films de ZnO ont montré une augmentation du degré d'orientation préférentielle le long de l'axe c avec l'augmentation de la concentration en précurseur de zinc dans le propanol. Une rugosité optimale a été obtenue à une concentration de 0,25 M dans ce même solvant. Un impact du type de solvant sur la morphologie des films ainsi que sur leur rugosité a été observé : les films de butanol présentaient une plus grande rugosité.

La validation des méthodes d'évaluation de l'activité antimicrobienne des films est cruciale pour garantir la fiabilité des résultats obtenus. L'utilisation des normes ISO 7581:2024 et ISO 22196:2011, ainsi qu'une méthode semi-quantitative adaptée, a permis de démontrer l'efficacité de ces techniques pour évaluer l'activité antimicrobienne des surfaces non poreuses en verre. La norme ISO 22196:2011 adaptée est particulièrement intéressante pour évaluer l'activité antimicrobienne en raison de la période prolongée de contact qu'elle permet entre les échantillons et les microorganismes.

L'étude sur l'influence de la microstructure des films de ZnO sur les propriétés antibactériennes a révélé une amélioration de l'effet antimicrobien des films avec l'augmentation des irrégularités de surface, augmentant ainsi la surface de contact entre les NPs et les microorganismes.

En ce qui concerne l'activité antibactérienne des films de peinture formulée avec des nanoparticules de ZnO, il a été observé que ces dernières présentaient un effet inhibiteur sur *S. aureus* et *E. coli*. L'immobilisation des NPs sur les films a nettement amélioré leur efficacité contre *S. aureus*, *E. coli* et *P. aeruginosa* par rapport aux NPs en suspension présenté en *Chapitre 3* de ce document. Cependant, l'activité contre *P. aeruginosa* nécessite des améliorations, ce qui suggère des études futures visant à optimiser le pourcentage massique de NPs dans la peinture et à ajuster les caractéristiques des NPs pour renforcer leur efficacité antibactérienne contre cette bactérie.

Conclusion générale

Conclusion générale

Cette thèse s'inscrit dans le cadre de la lutte contre les infections nosocomiales en adoptant une approche préventive basée sur l'utilisation de NPs de ZnO comme agents antimicrobiens. Les objectifs principaux étaient d'étudier l'influence de la taille des NPs sur leur activité antibactérienne et antifongique, d'évaluer leur innocuité, de synthétiser des couches minces de ZnO aux propriétés antimicrobiennes et d'explorer leur application dans des revêtements antimicrobiens, notamment dans des peintures.

Dans un premier temps, l'optimisation des paramètres de synthèse des NPs et la préparation de dispersions stables ont été réalisées pour étudier l'influence de la taille des NPs sur leur activité antibactérienne. L'effet de la taille des NPs sur la CMI, la CMB et la cinétique de croissance bactérienne a ensuite été évalué.

Parmi les paramètres influençant la taille des NPs, le taux d'hydrolyse $[H_2O]/[Zn^{2+}]$ et le ratio $[MEA]/[Zn^{2+}]$ ont été identifiés comme ayant un effet significatif, avec des tailles variant de 22 nm à 69 nm. Des dispersions stables ont été obtenues en utilisant du polyacrylate de sodium (PAAS) comme agent dispersant.

L'effet antibactérien de trois tailles de NPs de ZnO (22 nm, 35 nm et 66 nm) a été étudié contre *E. coli*, *P. aeruginosa* et *S. aureus*. Globalement, l'activité antibactérienne augmentait à mesure que la taille des NPs diminuait. Les CMB étaient respectivement de 0,5 mg/mL, 0,6 mg/mL et 1,05 mg/mL pour des nanoparticules de 22 nm, 35 nm et 66 nm contre *E. coli*. Concernant *P. aeruginosa*, les valeurs étaient de 11 mg/mL, 13 mg/mL et 15 mg/mL pour les mêmes tailles, tandis que contre *S. aureus*, elles étaient de 0,30 mg/mL, 1,55 mg/mL et 1,70 mg/mL. En parallèle, la diminution de la taille des NPs prolongeait la durée de la phase de latence et réduisait le taux de croissance spécifique, augmentant ainsi le pourcentage d'inhibition bactérienne. Par exemple, la phase de latence d'*E. coli* est passée de 8,5 à 4 heures avec des NPs de 22 nm, 35 nm et 66 nm, à une concentration de 0,25 mg/mL. Pour *P. aeruginosa*, elle est passée de 24 heures à 15 heures, à une concentration de 1,50 mg/mL. Et pour *S. aureus*, de 15 à 10 heures avec des NPs de 22 nm, 35 nm et 66 nm, à une concentration de 0,1 mg/mL.

L'innocuité de NPs de 22 nm a été réalisée sur des cellules dermiques humaines, révélant une toxicité modérée avec une IC_{50} estimée à 71 $\mu\text{g}/\text{ML}$.

La synthèse des couches minces de ZnO antimicrobiennes a été menée en analysant l'influence de la concentration en précurseur et du type de solvant sur la microstructure, la morphologie et la rugosité des films. L'effet de ces paramètres sur les propriétés antimicrobiennes des films a ensuite été étudié. L'analyse topographique a révélé une rugosité maximale de 12,3 nm à une concentration de 0,25 M en précurseur dans le propanol, contre 8,3 nm et 6,6 nm pour des concentrations de 0,1 M et 0,4 M, respectivement. Dans l'éthanol, la rugosité augmentait avec la concentration en précurseur, passant de 6,9 nm à 7,2 nm puis à 12,4 nm lorsque la concentration augmentait de 0,1 M à 0,25 M et 0,4 M, respectivement. La rugosité augmentait avec la longueur de la chaîne carbonée des alcools, passant de 6,9 nm à 12,3 nm, puis à 14,3 nm pour les solvants éthanol, propanol et butanol, respectivement.

Les couches minces de ZnO présentant une rugosité entre 6,9 nm et 14,3 nm ont montré une inhibition significative contre *E. coli*, *P. aeruginosa* et *S. aureus*, tandis qu'une réduction notable de 0,72 Log_{10} UFC/cm² des cellules fongiques de *Candida albicans* a été observée sur l'échantillon présentant la rugosité la plus élevée (12,3 nm), testée sur cette levure.

Enfin, une peinture à base d'eau contenant des NPs de ZnO de 22 nm, à une concentration de 123 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$, a été formulée et testée contre les bactéries. Les films de peinture ont inhibé la croissance d'*E.coli* et *S. aureus*.

Perspectives

Les perspectives de ce travail peuvent s'orienter dans plusieurs directions :

- Étude de nouveaux matériaux visant à cibler *C. albicans*, qui a montré une sensibilité réduite aux NPs de ZnO, tant en suspension qu'en surface.

Une étude préliminaire a été menée sur des couches minces de CuO pour évaluer leur activité antifongique contre *Candida albicans*. Les conditions de synthèse étaient : un rapport $[\text{MEA}]/[\text{Zn}^{2+}]$ de 2 et un précurseur constitué d'acétate de cuivre monohydraté ($\text{Cu}(\text{CH}_3\text{COO})_2$, H_2O , Merck) à une concentration de 0,1 M. Les films obtenus appartenait à la variété monoclinique de CuO, avec deux pics de diffraction, observés à $2\theta = 35,1^\circ$ et $38,4^\circ$, correspondant aux plans de réticulaires (002) et (111), comme le montre la **Figure 78**.

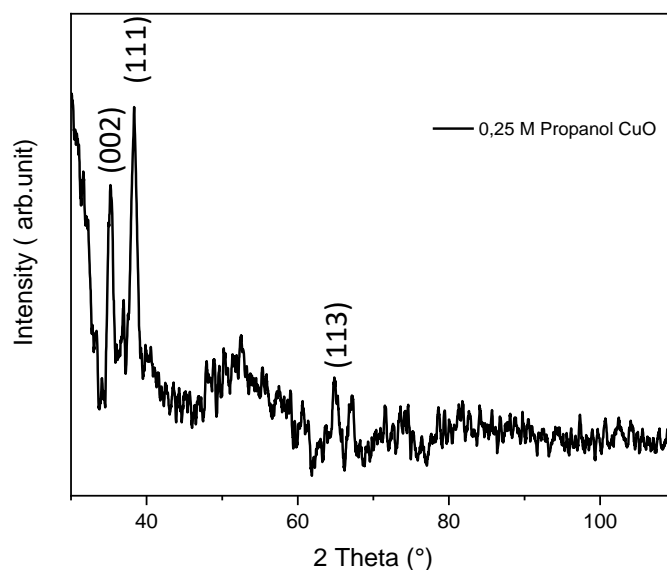


Figure 78: Diffractogrammes DRX de couches minces de CuO.

Les résultats concernant leur activité antifongique sont présentés dans le **Tableau 30**.

Tableau 30: Activité antifongique de couches minces de CuO contre *C. albicans*.

	Témoin	Couches mince de CuO
Concentrations	4,415 ±0,259 Log ₁₀ UFC/cm ²	4,103 ±0,176 Log ₁₀ UFC/cm ²
R	0,31 Log ₁₀ UFC/cm ²	

L'activité antifongique mesurée était de 0,31 Log₁₀ UFC/cm², inférieure à celle des couches de ZnO ayant exercé la plus forte activité contre *C. albicans* (0,72 Log₁₀ UFC/cm²). Afin de mieux comprendre l'influence du type de matériau sur l'activité antifongique, des analyses supplémentaires, telles que l'étude de la topographie, de la rugosité et de la morphologie, doivent être réalisées. De plus, les conditions de synthèse des couches minces de CuO différaient de celles des couches de ZnO, notamment avec un rapport [MEA]/[Zn²⁺] doublé pour la préparation des films de CuO en raison de la stabilité moindre de la solution colloïdale de CuO.

- La mise en place d'un procédé à l'échelle pilote, écoresponsable, vise à obtenir des matériaux plus respectueux de l'environnement et biocompatibles. Ce procédé permettra de contrôler avec précision les caractéristiques des NPs, telles que la taille, la morphologie et

la rugosité, afin d'optimiser leur activité antimicrobienne. Il offrira également la possibilité de synthétiser des NPs directement dispersées sous forme colloïdale stable, dans un solvant exempt d'activité antimicrobienne, en utilisant, par exemple, un réacteur en T-jonction. Par ailleurs, le dopage de divers matériaux ayant des propriétés antimicrobiennes, ainsi que leur fonctionnalisation, pourrait être exploré dans l'optique d'améliorer l'efficacité antimicrobienne des NPs tout en renforçant leur biocompatibilité.

- Réaliser des études à long terme pour évaluer la durabilité et la stabilité des films de ZnO ainsi que des peintures antimicrobiennes dans des conditions réelles d'utilisation.
- Une modélisation approfondie de la cinétique de croissance des microorganismes en présence de NPs : La méthode de mesure de la densité optique utilisée pour évaluer la cinétique de croissance des bactéries ne reflète pas la concentration des microorganismes vivants mais mesure également la turbidité des cellules mortes. Une modélisation plus précise en explorant des techniques alternatives comme la cytométrie en flux ou des méthodes basées sur la quantification de l'ADN pourrait être explorée.

RÉFÉRENCES

Références

- [1] S. Wahab, A. Salman, Z. Khan, S. Khan, C. Krishnaraj, et S.-I. Yun, « Metallic Nanoparticles: A Promising Arsenal against Antimicrobial Resistance—Unraveling Mechanisms and Enhancing Medication Efficacy », *International Journal of Molecular Sciences*, vol. 24, n° 19, Art. n° 19, janv. 2023, doi: 10.3390/ijms241914897.
- [2] P. Pereira-Silva *et al.*, « Antifungal activity of ZnO thin films prepared by glancing angle deposition », *Thin Solid Films*, vol. 687, p. 137461, oct. 2019, doi: 10.1016/j.tsf.2019.137461.
- [3] A. S. Baviskar, K. I. Khatib, D. Rajpal, et H. C. Dongare, « Nosocomial infections in surgical intensive care unit: A retrospective single-center study », *Int J Crit Illn Inj Sci*, vol. 9, n° 1, p. 16-20, 2019, doi: 10.4103/IJCIIS.IJCIIS_57_18.
- [4] T. Bento de Carvalho, J. B. Barbosa, et P. Teixeira, « Assessing Antimicrobial Efficacy on Plastics and Other Non-Porous Surfaces: A Closer Look at Studies Using the ISO 22196:2011 Standard », *Biology*, vol. 13, n° 1, Art. n° 1, janv. 2024, doi: 10.3390/biology13010059.
- [5] R. Kaur *et al.*, « Combating Microbial Infections Using Metal-Based Nanoparticles as Potential Therapeutic Alternatives », *Antibiotics*, vol. 12, n° 5, Art. n° 5, mai 2023, doi: 10.3390/antibiotics12050909.
- [6] A. Abdel-Hadi *et al.*, « Myco-Synthesis of Silver Nanoparticles and Their Bioactive Role against Pathogenic Microbes », *Biology*, vol. 12, n° 5, Art. n° 5, mai 2023, doi: 10.3390/biology12050661.
- [7] A. Pugazhendhi *et al.*, « Organic and inorganic nanomaterial coatings for the prevention of microbial growth and infections on biotic and abiotic surfaces », *Surface and Coatings Technology*, vol. 425, p. 127739, nov. 2021, doi: 10.1016/j.surfcoat.2021.127739.
- [8] A. Raghunath et E. Perumal, « Metal oxide nanoparticles as antimicrobial agents: a promise for the future », *International Journal of Antimicrobial Agents*, vol. 49, n° 2, p. 137-152, févr. 2017, doi: 10.1016/j.ijantimicag.2016.11.011.
- [9] R. Pachaiappan, S. Rajendran, P. L. Show, K. Manavalan, et Mu. Naushad, « Metal/metal oxide nanocomposites for bactericidal effect: A review », *Chemosphere*, vol. 272, p. 128607, juin 2021, doi: 10.1016/j.chemosphere.2020.128607.
- [10] V. Tiwari, N. Mishra, K. Gadani, P. S. Solanki, N. A. Shah, et M. Tiwari, « Mechanism of Anti-bacterial Activity of Zinc Oxide Nanoparticle Against Carbapenem-Resistant

- Acinetobacter baumannii », *Front. Microbiol.*, vol. 9, juin 2018, doi: 10.3389/fmicb.2018.01218.
- [11] S. Gautam *et al.*, « Transition metal-based nanoparticles as potential antimicrobial agents: recent advancements, mechanistic, challenges, and future prospects », *Discover Nano*, vol. 18, n° 1, p. 84, juin 2023, doi: 10.1186/s11671-023-03861-1.
- [12] A. Sukhanova, S. Bozrova, P. Sokolov, M. Berestovoy, A. Karaulov, et I. Nabiev, « Dependence of Nanoparticle Toxicity on Their Physical and Chemical Properties », *Nanoscale Res Lett*, vol. 13, n° 1, p. 44, févr. 2018, doi: 10.1186/s11671-018-2457-x.
- [13] S. Raha et Md. Ahmaruzzaman, « ZnO nanostructured materials and their potential applications: progress, challenges and perspectives », *Nanoscale Adv.*, vol. 4, n° 8, p. 1868-1925, 2022, doi: 10.1039/D1NA00880C.
- [14] L. Palanikumar, S. N. Ramasamy, et C. Balachandran, « Size-dependent antimicrobial response of zinc oxide nanoparticles », *IET nanobiotechnol.*, vol. 8, n° 2, p. 111-117, juin 2014, doi: 10.1049/iet-nbt.2012.0008.
- [15] J. Sawai, « Quantitative evaluation of antibacterial activities of metallic oxide powders (ZnO, MgO and CaO) by conductimetric assay », *Journal of Microbiological Methods*, vol. 54, n° 2, p. 177-182, août 2003, doi: 10.1016/S0167-7012(03)00037-X.
- [16] M. Izzi, M. C. Sportelli, L. Torsi, R. A. Picca, et N. Cioffi, « Synthesis and Antimicrobial Applications of ZnO Nanostructures: A Review », *ACS Appl. Nano Mater.*, vol. 6, n° 13, p. 10881-10902, juill. 2023, doi: 10.1021/acsanm.3c01432.
- [17] G. Dutta et A. Sugumaran, « Bioengineered zinc oxide nanoparticles: Chemical, green, biological fabrication methods and its potential biomedical applications », *Journal of Drug Delivery Science and Technology*, vol. 66, p. 102853, déc. 2021, doi: 10.1016/j.jddst.2021.102853.
- [18] S. Jiang, K. Lin, et M. Cai, « ZnO Nanomaterials: Current Advancements in Antibacterial Mechanisms and Applications », *Front. Chem.*, vol. 8, juill. 2020, doi: 10.3389/fchem.2020.00580.
- [19] « Perspective Chapter: Sol-Gel Science and Technology in Context of Nanomaterials – Recent Advances | IntechOpen ». Consulté le: 6 septembre 2024. [En ligne]. Disponible sur: <https://www.intechopen.com/chapters/86894>
- [20] N. Joudeh et D. Linke, « Nanoparticle classification, physicochemical properties, characterization, and applications: a comprehensive review for biologists », *Journal of Nanobiotechnology*, vol. 20, n° 1, p. 262, juin 2022, doi: 10.1186/s12951-022-01477-8.

