

Université de Limoges

École Doctorale Gay Lussac - Sciences pour l'Environnement (ED 523)
Laboratoire de Chimie des Substances Naturelles

Thèse pour obtenir le grade de
Docteur de l'Université de Limoges

Discipline / Spécialité : Chimie/Chimie Appliquée – Chimie des Substances Naturelles

Présentée et soutenue par
Jean Kerim NZAMBE TA KEKI

Le 21 décembre 2015

Elaboration de matériaux bioactifs à partir de fibres lignocellulosiques

Thèse dirigée par Rachida Zerrouki et Tan-Sothéa OUK

JURY :

Rapporteurs

Mme Sandrine BOUQUILLON, Professeur, *Université de Reims Champagne-Ardenne*

M. Nicolas JOLY, Professeur, *Université d'Artois*

Examineurs

Mme Corinne MIRAL, Maître de Conférences, *Université de Nantes*

M. Vincent GLOAGUEN, Professeur, *Université de Limoges*

M. Tan-Sothéa OUK, Maître de Conférences, *Université de Limoges*

Mme Rachida ZERROUKI, Professeur, *Université de Limoges*



Remerciements

Ces travaux de thèse constituent une riche expérience professionnelle et humaine, par conséquent je ne saurais les présenter sans remercier les personnes qui m'ont encadré, aidé et soutenu au cours de ces trois dernières années. Vu qu'il est difficile de n'oublier personne, je tiens à remercier par avance ceux dont le nom n'apparaît pas dans ces quelques lignes.

Pour m'avoir donné l'opportunité de réaliser ce projet de thèse, mes remerciements vont tout d'abord au professeur Vincent Sol qui m'a accueilli au sein de son laboratoire. Votre implication et vos conseils avisés m'auront beaucoup aidé dans l'orientation de ces travaux de recherche.

Je tiens à remercier mes directeurs de thèse. Madame Rachida Zerrouki, vous avez suivi mon parcours dès mon arrivée en France et vous avez après mon stage de Master accepté de me prendre sous votre direction en thèse. C'est grâce à votre disponibilité, vos conseils scientifiques et votre rigueur à la paille que j'ai pu, malgré quelques lenteurs faire des progrès en synthèse organique et mener bout à bout ce projet. Pour toutes ces responsabilités que vous m'avez confiées, trouvez ici l'expression de ma profonde reconnaissance. Monsieur Tan-Sothéa OUK, vous avez su vous montrer très patient et didactique pour me former à la rigueur et à la détermination qu'exige la pratique de la microbiologie. Je ressors de cette expérience avec une double compétence que je mettrais à profit et j'ai vraiment apprécié travailler au sein de votre équipe.

Je suis très sensible de l'honneur que m'ont fait Monsieur Nicolas Joly et Madame Sandrine Bouquillon en acceptant d'être rapporteur de ces travaux de thèse. Veuillez trouver ici les marques de ma profonde reconnaissance. Je remercie également, en ayant accepté de juger ce travail, Madame Corinne Miral en qualité d'examinatrice.

Je tiens également à remercier tous les permanents du laboratoire avec qui je n'ai pas spécialement travaillé mais qui m'ont toujours réservé un accueil chaleureux, je pense ici à Robert Granet, Vincent Chaleix, Guy Costa, Sabine Lhernoud, Stéphanie Lhez...etc.

Merci à Pierre Antoine Faugeras "PAF" qui m'a longuement épaulé et formé à prendre la suite de ses travaux de thèse. Merci également à Pierre-Henri "PH" et Benjamin "Benji" qui, grâce à leur conseils, leur assistance et leur bonne humeur ont contribué à m'intégrer pleinement au sein du laboratoire ; A Jihane pour ses encouragements, son soutien et nos discussions qui vont me manquer, je te souhaite le meilleur pour la suite.

Un grand merci à tous les anciens du laboratoire qui m'ont énormément conseillé. Je pense à mon champion Julien V. a.k.a Julius Olympus ; en master 1 ton encadrement de stage tant ludique que formateur aura été déterminant dans mon intégration au sein du laboratoire ; A Karine Teste qui à cette époque m'a témoigné une agréable sympathie. Grand merci aux acolytes Ahmad et Jean-Pierre qui m'ont grandement aidé sur les outils d'analyse des porphyrines. Merci pour vos conseils et votre agréable compagnie. Mes remerciements vont également à l'endroit de mon Manu a.k.a "agnus manus", avec qui j'ai passé des moments



d'échanges inoubliables. Tu as vraiment grand cœur, tu es quelqu'un de bien et j'espère que tu viendra au Gabon célébrer mon mariage comme convenu. Je n'oublie pas le "coq à grande crête", j'ai cité Cédric Astier mon "coquinou", c'est toi le chef! Merci par ailleurs à Romain Lucas qui m'a aidé à comprendre bien des aspects sur la "chimie-click" et pour m'avoir invité à présenter mes travaux lors d'une conférence de vulgarisation au Carrefour des Etudiants.

J'en place également une pour mes stagiaires Karine, Ludovic et tout particulièrement mon adorable-emmerdeuse Zineb à qui je souhaite une suite favorable pour le déroulement de sa thèse, tu en as les qualités. Vous avez tous énormément contribué à l'élaboration de ce manuscrit. Merci de tout cœur. Pour avoir défriché une grande partie du travail sur les azidos, Claire, je ne t'oublie pas.

Je passe ensuite une dédicace spéciale à tous ceux que j'ai eu le plaisir de côtoyer durant ces quelques années au laboratoire ; je pense Marietta, Rihab, Fred, Idelette et ses si bons bonbons que je n'ai pas pu finir en deux ans, Olivier, Amandine, Patrice, à ce sacré Glomus Aurélien, à Amaury le plus vantard de tous, à ma fillette Benjamin, Meggy, Marjorie, à Tom Büchner, Valentin ma poule...pour tout ce qu'on a partagé humainement et scientifiquement vous allez tous me manquer.

A toute l'équipe de l'IUT, je vous témoigne mes sincères remerciements pour votre disponibilité et votre convivialité, nos blagues vont me manquer. Je pense au professeur Philippe Bressolier, aux Karines, à Corny-corny et à sa sœur jumelle imaginaire; à ceux qui sont partis entre temps, Romain, Oriane, Hélène...etc

Pour leurs encouragements et leur assistance dans tous les moments que nous avons passé ensemble, je tiens à adresser mes chaleureux remerciements à mes compagnons de promo et de lutte. Shihong tu seras déjà docteur quand tu me liras, tu es le meilleur d'entre nous. Tes conseils avisés et nos échanges divers m'auront été d'un grand soutien, je te dis merci et te souhaite le meilleur pour la suite. Mark-Arthur, toi "jeune homme" notre aventure date de depuis le Gabon, de depuis l'USTM et Dieu sait combien on s'est serré les coudes ici en France. Les études nous donnent des camarades et les épreuves des frères, tu en es un pour moi. Je te félicite pour ton travail et te souhaite le meilleur pour la suite également.

Je remercie par ailleurs l'Agence Nationale des Bourses et Stages du Gabon pour le financement de ces trois années de thèse, m'ayant permis de travailler dans des conditions optimales ;A l'association Samba'a Limousin et à tous ceux qui m'y ont apporté leur soutien.

Enfin, ces remerciements ne seraient pas complets sans mentionner les piliers et les moteurs qui m'aident tous les jours à tenir debout et à aller de l'avant. Je pense à mon regretté grand-père qui a fait de moi l'homme que je suis; à ma mère, ce travail est le fruit de tes mains, merci m'man ; à mes frères et sœurs, à mon fils Moriel...Merci.