- [21] J. M. V. Makabenta, A. Nabawy, C.-H. Li, S. Schmidt-Malan, R. Patel, et V. M. Rotello, « Nanomaterial-based therapeutics for antibiotic-resistant bacterial infections », *Nat Rev Microbiol*, vol. 19, n° 1, p. 23-36, janv. 2021, doi: 10.1038/s41579-020-0420-1.
- [22] V. Hada *et al.*, « Nanoantibiotic effect of carbon-based nanocomposites: epicentric on graphene, carbon nanotubes and fullerene composites: a review », *3 Biotech*, vol. 13, n° 5, p. 147, avr. 2023, doi: 10.1007/s13205-023-03552-9.
- [23] S. Maleki Dizaj, A. Mennati, S. Jafari, K. Khezri, et K. Adibkia, « Antimicrobial activity of carbon-based nanoparticles », *Adv Pharm Bull*, vol. 5, n° 1, p. 19-23, mars 2015, doi: 10.5681/apb.2015.003.
- [24] S. Sharmin, Md. M. Rahaman, C. Sarkar, O. Atolani, M. T. Islam, et O. S. Adeyemi, « Nanoparticles as antimicrobial and antiviral agents: A literature-based perspective study », *Heliyon*, vol. 7, n° 3, p. e06456, mars 2021, doi: 10.1016/j.heliyon.2021.e06456.
- [25] E. Sánchez-López *et al.*, « Metal-Based Nanoparticles as Antimicrobial Agents: An Overview », *Nanomaterials (Basel)*, vol. 10, n° 2, p. 292, févr. 2020, doi: 10.3390/nano10020292.
- [26] D. Franco, G. Calabrese, S. P. P. Guglielmino, et S. Conoci, « Metal-Based Nanoparticles: Antibacterial Mechanisms and Biomedical Application », *Microorganisms*, vol. 10, n° 9, Art. n° 9, sept. 2022, doi: 10.3390/microorganisms10091778.
- [27] X. Li, T. Huang, D. E. Heath, N. M. O'Brien-Simpson, et A. J. O'Connor, « Antimicrobial nanoparticle coatings for medical implants: Design challenges and prospects », *Biointerphases*, vol. 15, n° 6, p. 060801, nov. 2020, doi: 10.1116/6.0000625.
- [28] N. A. Rosli, Y. H. Teow, et E. Mahmoudi, « Current approaches for the exploration of antimicrobial activities of nanoparticles », *Sci Technol Adv Mater*, vol. 22, n° 1, p. 885-907, 2021, doi: 10.1080/14686996.2021.1978801.
- [29] T. C. Dakal, A. Kumar, R. S. Majumdar, et V. Yadav, « Mechanistic Basis of Antimicrobial Actions of Silver Nanoparticles », *Front Microbiol*, vol. 7, p. 1831, 2016, doi: 10.3389/fmicb.2016.01831.
- [30] E. Baranowska-Wójcik, D. Szwajgier, P. Oleszczuk, et A. Winiarska-Mieczan, « Effects of Titanium Dioxide Nanoparticles Exposure on Human Health—a Review », *Biol Trace Elem Res*, vol. 193, n° 1, p. 118-129, janv. 2020, doi: 10.1007/s12011-019-01706-6.
- [31] S. Jafari, B. Mahyad, H. Hashemzadeh, S. Janfaza, T. Gholikhani, et L. Tayebi, « Biomedical Applications of TiO₂ Nanostructures: Recent Advances », *Int J Nanomedicine*, vol. 15, p. 3447-3470, 2020, doi: 10.2147/IJN.S249441.

- [32] Y. Wang, C. Wen, P. Hodgson, et Y. Li, « Biocompatibility of TiO₂ nanotubes with different topographies », *J Biomed Mater Res A*, vol. 102, n° 3, p. 743-751, mars 2014, doi: 10.1002/jbm.a.34738.
- [33] A. K. Gupta et S. Wells, « Surface-modified superparamagnetic nanoparticles for drug delivery: preparation, characterization, and cytotoxicity studies », *IEEE Trans Nanobioscience*, vol. 3, n° 1, p. 66-73, mars 2004, doi: 10.1109/tnb.2003.820277.
- [34] N. Lewinski, V. Colvin, et R. Drezek, « Cytotoxicity of nanoparticles », *Small*, vol. 4, n° 1, p. 26-49, janv. 2008, doi: 10.1002/smll.200700595.
- [35] L.-H. Zhao, J. Zhang, et S.-Q. Sun, « Stable aqueous ZnO nanoparticles with green photoluminescence and biocompatibility », *Journal of Luminescence*, vol. 132, n° 10, p. 2595-2598, oct. 2012, doi: 10.1016/j.jlumin.2012.04.028.
- [36] L.-H. Zhao, R. Zhang, J. Zhang, et S.-Q. Sun, « Synthesis and characterization of biocompatible ZnO nanoparticles », *CrystEngComm*, vol. 14, n° 3, p. 945-950, janv. 2012, doi: 10.1039/C1CE05621B.
- [37] G. Bisht et S. Rayamajhi, « ZnO Nanoparticles: A Promising Anticancer Agent », *Nanobiomedicine*, vol. 3, p. 9, janv. 2016, doi: 10.5772/63437.
- [38] J. Zhou, N. S. Xu, et Z. L. Wang, « Dissolving Behavior and Stability of ZnO Wires in Biofluids: A Study on Biodegradability and Biocompatibility of ZnO Nanostructures », *Advanced Materials*, vol. 18, n° 18, p. 2432-2435, sept. 2006, doi: 10.1002/adma.200600200.
- [39] T. G. Smijs et S. Pavel, « Titanium dioxide and zinc oxide nanoparticles in sunscreens: focus on their safety and effectiveness », *Nanotechnology, Science and Applications*, vol. 4, p. 95-112, oct. 2011, doi: 10.2147/NSA.S19419.
- [40] H. Kaya *et al.*, « Effects of zinc oxide nanoparticles on bioaccumulation and oxidative stress in different organs of tilapia (*Oreochromis niloticus*) », *Environmental Toxicology and Pharmacology*, vol. 40, n° 3, p. 936-947, nov. 2015, doi: 10.1016/j.etap.2015.10.001.
- [41] T. J. Brunner *et al.*, « In vitro cytotoxicity of oxide nanoparticles: comparison to asbestos, silica, and the effect of particle solubility », *Environ Sci Technol*, vol. 40, n° 14, p. 4374-4381, juill. 2006, doi: 10.1021/es052069i.
- [42] Y.-N. Chang, M. Zhang, L. Xia, J. Zhang, et G. Xing, « The Toxic Effects and Mechanisms of CuO and ZnO Nanoparticles », *Materials*, vol. 5, n° 12, Art. n° 12, déc. 2012, doi: 10.3390/ma5122850.

- [43] V. D. Subramaniam *et al.*, « Health hazards of nanoparticles: understanding the toxicity mechanism of nanosized ZnO in cosmetic products », *Drug and Chemical Toxicology*, vol. 42, n° 1, p. 84-93, janv. 2019, doi: 10.1080/01480545.2018.1491987.
- [44] L. Wang, C. Hu, et L. Shao, « The antimicrobial activity of nanoparticles: present situation and prospects for the future », *Int J Nanomedicine*, vol. 12, p. 1227-1249, févr. 2017, doi: 10.2147/IJN.S121956.
- [45] H. Li, Q. Chen, J. Zhao, et K. Urmila, « Enhancing the antimicrobial activity of natural extraction using the synthetic ultrasmall metal nanoparticles », *Sci Rep*, vol. 5, n° 1, Art. n° 1, juin 2015, doi: 10.1038/srep11033.
- [46] I. Armentano *et al.*, « The interaction of bacteria with engineered nanostructured polymeric materials: a review », *ScientificWorldJournal*, vol. 2014, p. 410423, 2014, doi: 10.1155/2014/410423.
- [47] W. Gao, S. Thamphiwatana, P. Angsantikul, et L. Zhang, « Nanoparticle approaches against bacterial infections », *Wiley Interdiscip Rev Nanomed Nanobiotechnol*, vol. 6, n° 6, p. 532-547, 2014, doi: 10.1002/wnan.1282.
- [48] B. Luan, T. Huynh, et R. Zhou, « Complete wetting of graphene by biological lipids », *Nanoscale*, vol. 8, n° 10, p. 5750-5754, mars 2016, doi: 10.1039/C6NR00202A.
- [49] J. Butler, R. D. Handy, M. Upton, et A. Besinis, « Review of Antimicrobial Nanocoatings in Medicine and Dentistry: Mechanisms of Action, Biocompatibility Performance, Safety, and Benefits Compared to Antibiotics », *ACS Nano*, vol. 17, n° 8, p. 7064-7092, avr. 2023, doi: 10.1021/acsnano.2c12488.
- [50] S. Sharmin, Md. M. Rahaman, C. Sarkar, O. Atolani, M. T. Islam, et O. S. Adeyemi, « Nanoparticles as antimicrobial and antiviral agents: A literature-based perspective study », *Heliyon*, vol. 7, n° 3, p. e06456, mars 2021, doi: 10.1016/j.heliyon.2021.e06456.
- [51] J. Sawai, « Quantitative evaluation of antibacterial activities of metallic oxide powders (ZnO, MgO and CaO) by conductimetric assay », *Journal of Microbiological Methods*, vol. 54, n° 2, p. 177-182, août 2003, doi: 10.1016/S0167-7012(03)00037-X.
- [52] A. Lipovsky, Z. Tzitrinovich, H. Friedmann, G. Applerot, A. Gedanken, et R. Lubart, « EPR Study of Visible Light-Induced ROS Generation by Nanoparticles of ZnO », *J. Phys. Chem. C*, vol. 113, n° 36, p. 15997-16001, sept. 2009, doi: 10.1021/jp904864g.
- [53] K. Hirota, M. Sugimoto, M. Kato, K. Tsukagoshi, T. Tanigawa, et H. Sugimoto, « Preparation of zinc oxide ceramics with a sustainable antibacterial activity under dark conditions », *Ceramics International*, vol. 36, n° 2, p. 497-506, mars 2010, doi: 10.1016/j.ceramint.2009.09.026.

- [54] R. K. Dutta, B. P. Nenavathu, M. K. Gangishetty, et A. V. R. Reddy, « Studies on antibacterial activity of ZnO nanoparticles by ROS induced lipid peroxidation », *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, vol. 94, p. 143-150, juin 2012, doi: 10.1016/j.colsurfb.2012.01.046.
- [55] N. Padmavathy et R. Vijayaraghavan, « Enhanced bioactivity of ZnO nanoparticles—an antimicrobial study », *Science and Technology of Advanced Materials*, vol. 9, n° 3, p. 035004, juill. 2008, doi: 10.1088/1468-6996/9/3/035004.
- [56] M. Fang, J.-H. Chen, X.-L. Xu, P.-H. Yang, et H. F. Hildebrand, « Antibacterial activities of inorganic agents on six bacteria associated with oral infections by two susceptibility tests », *International Journal of Antimicrobial Agents*, vol. 27, n° 6, p. 513-517, juin 2006, doi: 10.1016/j.ijantimicag.2006.01.008.
- [57] S. Magder, « Reactive oxygen species: toxic molecules or spark of life? », *Crit Care*, vol. 10, n° 1, p. 208, févr. 2006, doi: 10.1186/cc3992.
- [58] B. Abebe, E. A. Zereffa, A. Tadesse, et H. C. A. Murthy, « A Review on Enhancing the Antibacterial Activity of ZnO: Mechanisms and Microscopic Investigation », *Nanoscale Res Lett*, vol. 15, n° 1, p. 190, oct. 2020, doi: 10.1186/s11671-020-03418-6.
- [59] Kumar Rajesh, Umar Ahmad, Kumar Girish, et H. S. Nalwa, « Antimicrobial properties of ZnO nanomaterials: A review », *Ceramics International*, vol. 43, n° 5, p. 3940-3961, avr. 2017, doi: 10.1016/j.ceramint.2016.12.062.
- [60] S. Raha et M. Ahmaruzzaman, « ZnO nanostructured materials and their potential applications: progress, challenges and perspectives », *Nanoscale Adv.*, vol. 4, n° 8, p. 1868-1925, avr. 2022, doi: 10.1039/D1NA00880C.
- [61] U. Manzoor, S. Siddique, R. Ahmed, Z. Noreen, H. Bokhari, et I. Ahmad, « Antibacterial, Structural and Optical Characterization of Mechano-Chemically Prepared ZnO Nanoparticles », *PLoS One*, vol. 11, n° 5, p. e0154704, 2016, doi: 10.1371/journal.pone.0154704.
- [62] S. Raha et Md. Ahmaruzzaman, « ZnO nanostructured materials and their potential applications: progress, challenges and perspectives », *Nanoscale Adv.*, vol. 4, n° 8, p. 1868-1925, 2022, doi: 10.1039/D1NA00880C.
- [63] S. Halder *et al.*, « Alteration of Zeta potential and membrane permeability in bacteria: a study with cationic agents », *Springerplus*, vol. 4, p. 672, nov. 2015, doi: 10.1186/s40064-015-1476-7.
- [64] N. Babayevska *et al.*, « ZnO size and shape effect on antibacterial activity and cytotoxicity profile », *Sci Rep*, vol. 12, p. 8148, mai 2022, doi: 10.1038/s41598-022-12134-3.

- [65] A. Sirelkhatim *et al.*, « Review on Zinc Oxide Nanoparticles: Antibacterial Activity and Toxicity Mechanism », *Nanomicro Lett*, vol. 7, n° 3, p. 219-242, 2015, doi: 10.1007/s40820-015-0040-x.
- [66] W. Jiang, H. Mashayekhi, et B. Xing, « Bacterial toxicity comparison between nano- and micro-scaled oxide particles », *Environmental Pollution*, vol. 157, n° 5, p. 1619-1625, mai 2009, doi: 10.1016/j.envpol.2008.12.025.
- [67] S. M. Dizaj, F. Lotfipour, M. Barzegar-Jalali, M. H. Zarrintan, et K. Adibkia, « Antimicrobial activity of the metals and metal oxide nanoparticles », *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl*, vol. 44, p. 278-284, nov. 2014, doi: 10.1016/j.msec.2014.08.031.
- [68] K. Tanji *et al.*, « Epigrammatic progress on the photocatalytic properties of ZnO and TiO₂ based hydroxyapatite@photocatalyst toward organic molecules photodegradation: A review », *Journal of Water Process Engineering*, vol. 53, p. 103682, juill. 2023, doi: 10.1016/j.jwpe.2023.103682.
- [69] S. V. Gudkov, D. E. Burmistrov, D. A. Serov, M. B. Rebezov, A. A. Semenova, et A. B. Lisitsyn, « A Mini Review of Antibacterial Properties of ZnO Nanoparticles », *Front. Phys.*, vol. 9, mars 2021, doi: 10.3389/fphy.2021.641481.
- [70] S. Parham, D. H. B. Wicaksono, S. Bagherbaigi, S. L. Lee, et H. Nur, « Antimicrobial Treatment of Different Metal Oxide Nanoparticles: A Critical Review », *Journal of the Chinese Chemical Society*, vol. 63, n° 4, p. 385-393, 2016, doi: 10.1002/jccs.201500446.
- [71] S. Jha, R. Rani, et S. Singh, « Biogenic Zinc Oxide Nanoparticles and Their Biomedical Applications: A Review », *J Inorg Organomet Polym*, vol. 33, n° 6, p. 1437-1452, juin 2023, doi: 10.1007/s10904-023-02550-x.
- [72] K. M. Mohamed, J. J. Benitto, J. J. Vijaya, et M. Bououdina, « Recent Advances in ZnO-Based Nanostructures for the Photocatalytic Degradation of Hazardous, Non-Biodegradable Medicines », *Crystals*, vol. 13, n° 2, Art. n° 2, févr. 2023, doi: 10.3390/cryst13020329.
- [73] N. Khairnar, H. Kwon, S. Park, H. Lee, et J. Park, « Tailoring the Size and Shape of ZnO Nanoparticles for Enhanced Performance of OLED Device », *Nanomaterials*, vol. 13, n° 21, Art. n° 21, janv. 2023, doi: 10.3390/nano13212816.
- [74] M. Ramya, T. K. Nideep, V. P. N. Nampoore, et M. Kailasnath, « The impact of ZnO nanoparticle size on the performance of photoanodes in DSSC and QDSSC: a comparative study », *J Mater Sci: Mater Electron*, vol. 32, n° 3, p. 3167-3179, févr. 2021, doi: 10.1007/s10854-020-05065-0.

- [75] A. Sirelkhatim *et al.*, « Review on Zinc Oxide Nanoparticles: Antibacterial Activity and Toxicity Mechanism », *Nanomicro Lett*, vol. 7, n° 3, p. 219-242, 2015, doi: 10.1007/s40820-015-0040-x.
- [76] J. Pasquet *et al.*, « Antimicrobial activity of zinc oxide particles on five micro-organisms of the Challenge Tests related to their physicochemical properties », *Int J Pharm*, vol. 460, n° 1-2, p. 92-100, janv. 2014, doi: 10.1016/j.ijpharm.2013.10.031.
- [77] R. Álvarez-Chimal *et al.*, « Influence of the particle size on the antibacterial activity of green synthesized zinc oxide nanoparticles using *Dysphania ambrosioides* extract, supported by molecular docking analysis », *Arabian Journal of Chemistry*, vol. 15, n° 6, p. 103804, juin 2022, doi: 10.1016/j.arabjc.2022.103804.
- [78] S. George *et al.*, « Use of a rapid cytotoxicity screening approach to engineer a safer zinc oxide nanoparticle through iron doping », *ACS Nano*, vol. 4, n° 1, p. 15-29, janv. 2010, doi: 10.1021/nn901503q.
- [79] S. Anandhi, A. Sagaya Amala Immanuel, V. Ramkumar, et C. Sudhakar, « Effect of solvent on ZnO nanoparticles by simple sol-gel method », *Materials Today: Proceedings*, juill. 2023, doi: 10.1016/j.matpr.2023.06.232.
- [80] C. Dhand *et al.*, « Methods and strategies for the synthesis of diverse nanoparticles and their applications: a comprehensive overview », *RSC Advances*, vol. 5, n° 127, p. 105003-105037, 2015, doi: 10.1039/C5RA19388E.
- [81] D. Bokov *et al.*, « Nanomaterial by Sol-Gel Method: Synthesis and Application », *Advances in Materials Science and Engineering*, vol. 2021, p. e5102014, déc. 2021, doi: 10.1155/2021/5102014.
- [82] K. Deshmukh, T. Kovářik, T. Křenek, D. Docheva, T. Stich, et J. Pola, « Recent advances and future perspectives of sol–gel derived porous bioactive glasses: a review », *RSC Adv.*, vol. 10, n° 56, p. 33782-33835, sept. 2020, doi: 10.1039/D0RA04287K.
- [83] *Sol-Gel Derived Optical and Photonic Materials*. Elsevier, 2020. doi: 10.1016/C2018-0-02962-X.
- [84] L. Znaidi, « Sol–gel-deposited ZnO thin films: A review », *Materials Science and Engineering: B*, vol. 174, n° 1, p. 18-30, oct. 2010, doi: 10.1016/j.mseb.2010.07.001.
- [85] M. Niederberger et G. Garnweitner, « Organic Reaction Pathways in the Nonaqueous Synthesis of Metal Oxide Nanoparticles », *Chemistry – A European Journal*, vol. 12, n° 28, p. 7282-7302, 2006, doi: 10.1002/chem.200600313.
- [86] D. Kashchiev, *Nucleation*. Elsevier, 2000.

- [87] P. G. Vekilov, « Nucleation », *Crystal Growth & Design*, vol. 10, n° 12, p. 5007-5019, déc. 2010, doi: 10.1021/cg1011633.
- [88] L. Znaidi, G. J. A. A. S. Illia, R. L. Guennic, C. Sanchez, et A. Kanaev, « Elaboration of ZnO Thin Films with Preferential Orientation by a Soft Chemistry Route », *Journal of Sol-Gel Science and Technology*, vol. 26, n° 1, p. 817-821, janv. 2003, doi: 10.1023/A:1020795515478.
- [89] L. Znaidi, « Sol-gel-deposited ZnO thin films: A review », *Materials Science and Engineering: B*, vol. 174, n° 1, p. 18-30, oct. 2010, doi: 10.1016/j.mseb.2010.07.001.
- [90] « Molecular Expressions Cell Biology: Bacteria Cell Structure ». Consulté le: 5 septembre 2024. [En ligne]. Disponible sur: <https://micro.magnet.fsu.edu/cells/bacteriacell.html>
- [91] M. Rohde, « The Gram-Positive Bacterial Cell Wall », *Microbiol Spectr*, vol. 7, n° 3, p. 7.3.10, mai 2019, doi: 10.1128/microbiolspec.GPP3-0044-2018.
- [92] M. Rajagopal et S. Walker, « Envelope Structures of Gram-Positive Bacteria », in *Protein and Sugar Export and Assembly in Gram-positive Bacteria*, vol. 404, F. Bagnoli et R. Rappuoli, Éd., in Current Topics in Microbiology and Immunology, vol. 404. , Cham: Springer International Publishing, 2015, p. 1-44. doi: 10.1007/82_2015_5021.
- [93] B. Jubeh, Z. Breijyeh, et R. Karaman, « Resistance of Gram-Positive Bacteria to Current Antibacterial Agents and Overcoming Approaches », *Molecules*, vol. 25, n° 12, p. 2888, juin 2020, doi: 10.3390/molecules25122888.
- [94] « Identification and Classification of Microbes », in *Microbes*, John Wiley & Sons, Ltd, 2012, p. 275-337. doi: 10.1002/9781118311912.ch4.
- [95] J. Zhou *et al.*, « Breaking down the cell wall: Still an attractive antibacterial strategy », *Front Microbiol*, vol. 13, p. 952633, 2022, doi: 10.3389/fmicb.2022.952633.
- [96] J. Sun, S. T. Rutherford, T. J. Silhavy, et K. C. Huang, « Physical properties of the bacterial outer membrane », *Nature reviews. Microbiology*, vol. 20, n° 4, p. 236, avr. 2022, doi: 10.1038/s41579-021-00638-0.
- [97] L. Brown, J. M. Wolf, R. Prados-Rosales, et A. Casadevall, « Through the wall: extracellular vesicles in Gram-positive bacteria, mycobacteria and fungi », *Nat Rev Microbiol*, vol. 13, n° 10, Art. n° 10, oct. 2015, doi: 10.1038/nrmicro3480.
- [98] B. K. Behera, « Chapter 4 - Release of intracellular materials phase-III », in *Techniques for Downstream Process for Biologic Drugs and Vaccines*, B. K. Behera, Éd., in Developments in Applied Microbiology and Biotechnology. , Academic Press, 2023, p. 87-113. doi: 10.1016/B978-0-443-19157-2.00004-2.

- [99] X. Xie et P. N. Lipke, « On the evolution of fungal and yeast cell walls », *Yeast*, vol. 27, n° 8, p. 479-488, août 2010, doi: 10.1002/yea.1787.
- [100] P. N. Lipke et R. Ovalle, « Cell Wall Architecture in Yeast: New Structure and New Challenges », *J Bacteriol*, vol. 180, n° 15, p. 3735-3740, août 1998.
- [101] H. Zlotnik, M. P. Fernandez, B. Bowers, et E. Cabib, « Saccharomyces cerevisiae mannoproteins form an external cell wall layer that determines wall porosity », *J Bacteriol*, vol. 159, n° 3, p. 1018-1026, sept. 1984, doi: 10.1128/jb.159.3.1018-1026.1984.
- [102] R. Kollár *et al.*, « Architecture of the Yeast Cell Wall: $\beta(1\rightarrow6)$ -GLUCAN INTERCONNECTS MANNOPROTEIN, $\beta(1\rightarrow3)$ -GLUCAN, AND CHITIN* », *Journal of Biological Chemistry*, vol. 272, n° 28, p. 17762-17775, juill. 1997, doi: 10.1074/jbc.272.28.17762.
- [103] J. G. De Nobel, F. M. Klis, J. Priem, T. Munnik, et H. Van Den Ende, « The glucanase-soluble mannoproteins limit cell wall porosity in *Saccharomyces cerevisiae* », *Yeast*, vol. 6, n° 6, p. 491-499, 1990, doi: 10.1002/yea.320060606.
- [104] M. Quirós, P. Morales, L. Pérez-Través, J. M. Barcenilla, et R. Gonzalez, « A new methodology to determine cell wall mannoprotein content and release in wine yeasts », *Food Chemistry*, vol. 125, n° 2, p. 760-766, mars 2011, doi: 10.1016/j.foodchem.2010.08.066.
- [105] R. Dadi, R. Azouani, M. Traore, C. Mielcarek, et A. Kanaev, « Antibacterial activity of ZnO and CuO nanoparticles against gram positive and gram negative strains », *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl*, vol. 104, p. 109968, nov. 2019, doi: 10.1016/j.msec.2019.109968.
- [106] C. Toma *et al.*, « Multiplex PCR assay for identification of human diarrheagenic *Escherichia coli* », *J Clin Microbiol*, vol. 41, n° 6, p. 2669-2671, juin 2003, doi: 10.1128/JCM.41.6.2669-2671.2003.
- [107] C. L. Schoch *et al.*, « NCBI Taxonomy: a comprehensive update on curation, resources and tools », *Database*, vol. 2020, p. baaa062, janv. 2020, doi: 10.1093/database/baaa062.
- [108] G. F. Picheth *et al.*, « Bacterial cellulose in biomedical applications: A review », *International Journal of Biological Macromolecules*, vol. 104, p. 97-106, nov. 2017, doi: 10.1016/j.ijbiomac.2017.05.171.
- [109] J. Masuoka, « Surface glycans of *Candida albicans* and other pathogenic fungi: physiological roles, clinical uses, and experimental challenges », *Clin Microbiol Rev*, vol. 17, n° 2, p. 281-310, avr. 2004, doi: 10.1128/cmr.17.2.281-310.2004.
- [110] B. Mc Manus et D. Coleman, « MOLECULAR EPIDEMIOLOGY. PHYLOGENY AND EVOLUTION OF *Candida albicans* », 2014, doi: 10.1016/j.meegid.2013.11.008.

- [111] A. D. Hernday, S. M. Noble, Q. M. Mitrovich, et A. D. Johnson, « Genetics and Molecular Biology in *Candida albicans* », in *Methods in Enzymology*, vol. 470, Elsevier, 2010, p. 737-758. doi: 10.1016/S0076-6879(10)70031-8.
- [112] J. Talapko *et al.*, « *Candida albicans*—The Virulence Factors and Clinical Manifestations of Infection », *J Fungi (Basel)*, vol. 7, n° 2, p. 79, janv. 2021, doi: 10.3390/jof7020079.
- [113] J. P. Richardson, « *Candida albicans*: A Major Fungal Pathogen of Humans », *Pathogens*, vol. 11, n° 4, p. 459, avr. 2022, doi: 10.3390/pathogens11040459.
- [114] P. Pereira-Silva *et al.*, « Antifungal activity of ZnO thin films prepared by glancing angle deposition », *Thin Solid Films*, vol. 687, p. 137461, oct. 2019, doi: 10.1016/j.tsf.2019.137461.
- [115] P. Sanjenbam, J. V. Gopal, et K. Kannabiran, « Anticandidal activity of silver nanoparticles synthesized using *Streptomyces* sp.VITPK1 », *Journal de Mycologie Médicale*, vol. 24, n° 3, p. 211-219, sept. 2014, doi: 10.1016/j.mycmed.2014.03.004.
- [116] H. Zeng, M. Stadler, W.-R. Abraham, M. Müsken, et H. Schrey, « Inhibitory Effects of the Fungal Pigment Rubiginosin C on Hyphal and Biofilm Formation in *Candida albicans* and *Candida auris* », *J Fungi (Basel)*, vol. 9, n° 7, p. 726, juill. 2023, doi: 10.3390/jof9070726.
- [117] D. Kornitzer, « Regulation of *Candida albicans* Hyphal Morphogenesis by Endogenous Signals », *J Fungi (Basel)*, vol. 5, n° 1, p. 21, févr. 2019, doi: 10.3390/jof5010021.
- [118] F. Ghorbani, P. Gorji, M. S. Mobarakeh, H. R. Mozaffari, R. Masaeli, et M. Safaei, « Optimized Synthesis of Xanthan gum/ZnO/TiO₂Nanocomposite with High Antifungal Activity against Pathogenic *Candida albicans* », *Journal of Nanomaterials*, vol. 2022, p. e7255181, avr. 2022, doi: 10.1155/2022/7255181.
- [119] « Understanding Vaginal Thrush », Verywell Health. Consulté le: 22 décembre 2023. [En ligne]. Disponible sur: <https://www.verywellhealth.com/vaginal-thrush-5113479>
- [120] T. Das, S. Sehar, et M. Manefield, « The roles of extracellular DNA in the structural integrity of extracellular polymeric substance and bacterial biofilm development », *Environmental Microbiology Reports*, vol. 5, n° 6, p. 778-786, 2013, doi: 10.1111/1758-2229.12085.
- [121] C. Solano, M. Echeverz, et I. Lasa, « Biofilm dispersion and quorum sensing », *Current Opinion in Microbiology*, vol. 18, p. 96-104, avr. 2014, doi: 10.1016/j.mib.2014.02.008.
- [122] « Lutter contre les biofilms alimentaire lors du nettoyage ». Consulté le: 4 septembre 2024. [En ligne]. Disponible sur: <https://www.enzynov.fr/blog/lutter-contre-les-biofilms-alimentaire-lors-du-nettoyage>