Droits d'auteurs

Cette création est mise à disposition selon le Contrat :

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

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



Table des matières

INTRODUCTION GENERALE	23
I. LES SURFACES ANTIBACTERIENNES.....	27
I.1 Généralités sur les bactéries.....	27
I.2 Contamination des surfaces.....	28
I.2.1 Formation des biofilms	29
I.2.1.1 Attachement primaire transitoire et réversible en surface : Adhérence .	29
I.2.1.2 Attachement secondaire irréversible en surface: Adhésion	30
I.2.1.3 Développement du biofilm.....	30
I.2.1.4 Différenciation du biofilm.....	30
I.2.1.5 Détachement et dispersion du biofilm	31
I.2.2 Les facteurs d'adhésion des bactéries.....	31
I.2.2.1 L'hydrophobicité.....	31
I.2.2.2 Les caractéristiques physico-chimiques de la bactérie.....	32
I.2.2.3 Structure de surface de la bactérie	32
I.2.2.4 La charge de surface des bactéries:	32
I.2.3 Les infections associées aux biofilms et leur tolérance aux antibiotiques...	33
I.2.3.1 Les infections associées aux biofilms.....	33
I.2.3.2 Tolérance des biofilms aux antibiotiques.....	33
I.2.3.2.1 Diffusion altérée des antibiotiques.....	34
I.2.3.2.2 Altération du microenvironnement	34
I.2.3.2.3 Les mécanismes génétiques spécifiques	35
I.2.3.2.4 Les bactéries persistantes	35
I.3 Les matériaux antibactériens supportés	36
I.3.1 Les ammoniums quaternaires.....	40
I.3.2 Les N-Halamines.....	41
I.3.3 Le chitosane.....	43

I.3.4	Les polybiguanides	45
I.3.5	Les métaux	47
II.	OBJET DU TRAVAIL.....	49
III.	LA CELLULOSE	54
III.1	Structure de la cellulose	54
III.2	Supports cellulosiques antibactériens :	55
IV.	ELABORATION D'UN MATERIAU BIOACTIF PAR GREFFAGE DU TRICLOSAN SUR DES FIBRES LIGNOCELLULOSIQUES-EVALUATION BIOLOGIQUE.....	59
IV.1	Le triclosan	59
IV.1.1	Généralités	59
IV.1.2	Mode d'action du triclosan	60
IV.1.3	Mise au point bibliographique : Les supports antimicrobiens à base de triclosan.....	60
IV.1.4	Greffage du triclosan sur la pâte à papier.....	65
IV.1.4.1	Stratégie de synthèse	65
IV.1.4.2	Propargylation du triclosan.....	66
IV.1.4.3	MODIFICATION CHIMIQUE DES FIBRES LIGNOCELLULOSIQUE EN MILIEU ACQUEUX.....	67
IV.1.4.3.1	Solubilisation de la cellulose	67
IV.1.4.3.2	Préparation de la pâte Kraft Azidée	68
IV.1.4.3.2.1	Tosylation de la pâte Kraft.....	68
IV.1.4.3.2.2	Azidation de la pâte Kraft tosylée	73
IV.1.4.3.3	Réaction de cycloaddition entre le propargyltriclosan et la pâte azidée.....	75
IV.1.5	Evaluation biologique de l'activité antimicrobienne du support-triclosan.....	77
IV.1.5.1	Mise au point des tests microbiologiques.....	77
IV.1.5.1.1	Préparation des échantillons	77
IV.1.5.1.2	Tests microbiologiques	78