- [123] M. Mohd Nadzir, R. W. Nurhayati, F. N. Idris, et M. H. Nguyen, « Biomedical Applications of Bacterial Exopolysaccharides: A Review », *Polymers (Basel)*, vol. 13, n° 4, p. 530, févr. 2021, doi: 10.3390/polym13040530.
- [124] N. Rabin, Y. Zheng, C. Opoku-Temeng, Y. Du, E. Bonsu, et H. O. Sintim, « Biofilm formation mechanisms and targets for developing antibiofilm agents », *Future Med Chem*, vol. 7, n° 4, p. 493-512, 2015, doi: 10.4155/fmc.15.6.
- [125] A. Bharti, K. Velmourougane, et R. Prasanna, « Phototrophic biofilms: diversity, ecology and applications », *Journal of Applied Phycology*, vol. 29, déc. 2017, doi: 10.1007/s10811-017-1172-9.
- [126] H.-C. Flemming, T. Neu, et D. Wozniak, « The EPS matrix: The “House of Biofilm cells” », *Journal of bacteriology*, vol. 189, p. 7945-7, déc. 2007, doi: 10.1128/JB.00858-07.
- [127] C. Ryder, M. Byrd, et D. J. Wozniak, « Role of polysaccharides in *Pseudomonas aeruginosa* biofilm development », *Current Opinion in Microbiology*, vol. 10, n° 6, p. 644-648, déc. 2007, doi: 10.1016/j.mib.2007.09.010.
- [128] O. Y. A. Costa, J. M. Raaijmakers, et E. E. Kuramae, « Microbial Extracellular Polymeric Substances: Ecological Function and Impact on Soil Aggregation », *Frontiers in Microbiology*, vol. 9, juill. 2018, doi: 10.3389/fmicb.2018.01636.
- [129] D. Manou *et al.*, « The Complex Interplay Between Extracellular Matrix and Cells in Tissues: Methods and Protocols », in *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)*, vol. 1952, 2019, p. 1-20. doi: 10.1007/978-1-4939-9133-4_1.
- [130] N. K. Karamanos *et al.*, « A guide to the composition and functions of the extracellular matrix », *FEBS J*, vol. 288, n° 24, p. 6850-6912, déc. 2021, doi: 10.1111/febs.15776.
- [131] A. Theocharis, C. Gialeli, V. Hascall, et N. K. Karamanos, « 1.1 Extracellular matrix: a functional scaffold », in *Extracellular Matrix: Pathobiology and Signaling*, De Gruyter, 2012, p. 3-20. doi: 10.1515/9783110258776.3.
- [132] C. Frantz, K. M. Stewart, et V. M. Weaver, « The extracellular matrix at a glance », *Journal of Cell Science*, vol. 123, n° 24, p. 4195-4200, déc. 2010, doi: 10.1242/jcs.023820.
- [133] M. A. Rather, K. Gupta, et M. Mandal, « Microbial biofilm: formation, architecture, antibiotic resistance, and control strategies », *Braz J Microbiol*, vol. 52, n° 4, p. 1701-1718, sept. 2021, doi: 10.1007/s42770-021-00624-x.
- [134] A. V. Samrot *et al.*, « Mechanisms and Impact of Biofilms and Targeting of Biofilms Using Bioactive Compounds—A Review », *Medicina (Kaunas)*, vol. 57, n° 8, p. 839, août 2021, doi: 10.3390/medicina57080839.

- [135] S. T. Asma *et al.*, « An Overview of Biofilm Formation–Combating Strategies and Mechanisms of Action of Antibiofilm Agents », *Life (Basel)*, vol. 12, n° 8, p. 1110, juill. 2022, doi: 10.3390/life12081110.
- [136] C. J. Van Oss, R. J. Good, et M. K. Chaudhury, « The role of van der Waals forces and hydrogen bonds in “hydrophobic interactions” between biopolymers and low energy surfaces », *Journal of Colloid and Interface Science*, vol. 111, n° 2, p. 378-390, juin 1986, doi: 10.1016/0021-9797(86)90041-X.
- [137] J. Palmer, S. Flint, et J. Brooks, « Bacterial cell attachment, the beginning of a biofilm », *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, vol. 34, n° 9, p. 577-588, sept. 2007, doi: 10.1007/s10295-007-0234-4.
- [138] M. Jamal *et al.*, « Bacterial biofilm and associated infections », *Journal of the Chinese Medical Association*, vol. 81, n° 1, p. 7-11, janv. 2018, doi: 10.1016/j.jcma.2017.07.012.
- [139] D. W. Hiebner, C. Barros, L. Quinn, S. Vitale, et E. Casey, « Surface functionalization-dependent localization and affinity of SiO₂ nanoparticles within the biofilm EPS matrix », *Biofilm*, vol. 2, p. 100029, déc. 2020, doi: 10.1016/j.biofilm.2020.100029.
- [140] A. M. Kocot et M. A. Olszewska, « Biofilm formation and microscopic analysis of biofilms formed by *Listeria monocytogenes* in a food processing context », *LWT*, vol. 84, p. 47-57, oct. 2017, doi: 10.1016/j.lwt.2017.05.042.
- [141] M. Toyofuku, T. Inaba, T. Kiyokawa, N. Obana, Y. Yawata, et N. Nomura, « Environmental factors that shape biofilm formation », *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, vol. 80, n° 1, p. 7-12, janv. 2016, doi: 10.1080/09168451.2015.1058701.
- [142] C. Solano, M. Echeverz, et I. Lasa, « Biofilm dispersion and quorum sensing », *Current Opinion in Microbiology*, vol. 18, p. 96-104, avr. 2014, doi: 10.1016/j.mib.2014.02.008.
- [143] O. E. Petrova et K. Sauer, « Escaping the biofilm in more than one way: desorption, detachment or dispersion », *Current Opinion in Microbiology*, vol. 30, p. 67-78, avr. 2016, doi: 10.1016/j.mib.2016.01.004.
- [144] X. Zeng, Y. Zou, J. Zheng, S. Qiu, L. Liu, et C. Wei, « Quorum sensing-mediated microbial interactions: Mechanisms, applications, challenges and perspectives », *Microbiological Research*, vol. 273, p. 127414, août 2023, doi: 10.1016/j.micres.2023.127414.
- [145] W. C. Fuqua, S. C. Winans, et E. P. Greenberg, « Quorum sensing in bacteria: the LuxR-LuxI family of cell density-responsive transcriptional regulators », *J Bacteriol*, vol. 176, n° 2, p. 269-275, janv. 1994, doi: 10.1128/jb.176.2.269-275.1994.

- [146] A. D. Verderosa, « Nitroxide functionalised antibiotics for the eradication of bacterial biofilms », PhD, Queensland University of Technology, 2019. doi: 10.5204/thesis.eprints.135167.
- [147] « Clinging to crevices, E. coli thrive ». Consulté le: 25 décembre 2023. [En ligne]. Disponible sur: <https://seas.harvard.edu/news/2013/04/clinging-crevices-e-coli-thrive>
- [148] C. G. Pierce *et al.*, « The Candida albicans Biofilm Matrix: Composition, Structure and Function », *J Fungi (Basel)*, vol. 3, n° 1, p. 14, mars 2017, doi: 10.3390/jof3010014.
- [149] O. Rendueles, J. B. Kaplan, et J.-M. Ghigo, « Antibiofilm polysaccharides », *Environmental Microbiology*, vol. 15, n° 2, p. 334-346, 2013, doi: 10.1111/j.1462-2920.2012.02810.x.
- [150] C. de la Fuente-Núñez, M. H. Cardoso, E. de Souza Cândido, O. L. Franco, et R. E. W. Hancock, « Synthetic antibiofilm peptides », *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes*, vol. 1858, n° 5, p. 1061-1069, mai 2016, doi: 10.1016/j.bbamem.2015.12.015.
- [151] A. Kacou, A. Ouvrard, D. Jamet, J.-L. Jamet, et Y. Blache, « Towards eco-friendly biocides: preparation, antibiofilm activity of hemibastadin analogues », *Lett Appl Microbiol*, vol. 68, n° 4, p. 360-368, avr. 2019, doi: 10.1111/lam.13150.
- [152] X.-H. Li et J.-H. Lee, « Antibiofilm agents: A new perspective for antimicrobial strategy », *J Microbiol*, vol. 55, n° 10, p. 753-766, oct. 2017, doi: 10.1007/s12275-017-7274-x.
- [153] M. Airhart, « Biofilm Discovery Suggests New Way to Prevent Dangerous Infections », UT News. Consulté le: 10 juin 2024. [En ligne]. Disponible sur: <https://news.utexas.edu/2017/05/22/discovery-might-help-prevent-dangerous-infections/>
- [154] P. C. Balaure et A. M. Grumezescu, « Recent Advances in Surface Nanoengineering for Biofilm Prevention and Control. Part I: Molecular Basis of Biofilm Recalcitrance. Passive Anti-Biofouling Nanocoatings », *Nanomaterials*, vol. 10, n° 6, Art. n° 6, juin 2020, doi: 10.3390/nano10061230.
- [155] « Définition d'une peinture », Techniques de l'Ingénieur. Consulté le: 28 mai 2024. [En ligne]. Disponible sur: <https://www.techniques-ingenieur.fr/base-documentaire/procedes-chimie-bio-agro-th2/elaboration-des-formulations-42335210/formulation-des-peintures-j2270/definition-d-une-peinture-j2270niv10001.html>
- [156] « Types of Paints and Coatings (Binders) », in *Paints, Coatings and Solvents*, John Wiley & Sons, Ltd, 1998, p. 11-100. doi: 10.1002/9783527611867.ch2.
- [157] R. F. G. Brown, « ADDITIVES IN COATINGS - A NECESSARY EVIL? ».

- [158] B. Fiorentino, L. Golanski, A. Guiot, J.-F. Damlencourt, et D. Boutry, « Influence of paints formulations on nanoparticles release during their life cycle », *J Nanopart Res*, vol. 17, n° 3, p. 149, mars 2015, doi: 10.1007/s11051-015-2962-0.
- [159] L. Hochmannova et J. Vytrasova, « Photocatalytic and antimicrobial effects of interior paints », *Progress in Organic Coatings*, vol. 67, n° 1, p. 1-5, janv. 2010, doi: 10.1016/j.porgcoat.2009.09.016.
- [160] S. M. Amorim, J. Suave, L. Andrade, A. M. Mendes, H. J. José, et R. F. P. M. Moreira, « Towards an efficient and durable self-cleaning acrylic paint containing mesoporous TiO₂ microspheres », *Progress in Organic Coatings*, vol. 118, p. 48-56, mai 2018, doi: 10.1016/j.porgcoat.2018.01.005.
- [161] J. Vidales-Herrera et I. López, « Nanomaterials in coatings: an industrial point of view », in *Handbook of Nanomaterials for Manufacturing Applications*, Elsevier, 2020, p. 51-77. doi: 10.1016/B978-0-12-821381-0.00003-X.
- [162] « Applications of Emulsion Polymers », in *Principles and Applications of Emulsion Polymerization*, John Wiley & Sons, Ltd, 2008, p. 223-247. doi: 10.1002/9780470377949.ch9.
- [163] G. Davison, B. Lane, et D. Kruythoff, « Cellulose ether thickeners - key elements for complete rheology solutions », in *Additives in Water-borne Coatings*, G. Davison et B. C. Lane, Éd., The Royal Society of Chemistry, 2003, p. 15-22. doi: 10.1039/9781847550057-00015.
- [164] « Formulation des peintures », Techniques de l'Ingénieur. Consulté le: 4 septembre 2024. [En ligne]. Disponible sur: <https://www.techniques-ingenieur.fr/base-documentaire/procedes-chimie-bio-agro-th2/elaboration-des-formulations-42335210/formulation-des-peintures-j2270/>
- [165] A. M. C. Maan, A. H. Hofman, W. M. de Vos, et M. Kamperman, « Recent Developments and Practical Feasibility of Polymer-Based Antifouling Coatings », *Advanced Functional Materials*, vol. 30, n° 32, p. 2000936, 2020, doi: 10.1002/adfm.202000936.
- [166] J.-P. Kaiser, L. Diener, et P. Wick, « Nanoparticles in paints: A new strategy to protect façades and surfaces? », *J. Phys.: Conf. Ser.*, vol. 429, p. 012036, avr. 2013, doi: 10.1088/1742-6596/429/1/012036.
- [167] P. Ganguli et S. Chaudhuri, « Nanomaterials in antimicrobial paints and coatings to prevent biodegradation of man-made surfaces: A review », *Materials Today: Proceedings*, vol. 45, p. 3769-3777, janv. 2021, doi: 10.1016/j.matpr.2021.01.275.

- [168] P. Samyn, J. Bosmans, et P. Cosemans, « Current Alternatives for In-Can Preservation of Aqueous Paints: A Review », *Materials Proceedings*, vol. 7, n° 1, Art. n° 1, 2021, doi: 10.3390/IOCPS2021-11245.
- [169] J.-P. Kaiser, S. Zuin, et P. Wick, « Is nanotechnology revolutionizing the paint and lacquer industry? A critical opinion », *Science of The Total Environment*, vol. 442, p. 282-289, janv. 2013, doi: 10.1016/j.scitotenv.2012.10.009.
- [170] W. Agustin, M. T. Albari, M. A. Ghifari, M. R. Ghifari, D. Purnamasari, et R. S. Mandeli, « The antibacterial properties of paint with the addition of ZnO nanoparticles », *AIP Conference Proceedings*, vol. 3001, n° 1, p. 030004, févr. 2024, doi: 10.1063/5.0184163.
- [171] H. Foudi, A. Soukeur, G. Rekhila, M. Trari, et M. Amara, « Synthesis and characterization of ZnO nanoparticles for antibacterial paints », *Chem. Pap.*, vol. 77, n° 3, p. 1489-1496, mars 2023, doi: 10.1007/s11696-022-02565-7.
- [172] A. Alali, A. Hosseini-Abari, A. Bahrami, et M. Yazdan Mehr, « Biosynthesis of Copper Oxide and Silver Nanoparticles by Bacillus Spores and Evaluation of the Feasibility of Their Use in Antimicrobial Paints », *Materials*, vol. 16, n° 13, Art. n° 13, janv. 2023, doi: 10.3390/ma16134670.
- [173] M. Abdulkhakimov, R. Khaydarov, P. T. Krishnamurthy, et S. Evgrafova, « Silver-Nanoparticle-Embedded Antimicrobial Paints », in *Handbook of Consumer Nanoproducts*, S. Mallakpour et C. M. Hussain, Éd., Singapore: Springer, 2021, p. 1-10. doi: 10.1007/978-981-15-6453-6_105-1.
- [174] Y. Qi *et al.*, « AgCu Nanoparticles as an Antibacterial Coating for Wood », *ACS Appl. Nano Mater.*, vol. 7, n° 5, p. 5339-5347, mars 2024, doi: 10.1021/acsanm.3c06115.
- [175] M. A. Abdulkareem, M. S. Joudi, et A. H. Ali, « Eco-friendly synthesis of low-cost antibacterial agent (brown attapulгите-Ag nanocomposite) for environmental application », *Chemical Data Collections*, vol. 37, p. 100814, févr. 2022, doi: 10.1016/j.cdc.2021.100814.
- [176] D. Steinerová, A. Kalendová, J. Machotová, et M. Pejchalová, « Environmentally Friendly Water-Based Self-Crosslinking Acrylate Dispersion Containing Magnesium Nanoparticles and Their Films Exhibiting Antimicrobial Properties », *Coatings*, vol. 10, n° 4, Art. n° 4, avr. 2020, doi: 10.3390/coatings10040340.
- [177] M. C. Chen, P. W. Koh, V. K. Ponnusamy, et S. L. Lee, « Titanium dioxide and other nanomaterials based antimicrobial additives in functional paints and coatings: Review », *Progress in Organic Coatings*, vol. 163, p. 106660, févr. 2022, doi: 10.1016/j.porgcoat.2021.106660.