IV.1.5.2	Exploitation des résultats.....	79
IV.1.5.2.1	Évaluation biologique de l'activité du matériau triclosan	79
IV.1.5.2.2	Évaluation de la durée d'activité biologique du matériau pâte Kraft-triclosan.....	81
V. PRÉPARATION ET ÉVALUATION BIOLOGIQUE DE MATERIAUX BIOACTIFS OBTENUS PAR GREFFAGE DE PORPHYRINES SUR DES FIBRES LIGNOCELLULOSIQUES		
		85
V.1	Les porphyrines.....	85
V.1.1	Structure des porphyrines.....	85
V.1.2	Caractérisation des porphyrines.....	86
V.1.2.1	Spectroscopie UV-Visible.....	86
V.1.2.2	Résonance Magnétique Nucléaire : Spectroscopie RMN du proton.....	87
V.2	Mise au point bibliographique : Les porphyrines et la lutte contre les proliférations bactérienne.....	88
V.2.1	La photochimiothérapie antimicrobienne (PACT).....	89
V.2.2	Liaison des porphyrines aux cellules microbiennes.....	90
V.2.3	Les mécanismes possibles de la photoinactivation bactérienne	91
V.2.4	2- Les supports antimicrobiens à base de porphyrines : Les surfaces photobactéricides	92
V.3	Elaboration de matériaux porphyriniques à partir de fibres lignocellulosiques	98
V.3.1	Elaboration de matériaux porphyriniques neutres à partir de fibres lignocellulosiques	98
V.3.1.1	Stratégie de synthèse	98
V.3.1.2	Synthèses	99
V.3.1.2.1	Synthèse de la 5-(4-nitrophényl)-10,15,20-triphénylporphyrine	99
V.3.1.2.2	Réduction de la 5-(4-nitrophényl)-10,15,20 triphénylporphyrine .	101
V.3.1.2.3	Synthèse de la 5-(4-azidophényl)-10,15,20-triphénylporphyrine ..	103
V.3.1.2.4	Métallation de la 5-(4-azidophényl)-10,15,20-triphénylporphyrine au zinc.....	104



V.3.1.2.5	Préparation de la pâte Kraft propargylée	106
V.3.1.2.6	Réaction de cycloaddition entre la pâte Kraft propargylée et la porphyrine neutre.	108
V.3.2	Elaboration de matériaux porphyriniques cationiques à partir de fibres lignocellulosiques	111
V.3.2.1	Stratégie de synthèse	111
V.3.2.2	Synthèse	112
V.3.2.3	Propargylation de la 5,10,15,20-Tetra(4-pyridyl)porphyrine (TPyP).....	112
V.3.2.4	Métallation de tétrapropargylpyridylporphyrine.....	113
V.3.2.5	Réaction de cycloaddition entre la porphyrine propargylée et la pâte azidée.....	114
V.3.3	Evaluation de l'activité photobactéricide des matériaux porphyriniques.	116
V.3.3.1	Tests de production d'oxygène singulet	117
V.3.3.2	Source lumineuse	117
V.3.3.3	Traitement photodynamique des disques de pâte Kraft modifiés.....	119
V.3.3.3.1	Préparation des échantillons	119
V.3.3.3.2	Protocole de photoinactivation bactérienne	121
V.3.3.4	Exploitation des résultats.....	122
V.3.3.4.1	Matériau porphyrinique neutre.....	122
V.3.3.4.2	Matériau porphyrinique cationique.....	124
V.3.3.5	Explication mécanistique des résultats	126
VI.	ELABORATION D'UN MATERIAU BIOACTIF PAR GREFFAGE D'AZIDOARYLES SUR DES FIBRES LIGNOCELLULOSIQUES - EVALUTION BIOLOGIQUE	130
VI.1	Les molécules antimicrobiennes à base du triazole ou de ses dérivés.	130
VI.1.1	Importance pharmacologiques des composés à base de triazole	130
VI.1.2	Mise au point bibliographique : Activité antimicrobienne de composés à base du 1,2,3-triazoles et de ses dérivés	131