- [178] A. C. F. Tornero, M. G. Blasco, M. C. Azqueta, C. F. Acevedo, C. S. Castro, et S. J. R. López, « Antimicrobial ecological waterborne paint based on novel hybrid nanoparticles of zinc oxide partially coated with silver », *Progress in Organic Coatings*, vol. 121, p. 130-141, août 2018, doi: 10.1016/j.porgcoat.2018.04.018.
- [179] 2014/312/EU: Commission Decision of 28 May 2014 establishing the ecological criteria for the award of the EU Ecolabel for indoor and outdoor paints and varnishes (notified under document C(2014) 3429) Text with EEA relevance, vol. 164. 2014. Consulté le: 22 juin 2024. [En ligne]. Disponible sur: <http://data.europa.eu/eli/dec/2014/312/oj/eng>
- [180] L. Znaidi, G. J. A. A. Soler Illia, S. Benyahia, C. Sanchez, et A. V. Kanaev, « Oriented ZnO thin films synthesis by sol-gel process for laser application », *Thin Solid Films*, vol. 428, n° 1, p. 257-262, mars 2003, doi: 10.1016/S0040-6090(02)01219-1.
- [181] L. Znaidi, « Sol-gel-deposited ZnO thin films: A review », *Materials Science and Engineering: B*, vol. 174, n° 1, p. 18-30, oct. 2010, doi: 10.1016/j.mseb.2010.07.001.
- [182] B. Lallo da Silva, B. L. Caetano, B. G. Chiari-Andréo, R. C. L. R. Pietro, et L. A. Chiavacci, « Increased antibacterial activity of ZnO nanoparticles: Influence of size and surface modification », *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, vol. 177, p. 440-447, mai 2019, doi: 10.1016/j.colsurfb.2019.02.013.
- [183] Z. Luo *et al.*, « Ultrasonic-Assisted Dispersion of ZnO Nanoparticles and Its Inhibition Activity to *Trichoderma viride* », *J Nanosci Nanotechnol*, vol. 18, n° 4, p. 2352-2360, avr. 2018, doi: 10.1166/jnn.2018.14397.
- [184] Y. Li, L. Xu, X. Li, X. Shen, et A. Wang, « Effect of aging time of ZnO sol on the structural and optical properties of ZnO thin films prepared by sol-gel method », *Applied Surface Science*, vol. 256, n° 14, p. 4543-4547, mai 2010, doi: 10.1016/j.apsusc.2010.02.044.
- [185] I. Karaduman Er, S. Uysal, A. Ateş, et S. Acar, « Some sol-gel processing parameters effect on the properties of dip coated TiO₂ thin films », *J Mater Sci: Mater Electron*, vol. 34, n° 20, p. 1512, juill. 2023, doi: 10.1007/s10854-023-10930-9.
- [186] J. E. Post et D. L. Bish, « Rietveld refinement of crystal structures using powder X-ray diffraction data », *Reviews in Mineralogy and Geochemistry*, vol. 20, n° 1, p. 277-308, janv. 1989.
- [187] K. D. Vernon-Parry, « Scanning electron microscopy: an introduction », *III-Vs Review*, vol. 13, n° 4, p. 40-44, juill. 2000, doi: 10.1016/S0961-1290(00)80006-X.
- [188] A. Mohammed et A. Abdullah, « Scanning Electron Microscopy (SEM): A Review », janv. 2019.

- [189] K. Vojisavljević, M. Šćepanović, T. Srećković, M. Grujić-Brojčin, Z. Branković, et G. Branković, « Structural characterization of mechanically milled ZnO: influence of zirconia milling media », *J. Phys.: Condens. Matter*, vol. 20, n° 47, p. 475202, nov. 2008, doi: 10.1088/0953-8984/20/47/475202.
- [190] J. Anastassopoulou, M. Kyriakidou, P. Nisianakis, G. Papatheodorou, M. Rallis, et T. Theophanides, « The Environmental Effects of Lead Concentrations on Protein and DNA Structures in Epileptic Patients from an Infrared Spectroscopic Study », *Journal of Basic & Applied Sciences*, vol. 15, p. 56-63, janv. 2019, doi: 10.29169/1927-5129.2019.15.07.
- [191] M. Baillieul, « Capteurs infrarouges de polluants aquatiques : synthèse, optimisation et qualification », 2018.
- [192] « The Bacterial Growth Curve and the Factors Affecting Microbial Growth », ThoughtCo. Consulté le: 5 septembre 2024. [En ligne]. Disponible sur: <https://www.thoughtco.com/bacterial-growth-curve-phases-4172692>
- [193] B. Kowalska-Krochmal et R. Dudek-Wicher, « The Minimum Inhibitory Concentration of Antibiotics: Methods, Interpretation, Clinical Relevance », *Pathogens*, vol. 10, n° 2, p. 165, févr. 2021, doi: 10.3390/pathogens10020165.
- [194] I. Gajic *et al.*, « Antimicrobial Susceptibility Testing: A Comprehensive Review of Currently Used Methods », *Antibiotics (Basel)*, vol. 11, n° 4, p. 427, mars 2022, doi: 10.3390/antibiotics11040427.
- [195] I. Wiegand, K. Hilpert, et R. E. W. Hancock, « Agar and broth dilution methods to determine the minimal inhibitory concentration (MIC) of antimicrobial substances », *Nat Protoc*, vol. 3, n° 2, p. 163-175, févr. 2008, doi: 10.1038/nprot.2007.521.
- [196] J. Beal *et al.*, « Robust estimation of bacterial cell count from optical density », *Commun Biol*, vol. 3, n° 1, Art. n° 1, sept. 2020, doi: 10.1038/s42003-020-01127-5.
- [197] P. Mira, P. Yeh, et B. G. Hall, « Estimating microbial population data from optical density », *PLoS One*, vol. 17, n° 10, p. e0276040, oct. 2022, doi: 10.1371/journal.pone.0276040.
- [198] C. McGoverin, C. Steed, A. Esan, J. Robertson, S. Swift, et F. Vanholsbeeck, « Optical methods for bacterial detection and characterization », *APL Photonics*, vol. 6, n° 8, p. 080903, août 2021, doi: 10.1063/5.0057787.
- [199] I. El-Habib *et al.*, « Synthesis by soft chemistry of size-controlled zinc oxide (ZnO) nanocrystals for antimicrobial applications », *MATEC Web of Conferences*, vol. 379, mai 2023, doi: 10.1051/mateconf/202337906003.

- [200] M. Balouiri, M. Sadiki, et S. K. Ibsouda, « Methods for in vitro evaluating antimicrobial activity: A review », *J Pharm Anal*, vol. 6, n° 2, p. 71-79, avr. 2016, doi: 10.1016/j.jpha.2015.11.005.
- [201] R. Dadi, « Synthèse de nanoparticules d'oxydes métalliques et leur activité antibactérienne », phdthesis, Université Paris-Nord - Paris XIII, 2019. Consulté le: 12 avril 2024. [En ligne]. Disponible sur: <https://theses.hal.science/tel-03119316>
- [202] T. Bento de Carvalho, J. B. Barbosa, et P. Teixeira, « Assessing Antimicrobial Efficacy on Plastics and Other Non-Porous Surfaces: A Closer Look at Studies Using the ISO 22196:2011 Standard », *Biology*, vol. 13, n° 1, Art. n° 1, janv. 2024, doi: 10.3390/biology13010059.
- [203] 14:00-17:00, « ISO 7581:2023 », ISO. Consulté le: 16 août 2024. [En ligne]. Disponible sur: <https://www.iso.org/standard/83386.html>
- [204] « Hygicult TPC | LifeSign ». Consulté le: 5 septembre 2024. [En ligne]. Disponible sur: <https://www.lifesignedmed.com/product-catalog/hygiene/hygicult-tpc-0>
- [205] 14:00-17:00, « ISO 22196:2011 », ISO. Consulté le: 18 mars 2024. [En ligne]. Disponible sur: <https://www.iso.org/fr/standard/54431.html>
- [206] H. Kawakami, K. Yoshida, Y. Nishida, Y. Kikuchi, et Y. Sato, « Antibacterial Properties of Metallic Elements for Alloying Evaluated with Application of JIS Z 2801:2000 », *ISIJ International*, vol. 48, n° 9, p. 1299-1304, 2008, doi: 10.2355/isijinternational.48.1299.
- [207] D. Toplitsch *et al.*, « Antimicrobial Activity of a Novel Cu(NO₃)₂-Containing Sol-Gel Surface under Different Testing Conditions », *Materials*, vol. 14, n° 21, Art. n° 21, janv. 2021, doi: 10.3390/ma14216488.
- [208] G. Bozzuto *et al.*, « Label-free cell based impedance measurements of ZnO nanoparticles—human lung cell interaction: a comparison with MTT, NR, Trypan blue and cloning efficiency assays », *J Nanobiotechnol*, vol. 19, n° 1, p. 306, oct. 2021, doi: 10.1186/s12951-021-01033-w.
- [209] A. Šarić, I. Despotović, et G. Štefanić, « Alcoholic Solvent Influence on ZnO Synthesis: A Joint Experimental and Theoretical Study », *J. Phys. Chem. C*, vol. 123, n° 48, p. 29394-29407, déc. 2019, doi: 10.1021/acs.jpcc.9b07411.
- [210] D. K. Sharma, S. Shukla, K. K. Sharma, et V. Kumar, « A review on ZnO: Fundamental properties and applications », *Materials Today: Proceedings*, vol. 49, p. 3028-3035, janv. 2022, doi: 10.1016/j.matpr.2020.10.238.

- [211] M. Bilal *et al.*, « Effects of Solvent on the Structure and Properties of Titanium Dioxide Nanoparticles and Their Antibacterial Activity », *Iranian Journal of Chemistry & Chemical Engineering*, vol. 38, n° 4, p. 261-272, août 2019.
- [212] J. Ungula et B. F. Dejene, « Effect of solvent medium on the structural, morphological and optical properties of ZnO nanoparticles synthesized by the sol–gel method », *Physica B: Condensed Matter*, vol. 480, p. 26-30, janv. 2016, doi: 10.1016/j.physb.2015.10.007.
- [213] M. Niederberger, « Nonaqueous Sol–Gel Routes to Metal Oxide Nanoparticles », *Acc. Chem. Res.*, vol. 40, n° 9, p. 793-800, sept. 2007, doi: 10.1021/ar600035e.
- [214] R. A. McBride, J. M. Kelly, et D. E. McCormack, « Growth of well-defined ZnO microparticles by hydroxide ion hydrolysis of zinc salts », *Journal of Materials Chemistry*, vol. 13, n° 5, p. 1196-1201, 2003, doi: 10.1039/B211723C.
- [215] M. Bahar, M. Mozaffari, et S. Esmaeili, « Effect of different alcohols, gelatinizing times, calcination and microwave on characteristics of TiO₂ nanoparticles synthesized by sol–gel method », *J Theor Appl Phys*, vol. 11, n° 1, p. 79-86, mars 2017, doi: 10.1007/s40094-017-0240-5.
- [216] A. Ejaz, J. H. Han, et R. Dahiya, « Influence of solvent molecular geometry on the growth of nanostructures », *Journal of Colloid and Interface Science*, vol. 570, p. 322-331, juin 2020, doi: 10.1016/j.jcis.2020.02.117.
- [217] S. El-Nahas, M. S. A. El-sadek, H. M. Salman, et M. M. Elkady, « Controlled morphological and physical properties of ZnO nanostructures synthesized by domestic microwave route », *Materials Chemistry and Physics*, vol. 258, p. 123885, janv. 2021, doi: 10.1016/j.matchemphys.2020.123885.
- [218] B. Ludi et M. Niederberger, « Zinc oxide nanoparticles: chemical mechanisms and classical and non-classical crystallization », *Dalton Trans.*, vol. 42, n° 35, p. 12554-12568, août 2013, doi: 10.1039/C3DT50610J.
- [219] E. Y. Shaba, J. O. Jacob, J. O. Tijani, et M. A. T. Suleiman, « A critical review of synthesis parameters affecting the properties of zinc oxide nanoparticle and its application in wastewater treatment », *Appl Water Sci*, vol. 11, n° 2, p. 48, févr. 2021, doi: 10.1007/s13201-021-01370-z.
- [220] S. Ammar et F. Fiévet, « Polyol Synthesis: A Versatile Wet-Chemistry Route for the Design and Production of Functional Inorganic Nanoparticles », *Nanomaterials*, vol. 10, n° 6, Art. n° 6, juin 2020, doi: 10.3390/nano10061217.