VI.2	Préparation de l'azidobenzène substitué et supporté par la pâte Kraft.....	134
VI.2.1	Synthèse des dérivés azidés.....	136
VI.2.2	Réaction de couplage entre la pâte propargylée et l'azidobenzène	137
VI.2.3	Evaluation de l'activité microbiologique	137
VI.2.3.1	Protocole et résultats des tests microbiologiques.....	137
VI.2.3.2	Exploitation des résultats.....	139
CONCLUSION GENERALE ET PERSPECTIVES		142
PARTIE EXPERIMENTALE		144
VI.1	Matériels.....	144
VI.1.1	Réactifs et solvant	144
VI.1.2	Chromatographie	145
VI.1.2.1	Chromatographie sur couche mince (CCM)	145
VI.1.2.2	Chromatographie préparative sur plaques de silice.....	145
VI.1.2.3	Chromatographie sur colonne.....	145
VI.1.3	Analyses	146
VI.1.3.1	Spectroscopie infra-rouge.....	146
VI.1.3.1.1	Spectroscopie UltraViolet-Visible.....	146
VI.1.3.1.2	Spectroscopie de RMN.....	146
VI.1.3.1.3	Spectrométrie photoélectronique X (XPS).....	146
VI.1.3.2	Appareillage d'activation micro-ondes.....	147
VI.2	SYNTHESES.....	147
VI.2.1	Préparation de la dispersion de la pâte Kraft dans le système NaCl/H ₂ O .	147
VI.2.2	Préparation de la pâte Kraft tosylée	148
VI.2.3	Préparation de la pâte Kraft azidée.....	149
VI.2.5	Propargylation du triclosan	150
VI.2.6	Réaction de couplage entre la pâte azidée et le triclosan propargylé	151
VI.2.7	5-(4-nitrophényl)-10, 15, 20- triphénylporphyrine : TPP-NO ₂	152
VI.2.8	5-(4-aminophényl)-10, 15, 20 triphénylporphyrine : TPP-NH ₂	153
VI.2.9	5-(4-azidophényl)-10, 15, 20 triphénylporphyrine : TPP-N ₃	154



VI.2.10	Méallation de la 5-(4-azidophényl)-10, 15, 20 triphénylporphyrine : Zn-TPP-N ₃	155
VI.2.11	Préparation de la Pâte Kraft propargylée.....	156
VI.2.12	Greffage par réaction de “Click chemistry” de la porphyrine azidée sur la pâte Kraft propargylée.....	157
VI.2.13	Propargylation de la 5,10,15,20-tetra(4-pyridyl)porphyrine (TPyP).....	158
VI.2.14	Méallation de la tétrapropargylpyridylporphyrine	159
VI.2.15	Réaction de couplage entre la porphyrine Zn-TPPyP et la pâte azidée ..	160
VI.2.16	Synthèse des dérivés azidoaryles	161
VI.2.17	Réaction de couplage entre la pâte propargylée et les dérivés azidoaryles.....	163
VI.2.18	Souches bactériennes.....	164
VI.2.19	Détermination de la concentration d'une suspension bactérienne	165
VI.2.1	Evaluation biologique des supports non-photosensibles (Triclosan et Azidoaryles).....	167
VI.2.2	Photoinactivation bactérienne.....	168
RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES		170
ANNEXE – PUBLICATION SCIENTIFIQUE		Erreur ! Signet non défini.



Table des figures

Figure I:1. Schématisation de deux types de parois cellulaires bactériennes à Gram positif et négatif	27
Figure I:2. Modèle représentant les étapes de la formation d'un biofilm bactérien [13].	29
Figure I:3 Hypothèses expliquant le phénomène de tolérance du biofilm vis-à-vis des antibiotiques [29].....	34
Figure I:4 Mécanismes de toxicité des nanoparticules(NP) contre les bactéries [41]	39
Figure I:5 Structure de la 5,5-diméthyle-3-(3'-triéthoxysilylpropyl)hydantoïne	42
Figure I:6 Structure du chlorure de 3-(triméthoxysilylpropyl)octadecyldiméthyl ammonium (SPODA)	42
Figure I:7 Structure du chlorure de 3-(acrylamidopropyl) triméthylammonium	43
Figure I:8 Structure du chitosane.....	44
Figure I:9 Structure du chlorhydrate de polyhexaméthylène biguanide	45
Figure I:10 Structure moléculaire du polyhexaméthylènediamine biguanide (PHMG) ...	46
Figure II:1 Schéma général de greffage des molécules sur la pâte Kraft	49
Figure III:1 Structure de la cellulose.....	54
Figure III:2 Liaisons hydrogène inter- et intramoléculaires au sein de la cellulose.	55
Figure IV:1 Structure chimique du triclosan (2,4,4'-trichloro-2'-hydroxy-diphenylether)	59
Figure IV:2 Diagramme de comparaison des DS des différentes méthodes de la littérature.	70
Figure IV:3 Spectre XPS de la pâte Kraft tosylée	73
Figure IV:4 Spectre Infra-rouge de la pâte Kraft azidée	74
Figure IV:5 Spectre XPS de la pâte Kraft azidée.....	75
Figure IV:6 Fibres de pâte Kraft-triclosan	76