- [221] S. Dagher, A. I. Ayesh, N. Tit, et Y. Haik, « Influence of reactant concentration on optical properties of ZnO nanoparticles », *Materials Technology*, vol. 29, n° 2, p. 76-82, mars 2014, doi: 10.1179/1753555713Y.0000000100.
- [222] K. Vojisavljević, M. Šćepanović, T. Srećković, M. Grujić-Brojčin, Z. Branković, et G. Branković, « Structural characterization of mechanically milled ZnO: influence of zirconia milling media », *J. Phys.: Condens. Matter*, vol. 20, n° 47, p. 475202, nov. 2008, doi: 10.1088/0953-8984/20/47/475202.
- [223] K. Khun, Z. Ibupoto, M. AlSalhi, M. Atif, A. Ansari, et M. Willander, « Fabrication of Well-Aligned ZnO Nanorods Using a Composite Seed Layer of ZnO Nanoparticles and Chitosan Polymer », *Materials*, vol. 6, n° 10, p. 4361-4374, sept. 2013, doi: 10.3390/ma6104361.
- [224] A. Sharma, B. P. Singh, S. Dhar, A. Gondorf, et M. Spasova, « Effect of surface groups on the luminescence property of ZnO nanoparticles synthesized by sol-gel route », *Surface Science*, vol. 606, n° 3-4, p. L13-L17, févr. 2012, doi: 10.1016/j.susc.2011.09.006.
- [225] A. C. Janaki, E. Sailatha, et S. Gunasekaran, « Synthesis, characteristics and antimicrobial activity of ZnO nanoparticles », *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, vol. 144, p. 17-22, juin 2015, doi: 10.1016/j.saa.2015.02.041.
- [226] A. Sahai et N. Goswami, « Structural and vibrational properties of ZnO nanoparticles synthesized by the chemical precipitation method », *Physica E: Low-dimensional Systems and Nanostructures*, vol. 58, p. 130-137, avr. 2014, doi: 10.1016/j.physe.2013.12.009.
- [227] P. K. Labhane, V. R. Huse, L. B. Patle, A. L. Chaudhari, et G. H. Sonawane, « Synthesis of Cu Doped ZnO Nanoparticles: Crystallographic, Optical, FTIR, Morphological and Photocatalytic Study », *Journal of Materials Science and Chemical Engineering*, vol. 3, n° 7, Art. n° 7, juin 2015, doi: 10.4236/msce.2015.37005.
- [228] J. Sarkar, M. Ghosh, A. Mukherjee, D. Chattopadhyay, et K. Acharya, « Biosynthesis and safety evaluation of ZnO nanoparticles », *Bioprocess Biosyst Eng*, vol. 37, n° 2, p. 165-171, févr. 2014, doi: 10.1007/s00449-013-0982-7.
- [229] X. Li, F. He, et J. Ye, « Preparation, characterization and in vitro cell performance of anti-washout calcium phosphate cement modified by sodium polyacrylate », *RSC Advances*, vol. 7, n° 52, p. 32842-32849, 2017, doi: 10.1039/C7RA03221H.
- [230] B. Lallo da Silva, B. L. Caetano, B. G. Chiari-Andréo, R. C. L. R. Pietro, et L. A. Chiavacci, « Increased antibacterial activity of ZnO nanoparticles: Influence of size and surface modification », *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, vol. 177, p. 440-447, mai 2019, doi: 10.1016/j.colsurfb.2019.02.013.

- [231] K. R. Raghupathi, R. T. Koodali, et A. C. Manna, « Size-Dependent Bacterial Growth Inhibition and Mechanism of Antibacterial Activity of Zinc Oxide Nanoparticles », *Langmuir*, vol. 27, n° 7, p. 4020-4028, avr. 2011, doi: 10.1021/la104825u.
- [232] L. Palanikumar, S. N. Ramasamy, et C. Balachandran, « Size-dependent antimicrobial response of zinc oxide nanoparticles », *IET Nanobiotechnol*, vol. 8, n° 2, p. 111-117, juin 2014, doi: 10.1049/iet-nbt.2012.0008.
- [233] A. Azam, A. S. Ahmed, M. Oves, M. Khan, et A. Memic, « Size-dependent antimicrobial properties of CuO nanoparticles against Gram-positive and -negative bacterial strains », *International Journal of Nanomedicine*, vol. 7, p. 3527-3535, juill. 2012, doi: 10.2147/IJN.S29020.
- [234] N. Jones, B. Ray, K. T. Ranjit, et A. C. Manna, « Antibacterial activity of ZnO nanoparticle suspensions on a broad spectrum of microorganisms », *FEMS Microbiology Letters*, vol. 279, n° 1, p. 71-76, févr. 2008, doi: 10.1111/j.1574-6968.2007.01012.x.
- [235] B. Lallo da Silva *et al.*, « Relationship Between Structure And Antimicrobial Activity Of Zinc Oxide Nanoparticles: An Overview », *International Journal of Nanomedicine*, vol. 14, p. 9395-9410, déc. 2019, doi: 10.2147/IJN.S216204.
- [236] G. Applerot *et al.*, « Enhanced Antibacterial Activity of Nanocrystalline ZnO Due to Increased ROS-Mediated Cell Injury », *Advanced Functional Materials*, vol. 19, n° 6, p. 842-852, 2009, doi: 10.1002/adfm.200801081.
- [237] R. Álvarez-Chimal *et al.*, « Influence of the particle size on the antibacterial activity of green synthesized zinc oxide nanoparticles using *Dysphania ambrosioides* extract, supported by molecular docking analysis », *Arabian Journal of Chemistry*, vol. 15, n° 6, p. 103804, juin 2022, doi: 10.1016/j.arabjc.2022.103804.
- [238] S. Sharma, K. Kumar, N. Thakur, S. Chauhan, et M. Chauhan, « The effect of shape and size of ZnO nanoparticles on their antimicrobial and photocatalytic activities: a green approach », *Bulletin of Materials Science*, vol. 43, déc. 2020, doi: 10.1007/s12034-019-1986-y.
- [239] K. S. Aldin, S. Al-Hariri, et A. Ali-Nizam, « Effectiveness of ZnO Nano Particles against the Foodborne Microbial Pathogens E. coli and S. aureus », *Jordan Journal of Chemistry (JJC)*, vol. 15, n° 2, Art. n° 2, août 2020, doi: 10.47014/15.2.4.
- [240] R. Grossich, M. Lemos Vilches, C. S. Costa, et M. Pezzoni, « Role of Pel and Psl polysaccharides in the response of *Pseudomonas aeruginosa* to environmental challenges: oxidative stress agents (UVA, H₂O₂, sodium hypochlorite) and its competitor

- Staphylococcus aureus », *Microbiology*, vol. 169, n° 2, p. 001301, 2023, doi: 10.1099/mic.0.001301.
- [241] Z. Pang, R. Raudonis, B. R. Glick, T.-J. Lin, et Z. Cheng, « Antibiotic resistance in *Pseudomonas aeruginosa*: mechanisms and alternative therapeutic strategies », *Biotechnology Advances*, vol. 37, n° 1, p. 177-192, janv. 2019, doi: 10.1016/j.biotechadv.2018.11.013.
- [242] M. Rohde, « The Gram-Positive Bacterial Cell Wall », *Microbiology Spectrum*, vol. 7, n° 3, p. 10.1128/microbiolspec.gpp3-0044-2018, mai 2019, doi: 10.1128/microbiolspec.gpp3-0044-2018.
- [243] N. Babayevska *et al.*, « ZnO size and shape effect on antibacterial activity and cytotoxicity profile », *Sci Rep*, vol. 12, n° 1, p. 8148, mai 2022, doi: 10.1038/s41598-022-12134-3.
- [244] D. E. Navarro-López *et al.*, « Effective antimicrobial activity of ZnO and Yb-doped ZnO nanoparticles against *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli* », *Materials Science and Engineering: C*, vol. 123, p. 112004, avr. 2021, doi: 10.1016/j.msec.2021.112004.
- [245] S. Baek, S. H. Joo, N. Kumar, et M. Toborek, « Antibacterial effect and toxicity pathways of industrial and sunscreen ZnO nanoparticles on *Escherichia coli* », *Journal of Environmental Chemical Engineering*, vol. 5, n° 3, p. 3024-3032, juin 2017, doi: 10.1016/j.jece.2017.06.009.
- [246] F. Mirhosseini, M. Amiri, A. Daneshkazemi, H. Zandi, et Z. S. Javadi, « Antimicrobial Effect of Different Sizes of Nano Zinc Oxide on Oral Microorganisms », *Front Dent*, vol. 16, n° 2, p. 105-112, 2019, doi: 10.18502/fid.v16i2.1361.
- [247] A. Raghunath et E. Perumal, « Metal oxide nanoparticles as antimicrobial agents: a promise for the future », *International Journal of Antimicrobial Agents*, vol. 49, n° 2, p. 137-152, févr. 2017, doi: 10.1016/j.ijantimicag.2016.11.011.
- [248] R. Pachaiappan, S. Rajendran, P. L. Show, K. Manavalan, et Mu. Naushad, « Metal/metal oxide nanocomposites for bactericidal effect: A review », *Chemosphere*, vol. 272, p. 128607, juin 2021, doi: 10.1016/j.chemosphere.2020.128607.
- [249] V. Tiwari, N. Mishra, K. Gadani, P. S. Solanki, N. A. Shah, et M. Tiwari, « Mechanism of Anti-bacterial Activity of Zinc Oxide Nanoparticle Against Carbapenem-Resistant *Acinetobacter baumannii* », *Front. Microbiol.*, vol. 9, juin 2018, doi: 10.3389/fmicb.2018.01218.

- [250] R. Krishnamoorthy *et al.*, « Antibacterial Mechanisms of Zinc Oxide Nanoparticle against Bacterial Food Pathogens Resistant to Beta-Lactam Antibiotics », *Molecules*, vol. 27, n° 8, p. 2489, avr. 2022, doi: 10.3390/molecules27082489.
- [251] S. Thakur et S. Neogi, « Effect of doped ZnO nanoparticles on bacterial cell morphology and biochemical composition », *Appl Nanosci*, vol. 11, n° 1, p. 159-171, janv. 2021, doi: 10.1007/s13204-020-01592-8.
- [252] R. Garcia-Rubio, H. C. de Oliveira, J. Rivera, et N. Trevijano-Contador, « The Fungal Cell Wall: Candida, Cryptococcus, and Aspergillus Species », *Front. Microbiol.*, vol. 10, janv. 2020, doi: 10.3389/fmicb.2019.02993.
- [253] C. Ibe et C. A. Munro, « Fungal cell wall: An underexploited target for antifungal therapies », *PLOS Pathogens*, vol. 17, n° 4, p. e1009470, avr. 2021, doi: 10.1371/journal.ppat.1009470.
- [254] F. Mohammad, I. B. Bwatanglang, H. A. Al-Lohedan, J. P. Shaik, H. H. Al-Tilasi, et A. A. Soleiman, « Influence of Surface Coating towards the Controlled Toxicity of ZnO Nanoparticles In Vitro », *Coatings*, vol. 13, n° 1, Art. n° 1, janv. 2023, doi: 10.3390/coatings13010172.
- [255] B. Naiel, M. Fawzy, A. E. D. Mahmoud, et M. W. A. Halmy, « Sustainable fabrication of dimorphic plant derived ZnO nanoparticles and exploration of their biomedical and environmental potentialities », *Sci Rep*, vol. 14, n° 1, p. 13459, juin 2024, doi: 10.1038/s41598-024-63459-0.
- [256] K. Meyer, P. Rajanahalli, M. Ahamed, J. J. Rowe, et Y. Hong, « ZnO nanoparticles induce apoptosis in human dermal fibroblasts via p53 and p38 pathways », *Toxicology in Vitro*, vol. 25, n° 8, p. 1721-1726, déc. 2011, doi: 10.1016/j.tiv.2011.08.011.
- [257] M. Ramasamy, M. Das, S. S. A. An, et D. K. Yi, « Role of surface modification in zinc oxide nanoparticles and its toxicity assessment toward human dermal fibroblast cells », *International Journal of Nanomedicine*, vol. 9, p. 3707-3718, août 2014, doi: 10.2147/IJN.S65086.
- [258] V. Sharma, R. K. Shukla, N. Saxena, D. Parmar, M. Das, et A. Dhawan, « DNA damaging potential of zinc oxide nanoparticles in human epidermal cells », *Toxicology Letters*, vol. 185, n° 3, p. 211-218, mars 2009, doi: 10.1016/j.toxlet.2009.01.008.
- [259] F. Dechsakulthorn, A. Hayes, S. Bakand, L. Joeng, et C. Winder, « In vitro cytotoxicity assessment of selected nanoparticles using human skin fibroblasts », *AATEX*, vol. 14, nov. 2006.

- [260] V. Nagar *et al.*, « ZnO Nanoparticles: Exposure, toxicity mechanism and assessment », *Materials Today: Proceedings*, vol. 69, p. 56-63, janv. 2022, doi: 10.1016/j.matpr.2022.09.001.
- [261] J. Du *et al.*, « ZnO nanoparticles: recent advances in ecotoxicity and risk assessment », *Drug and Chemical Toxicology*, vol. 43, n° 3, p. 322-333, mai 2020, doi: 10.1080/01480545.2018.1508218.
- [262] V. Rajput *et al.*, « ZnO and CuO nanoparticles: a threat to soil organisms, plants, and human health », *Environ Geochem Health*, vol. 42, n° 1, p. 147-158, janv. 2020, doi: 10.1007/s10653-019-00317-3.
- [263] H. Falfushynska, I. Sokolova, et R. Stoika, « Uptake, Biodistribution, and Mechanisms of Toxicity of Metal-Containing Nanoparticles in Aquatic Invertebrates and Vertebrates », p. 227-263, 2022, doi: 10.1007/978-3-030-76235-3_9.
- [264] L. Znaidi, « Sol-gel-deposited ZnO thin films: A review », *Materials Science and Engineering: B*, vol. 174, n° 1, p. 18-30, oct. 2010, doi: 10.1016/j.mseb.2010.07.001.
- [265] K. L. Foo, M. Kashif, U. Hashim, et W.-W. Liu, « Effect of different solvents on the structural and optical properties of zinc oxide thin films for optoelectronic applications », *Ceramics International*, vol. 40, n° 1, Part A, p. 753-761, janv. 2014, doi: 10.1016/j.ceramint.2013.06.065.
- [266] L. Znaidi, G. J. A. A. S. Illia, R. L. Guennic, C. Sanchez, et A. Kanaev, « Elaboration of ZnO Thin Films with Preferential Orientation by a Soft Chemistry Route », *Journal of Sol-Gel Science and Technology*, vol. 26, n° 1, p. 817-821, janv. 2003, doi: 10.1023/A:1020795515478.
- [267] R. Amari, A. Mahroug, A. Boukhari, B. Deghfel, et N. Selmi, « Structural, Optical and Luminescence Properties of ZnO Thin Films Prepared by Sol-Gel Spin-Coating Method: Effect of Precursor Concentration », *Chinese Phys. Lett.*, vol. 35, n° 1, p. 016801, janv. 2018, doi: 10.1088/0256-307X/35/1/016801.
- [268] Z. Y. Alami, M. Salem, et M. Gaidi, « Effect of Zn Concentration On Structural and Optical Proprieties Of ZNO Thin Films Deposited By Spray Pyrolysis. », *Advanced Energy: An International Journal*, vol. 2, p. 11-24, oct. 2015, doi: 10.5121/aeij.2015.2402.
- [269] M. Saleem *et al.*, « Effect of zinc acetate concentration on the structural and optical properties of ZnO thin films deposited by Sol-Gel method », *Int. J. Phys. Sci.*, vol. 7, janv. 2012.
- [270] M. Baneto, A. Enesca, Y. Lare, K. Jondo, K. Napo, et A. Duta, « Effect of precursor concentration on structural, morphological and opto-electric properties of ZnO thin films

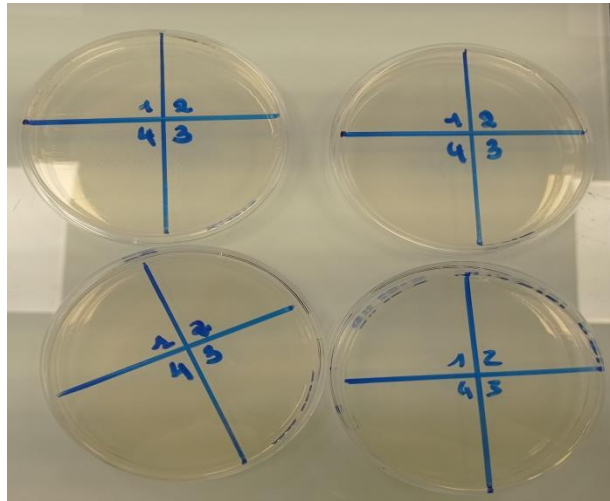
- prepared by spray pyrolysis », *Ceramics International*, vol. 40, n° 6, p. 8397-8404, juill. 2014, doi: 10.1016/j.ceramint.2014.01.048.
- [271] T. Ma, « Effect of precursor concentration and sintering on functional properties of ZnO thin films deposited by aerosol-assisted chemical vapour deposition (AACVD) », *Materials Science in Semiconductor Processing*, vol. 121, p. 105413, janv. 2021, doi: 10.1016/j.mssp.2020.105413.
- [272] L. Znaidi *et al.*, « AZO Thin Films by Sol-Gel Process for Integrated Optics », *Coatings*, vol. 3, p. 126-139, sept. 2013, doi: 10.3390/coatings3030126.
- [273] S. Murugesan *et al.*, « Effect of Precursor Concentration on Structural, Morphological, and Optical Properties of ZnO Thin-Filmed Sensor for Ethanol Detection », *IEEE Transactions on Nanotechnology*, vol. 17, n° 1, p. 169-176, janv. 2018, doi: 10.1109/TNANO.2017.2783931.
- [274] R. Amari, A. Mahroug, A. Boukhari, B. Deghfel, et N. Selmi, « Structural, Optical and Luminescence Properties of ZnO Thin Films Prepared by Sol-Gel Spin-Coating Method: Effect of Precursor Concentration », *Chinese Phys. Lett.*, vol. 35, n° 1, p. 016801, janv. 2018, doi: 10.1088/0256-307X/35/1/016801.
- [275] L. Znaidi *et al.*, « Textured ZnO thin films by sol-gel process: Synthesis and characterizations », *Thin Solid Films*, vol. 617, p. 156-160, oct. 2016, doi: 10.1016/j.tsf.2015.12.031.
- [276] D. Aryanto *et al.*, « Preparation and structural characterization of ZnO thin films by sol-gel method », *J. Phys.: Conf. Ser.*, vol. 817, n° 1, p. 012025, mars 2017, doi: 10.1088/1742-6596/817/1/012025.
- [277] I. Y. Bouderbala, A. Guessoum, S. Rabhi, O. Bouhlassa, et I.-E. Bouras, « Optical band-diagram, Urbach energy tails associated with photoluminescence emission in defected ZnO thin films deposited by sol-gel process dip-coating: effect of precursor concentration », *Appl. Phys. A*, vol. 130, n° 3, p. 205, févr. 2024, doi: 10.1007/s00339-024-07366-1.
- [278] K. Arun Kumar, S. Valanarasu, K. Adaikalam, V. Ganesh, M. Shkir, et S. Alfaify, « Effect of solvents on sol-gel spin-coated nanostructured Al-doped ZnO thin films: a film for key optoelectronic applications », *Applied Physics A*, vol. 123, p. 801, nov. 2017, doi: 10.1007/s00339-017-1426-z.
- [279] Y. Liao, X. Zhou, X. Xie, et Q. Yu, « The effects of solvents on the highly oriented ZnO films prepared using sol-gel method », *J Mater Sci: Mater Electron*, vol. 24, n° 11, p. 4427-4432, nov. 2013, doi: 10.1007/s10854-013-1420-y.

- [280] K. L. Foo, M. Kashif, U. Hashim, et W.-W. Liu, « Effect of different solvents on the structural and optical properties of zinc oxide thin films for optoelectronic applications », *Ceramics International*, vol. 40, n° 1, Part A, p. 753-761, janv. 2014, doi: 10.1016/j.ceramint.2013.06.065.
- [281] Z. Y. Alami, M. Salem, et M. Gaidi, « Effect of Zn Concentration On Structural and Optical Proprieties Of ZNO Thin Films Deposited By Spray Pyrolysis. », *Advanced Energy: An International Journal*, vol. 2, p. 11-24, oct. 2015, doi: 10.5121/aeij.2015.2402.
- [282] A. Kompa, B. Lalitha Devi, et U. Chaitra, « Determination of optical constants of vacuum annealed ZnO thin films using Wemple Di Domenico model, Sellmier's model and Miller's generalized rules », *Materials Chemistry and Physics*, vol. 299, p. 127507, avr. 2023, doi: 10.1016/j.matchemphys.2023.127507.
- [283] S. Sebastian, C. Raj, S. S. K. Jacob, P. Diana, et V. Ganesh, « Effect of different solvents on ZnO thin films for gas sensing application by nebulizer spray pyrolysis method », *Appl. Phys. A*, vol. 130, n° 9, p. 615, août 2024, doi: 10.1007/s00339-024-07759-2.
- [284] L. Zheng et K. Ogino, « Solution-Processed Zno Quantum Dot Thin Films with Low Solvent Residues and Ultra-Flat Surfaces », 21 juin 2024, *Rochester, NY*: 4872532. doi: 10.2139/ssrn.4872532.
- [285] J. K.-M. Knobloch *et al.*, « “Life-like” assessment of antimicrobial surfaces by a new touch transfer assay displays strong superiority of a copper alloy compared to silver containing surfaces », *PLoS ONE*, vol. 12, n° 11, p. e0187442, nov. 2017, doi: 10.1371/journal.pone.0187442.
- [286] M. N. Murthy, V. Ganesh, G. Ravinder, S. Anusha, G. Chandrakala, et C. J. Sreelatha, « Sol-gel synthesized ZnO thin films doped with Rb and Al for self-cleaning antibacterial applications », *J Sol-Gel Sci Technol*, vol. 105, n° 3, p. 683-693, mars 2023, doi: 10.1007/s10971-023-06044-7.
- [287] D. Ali *et al.*, « Synthesis, characterization and antibacterial performance of transparent c-axis oriented Al doped ZnO thin films », *Surfaces and Interfaces*, vol. 27, p. 101452, déc. 2021, doi: 10.1016/j.surfin.2021.101452.
- [288] P. Kumar *et al.*, « Synergistic effect of Mg and Se co-doping on the structural, optical and anti-bacterial activity of ZnO thin films », *Inorganic Chemistry Communications*, vol. 131, p. 108801, sept. 2021, doi: 10.1016/j.inoche.2021.108801.
- [289] P. Carvalho *et al.*, « Influence of thickness and coatings morphology in the antimicrobial performance of zinc oxide coatings », *Applied Surface Science*, vol. 307, p. 548-557, juill. 2014, doi: 10.1016/j.apsusc.2014.04.072.

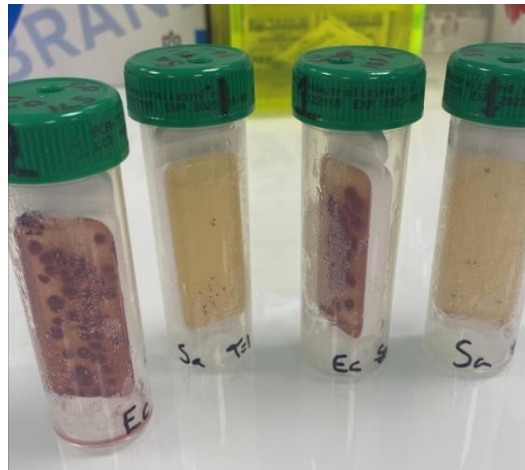
- [290] B. Sahoo, U. Subudhi, S. K. Pradhan, et D. Behera, « Probing the effect of stoichiometry on structural, optical and bacterial growth inhibition properties of ZnO thin films against *E. coli* », *Nano-Structures & Nano-Objects*, vol. 38, p. 101124, mai 2024, doi: 10.1016/j.nanoso.2024.101124.
- [291] R. Rajakumaran, M. Kumar, et R. Chetty, « Morphological effect of ZnO nanostructures on desalination performance and antibacterial activity of thin-film nanocomposite (TFN) membrane », *Desalination*, vol. 495, p. 114673, déc. 2020, doi: 10.1016/j.desal.2020.114673.
- [292] J. Butler, R. D. Handy, M. Upton, et A. Besinis, « Review of Antimicrobial Nanocoatings in Medicine and Dentistry: Mechanisms of Action, Biocompatibility Performance, Safety, and Benefits Compared to Antibiotics », *ACS Nano*, vol. 17, n° 8, p. 7064-7092, avr. 2023, doi: 10.1021/acsnano.2c12488.
- [293] C. Horachit, A. Intaniwet, S. Choopun, et P. Ruankham, « Low-temperature-processed ZnO thin films as electron transporting layer to achieve stable perovskite solar cells », *Opt Quant Electron*, vol. 50, n° 10, p. 379, oct. 2018, doi: 10.1007/s11082-018-1652-4.
- [294] D. Aryanto *et al.*, « Characteristics and photocatalytic activity of highly c-axis-oriented ZnO thin films », *J Sol-Gel Sci Technol*, vol. 96, n° 1, p. 226-235, oct. 2020, doi: 10.1007/s10971-020-05361-5.
- [295] M. F. Malek *et al.*, « Sonicated sol–gel preparation of nanoparticulate ZnO thin films with various deposition speeds: The highly preferred c-axis (0 0 2) orientation enhances the final properties », *Journal of Alloys and Compounds*, vol. 582, p. 12-21, janv. 2014, doi: 10.1016/j.jallcom.2013.07.202.
- [296] K. Yang *et al.*, « Bacterial anti-adhesion surface design: Surface patterning, roughness and wettability: A review », *Journal of Materials Science & Technology*, vol. 99, p. 82-100, févr. 2022, doi: 10.1016/j.jmst.2021.05.028.
- [297] P. Parreira *et al.*, « Effect of surface chemistry on bacterial adhesion, viability, and morphology », *Journal of Biomedical Materials Research Part A*, vol. 99A, n° 3, p. 344-353, 2011, doi: 10.1002/jbm.a.33178.
- [298] J. K. Oh *et al.*, « The influence of surface chemistry on the kinetics and thermodynamics of bacterial adhesion », *Sci Rep*, vol. 8, n° 1, p. 17247, nov. 2018, doi: 10.1038/s41598-018-35343-1.
- [299] D. Perera-Costa, J. M. Bruque, M. L. González-Martín, A. C. Gómez-García, et V. Vadillo-Rodríguez, « Studying the Influence of Surface Topography on Bacterial

- Adhesion using Spatially Organized Microtopographic Surface Patterns », *Langmuir*, vol. 30, n° 16, p. 4633-4641, avr. 2014, doi: 10.1021/la5001057.
- [300] K. Bohinc *et al.*, « Metal surface characteristics dictate bacterial adhesion capacity », *International Journal of Adhesion and Adhesives*, vol. 68, p. 39-46, juill. 2016, doi: 10.1016/j.ijadhadh.2016.01.008.
- [301] M. Mu *et al.*, « Influence of Surface Roughness, Nanostructure, and Wetting on Bacterial Adhesion », *Langmuir*, vol. 39, n° 15, p. 5426-5439, avr. 2023, doi: 10.1021/acs.langmuir.3c00091.
- [302] I. Yoda *et al.*, « Effect of surface roughness of biomaterials on Staphylococcus epidermidis adhesion », *BMC Microbiology*, vol. 14, n° 1, p. 234, sept. 2014, doi: 10.1186/s12866-014-0234-2.
- [303] L. C. de M. Dantas, J. P. da Silva-Neto, T. S. Dantas, L. Z. Naves, F. D. das Neves, et A. S. da Mota, « Bacterial Adhesion and Surface Roughness for Different Clinical Techniques for Acrylic Polymethyl Methacrylate », *International Journal of Dentistry*, vol. 2016, n° 1, p. 8685796, 2016, doi: 10.1155/2016/8685796.
- [304] Y. Yuan, M. P. Hays, P. R. Hardwidge, et J. Kim, « Surface characteristics influencing bacterial adhesion to polymeric substrates », *RSC Advances*, vol. 7, n° 23, p. 14254-14261, 2017, doi: 10.1039/C7RA01571B.
- [305] B. Li et B. E. Logan, « Bacterial adhesion to glass and metal-oxide surfaces », *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, vol. 36, n° 2, p. 81-90, juill. 2004, doi: 10.1016/j.colsurfb.2004.05.006.
- [306] K. Bohinc *et al.*, « Available surface dictates microbial adhesion capacity », *International Journal of Adhesion and Adhesives*, vol. 50, p. 265-272, avr. 2014, doi: 10.1016/j.ijadhadh.2014.01.027.

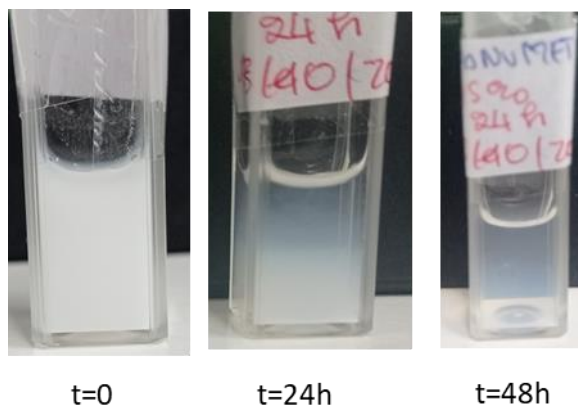
ANNEXES



Annexe 1 : Pureté des nanoparticules.



Annexe 2 : Caractéristiques des lames gélosées : Screening des microorganismes présents sur des surfaces à l'aide de lames gélosées contenant un neutralisant.