Figure IV:7 Spectre XPS des fibres de pâte Kraft-triclosan	76
Figure IV:8 Découpe des feuilles de triclosan réticulés.....	77
Figure IV:9 Protocole pour l'évaluation biologique des supports celluloses antimicrobiens.....	78
Figure IV:10 Activité antibactérienne du matériau « pâte kraft-triclosan » à t=24 h sur <i>E. coli</i> , <i>S. aureus</i> et <i>B. cereus</i>	79
Figure IV:11 Activité antibactérienne du matériau « pâte kraft-triclosan » à t=24 h sur <i>P.aeruginosa</i>	80
Figure IV:12 Activité antibactérienne du matériau « pâte Kraft-triclosan » de t ₂₄ à t ₉₆ sur <i>E.coli</i>	82
Figure IV:13 Activité antibactérienne du matériau « pâte Kraft-triclosan » à t ₉₆ sur <i>S.aureus</i>	83
Figure IV:14 Activité antibactérienne du matériau « pâte Kraft-triclosan » à t ₉₆ sur <i>Bacillus cereus</i>	84
Figure V:1 (a) Porphyrine base libre ; (b) Porphyrine base métallée ; (c) Représentation du système de 18 électrons π aromatiques.....	85
Figure V:2 Système de nomenclature conventionnel du macrocycle.	86
Figure V:3 Spectre UV-visible caractéristique d'une porphyrine base "libre" : la TPP (dans CHCl ₃).	87
Figure V:4 Cône d'anisotropie magnétique d'une porphyrine.....	88
Figure V:5 Schéma de Jablonski représentant le processus impliqué dans la photothérapie [109]......	90
Figure V:6 Différence de réactivité des PS vis-à-vis de souches bactériennes Gram (+) et Gram (-)	91
Figure V:7 Mécanisme proposé pour la photoinactivation des bactéries [113]......	92
Figure V:8 Principe de la photochimiothérapie antimicrobienne (PACT)	93



Figure V:9 a) Porphyrine immobilisée sur des polymères de méthylacrylate b) Porphyrines TPP-OH immobilisées sur du polyuréthane (PU) puis pulvérisée sur du poly-méthylméthacrylate.....	94
Figure V:10 La porphyrine 5,10,15,20-tetrakis[4-(6-N,N,N-triméthylammomiumhexyloxy)phenyl]porphyrin (TPPN) fixée sur du polythiophène..	94
Figure V:11 Porphyrines neutres, anioniques et cationiques immobilisées sur du coton	95
Figure V:12 a) la 5-(4-aminophenyl)-10,15,20-tri(4-N-méthylpyridyl)porphyrine greffée sur du papier filtre. (b) chloroacétate de cellulose pyridylporphyrinique cationique c) laurate de cellulose protoporphyrinique	96
Figure V:13 Greffage de la [5,10,15-tri(4-N-méthylpyridyl)-20-(4-alkylphenyl)porphyrinato]zinc(II)	97
Figure V:14 Synthèse directe de la TPP-NO ₂	99
Figure V:15 Spectre UV-visible de la TPP-NO ₂	101
Figure V:16 Spectre UV-visible de la TPP-NH ₂	102
Figure V:17 Spectre de la porphyrine azidée	103
Figure V:18 Spectre UV-Visible de la TPP-N ₃	104
Figure V:19 Spectre UV-visible de la Zn-TPP-N ₃	106
Figure V:20 Spectre IR de la pâte Kraft propargylée	107
Figure V:21 Spectre XPS de la pâte Kraft propargylée.....	107
Figure V:22 (a)-Pâte propargylée et (b)- Pâte après greffage de la Porphyrine neutre	109
Figure V:23 Spectre XPS du matériau porphyrinique neutre	110
Figure V:24 Spectre UV-Visible de la tétrapropargylpyridylporphyrine (TPPyP).....	113
Figure V:25 Spectre UV-Visible de la tétrapropargylpyridylporphyrine métallée au zinc	114
Figure V:26 Matériau porphyrinique cationiques.....	115