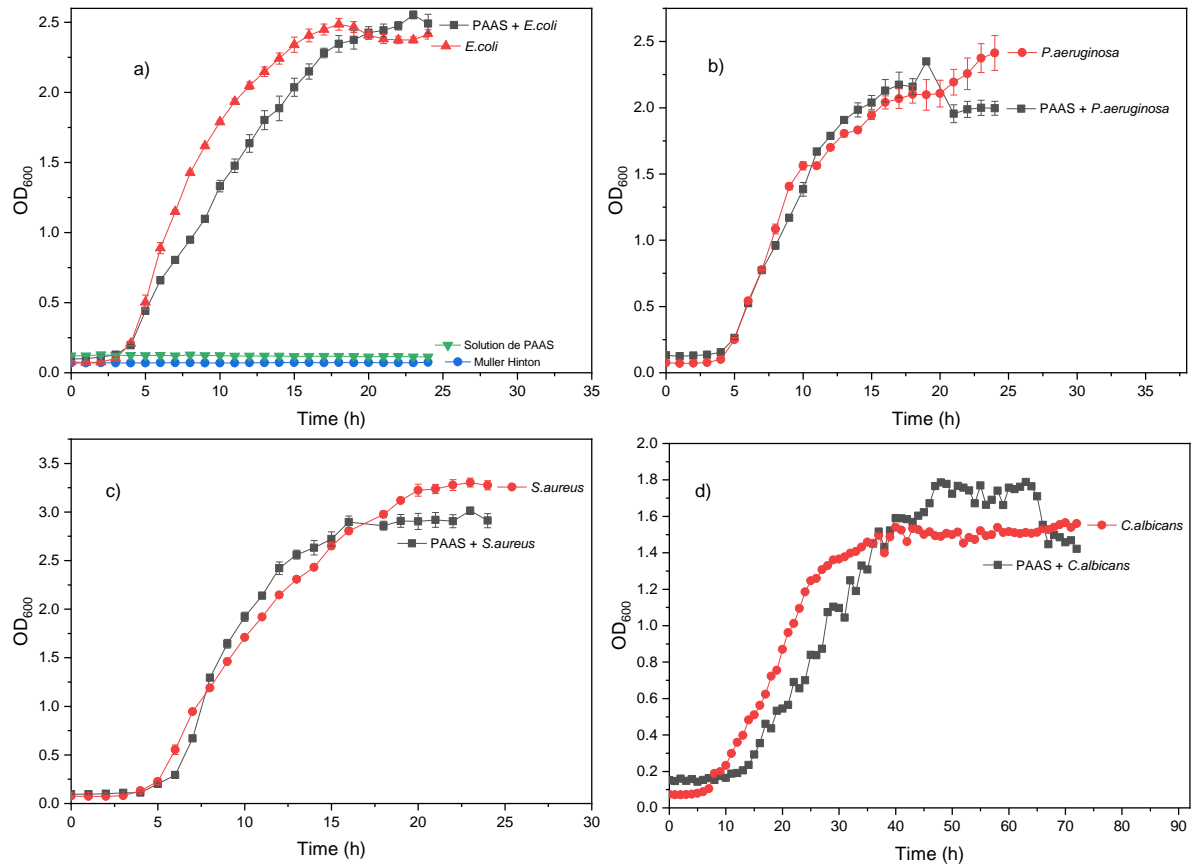


t=0

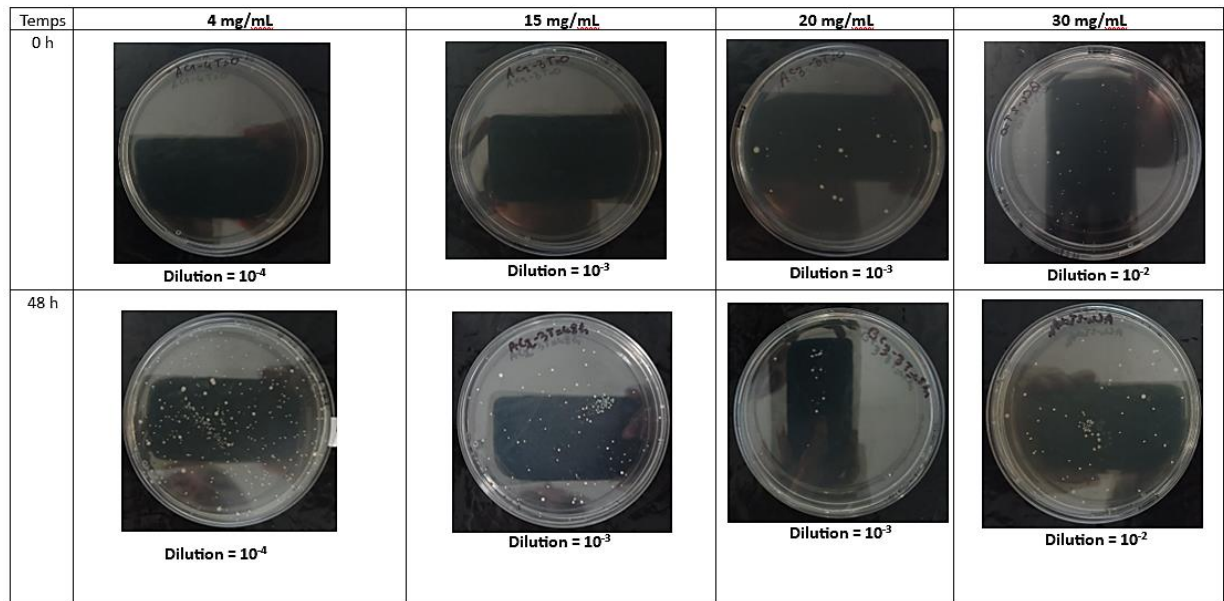
t=24h

t=48h

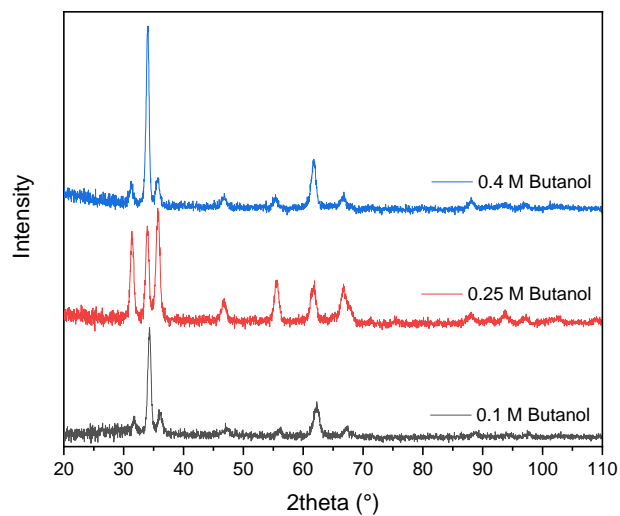
Annexe 3 : Stabilité des suspensions de nanoparticules de ZnO de 22 nm dispersées à l'aide du dodécyle sulfate de sodium (SDS).



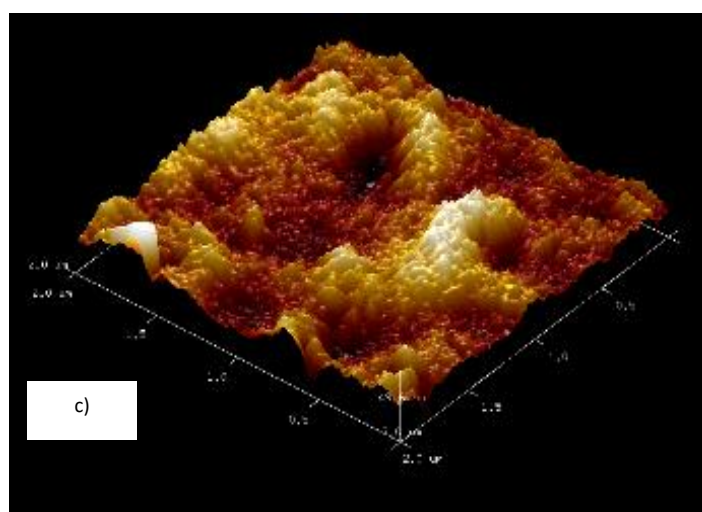
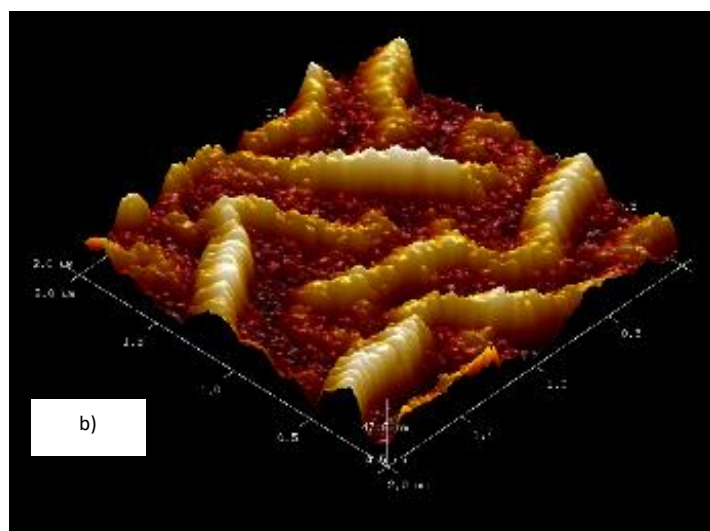
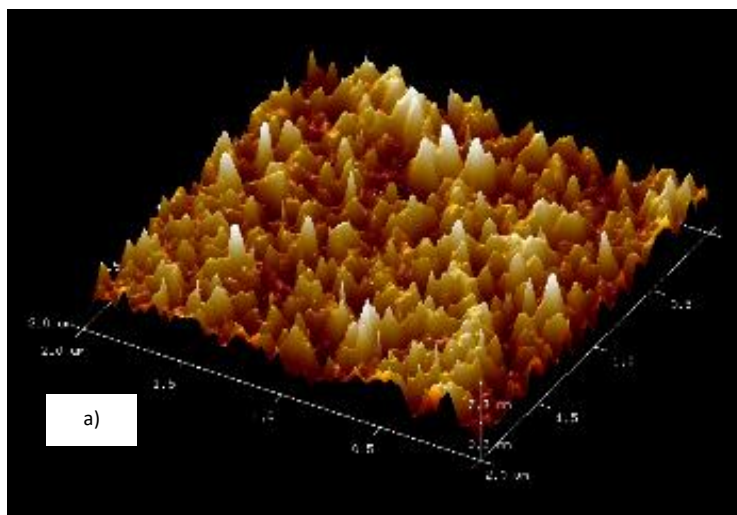
Annexe 4 : Validation des témoins sur : a) *E. coli* ; b) *P. aeruginosa* ; c) *S. aureus* et d) *C. albicans*.



Annexe 5 : Colonies de *Candida albicans* en présence des différentes concentrations en NPs de ZnO de 22 nm avant (0 h) et après 48 h d'incubation à 30°C dans le FLUOstar.



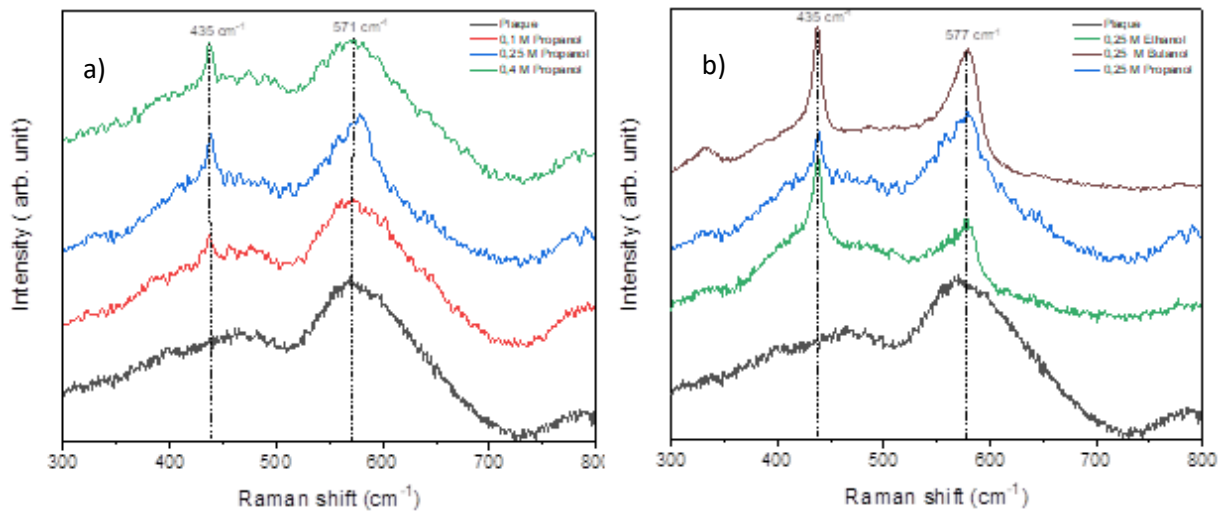
Annexe 6 : Diffraction des rayons X de couches minces de ZnO élaborées à partir du butanol avec différentes concentrations en précurseur.



Annexe 7 : Image AFM : a) 0,1 M Butanol; b) 0,25 M Butanol et c) 0,4 M Butanol.

Annexe 8: Effet de la concentration du précurseur de zinc sur la rugosité des films de ZnO préparés dans l'éthanol.

Concentrations	R_a (nm)	R_q (nm)	R_{max} (nm)
0,1 M	1,60	2,02	19,2
0,25 M	14,3	17,4	96,8
0,4 M	10,4	13,4	141



Annexe 9 : Spectres Raman de films minces de ZnO : a) Effet de la concentration en précurseur sur les films préparés à partir du propanol et b) Effet du type de solvant.

Résumé :

Cette thèse examine l'utilisation des nanoparticules d'oxyde de zinc (ZnO) comme agents antimicrobiens pour lutter contre les infections nosocomiales, un enjeu majeur de santé publique. Elle s'inscrit dans le cadre de la recherche de solutions alternatives aux antibiotiques, visant à limiter la propagation des microorganismes pathogènes. Les travaux s'articulent autour de la synthèse contrôlée des nanoparticules de ZnO par la méthode sol-gel, de leur caractérisation physico-chimique et de l'optimisation de leurs activités antimicrobiennes.

L'activité antimicrobienne des nanoparticules a été évaluée contre souches de la pharmacopée européenne: *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* et *Staphylococcus aureus*, ainsi que contre le champignon *Candida albicans*. Un procédé de contrôle de la taille des nanoparticules a été mis au point, suivi d'une caractérisation de leur taille, microstructure et morphologie. L'impact de la taille des nanoparticules sur leur efficacité antimicrobienne a été étudié en déterminant les concentrations minimales inhibitrices (CMI) et bactéricides (CMB). L'analyse a ensuite été approfondie en mesurant la cinétique de croissance des microorganismes en présence de nanoparticules de différentes tailles. Les résultats ont mis en évidence que la diminution de leur taille améliorait leur activité antimicrobienne.

La recherche a également porté sur l'amélioration de l'activité antimicrobienne des films minces de ZnO et l'application des nanoparticules dans une formulation de peinture sans biocide. Une étude paramétrique sur le procédé de fabrication des films minces a permis de mettre en évidence les corrélations fondamentales entre les paramètres de fabrication, les propriétés microstructurales et morphologiques des films. Les résultats ont montré que l'augmentation de la rugosité de surface renforçait l'activité antimicrobienne des films. Les tests normalisés ISO 22196 :2011, adaptés à cette étude, ont validé la robustesse des résultats obtenus. Enfin, la peinture formulée avec des nanoparticules sans biocide s'est avérée efficace pour inhiber la croissance d'*E. coli* et de *S. aureus*, confirmant son potentiel pour des applications pratiques.

Mots clés : Nanoparticules, oxydes métalliques, antimicrobiens, revêtements, peinture.

Abstract :

This thesis investigates using zinc oxide (ZnO) nanoparticles as antimicrobial agents to combat nosocomial infections, a major public health concern. It is part of the search for alternative antibiotic solutions, aimed at limiting the spread of pathogenic microorganisms. The work

focuses on the controlled synthesis of ZnO nanoparticles using the sol-gel method, their physicochemical characterization and the optimization of their antimicrobial activity.

The antimicrobial efficacy of the nanoparticles was evaluated against European pharmacopoeia strains: *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, and *Staphylococcus aureus*, as well as the fungus *Candida albicans*. A size-controlled synthesis process was developed, followed by a characterization of their size, microstructure, and morphology. The influence of nanoparticle size on antimicrobial efficiency was assessed by determining the minimum inhibitory concentrations (MIC) and minimum bactericidal concentrations (MBC). Further analysis was conducted by measuring the growth kinetics of microorganisms in the presence of nanoparticles of varying sizes. The results revealed that reducing the size of the nanoparticles significantly enhanced their antimicrobial activity.

The research also explored improving the antimicrobial activity of ZnO thin films and incorporating nanoparticles into a biocide-free paint formulation. A parametric study of the thin-film fabrication process highlighted the fundamental correlations between fabrication parameters and the microstructural and morphological properties of the films. The findings demonstrated that increased surface roughness enhanced the antimicrobial efficacy of the films. Standardized ISO 22196:2011 tests, adapted for this study, validated the reliability and robustness of the results. Finally, the biocide-free paint formulated with nanoparticles effectively inhibited the growth of *E. coli* and *S. aureus*, confirming its potential for practical applications.

Keywords: Nanoparticles, metal oxides, antimicrobials, coatings, paints