Figure V:27 Spectre XPS du matériau porphyrinique cationique.....	116
Figure V:28 Spectre d'émission de la source LED utilisée dans le dispositif PACT.	118
Figure V:29 Matériaux porphyriniques cationiques et neutres sous forme de feuilles et leur découpe sous forme de disques.....	119
Figure V:30 Les différents contrôles négatifs utilisés pour les tests antimicrobiens	120
Figure V:31 Protocole utilisé pour la photoinactivation.....	121
Figure V:32 Mesure de l'activité photobactéricide du matériau porphyrinique neutre (<i>S. aureus</i>).....	123
Figure V:33 Mesure de l'activité photobactéricide du matériau porphyrinique neutre (<i>P. aeruginosa</i>)	124
Figure V:34 Mesure de l'activité photobactéricide du matériau porphyrinique cationique (<i>S. aureus</i>).....	125
Figure V:35 Mesure de l'activité photobactéricide du matériau porphyrinique cationique (<i>P. aeruginosa</i>).....	126
Figure VI:1 Propriétés pharmacologiques des composés à base de triazole	130
Figure VI:2 Stratégie de greffage de l'azidoaryle sur des fibres lignocellulosiques	135
Figure VI:3 Dérivés azidoaryles choisis lors du greffage sur les fibres lignocellulosiques	135
Figure VI:4 Résultats des tests antimicrobiens des matériaux «pâte Kraft-azidoaryles» sur <i>E. coli</i> CIP 54.8T	138
Figure VI:5 Résultats des tests antimicrobiens des matériaux «pâte Kraft-azidoaryles» sur <i>S. aureus</i> CIP 7625	139
Figure VI:6 Dispositif de PACT	169



Table des schémas

Schéma I:1 Structure d'un ammonium quaternaire	40
Schéma I:2 Synthèse du support PVA-QAS.....	41
Schéma I:3 Synthèse du support gélatine-QAs	41
Schéma I:4 Formation du PHMG-PP.....	47
Schéma II:1 Schéma général de la réaction de Click chemistry.....	50
Schéma III:1 Incorporation du chlorure de polyhexaméthylène guanidine (PHMG-Cl) dans la matrice cellulosique[66]	56
Schéma IV:1 Fixation du triclosan (TCS) sur une surface à base de Titane contenant des polymères de N-hydroxyéthylacrilamide (PHEEA) [76].....	61
Schéma IV:2 Fixation du triclosan (TCS) sur une surface à base de polyéthylène de faible densité (LDPE) contenant des polymères d'acide acrylique (PAA) [78].....	62
Schéma IV:3 Fixation du triclosan préalablement époxydé (TCS) sur une polyéthylèneimine [79].....	63
Schéma IV:4 Réaction de greffage de la monochlorotriazinyl-β-cyclodextrine (MCT-β-CD) sur la cellulose et inclusion du triclosan dans la cavité du matériau Cellulose-MCT-β-CD [82].....	64
Schéma IV:5 Stratégie de greffage du triclosan sur les fibres de pâte lignocellulosique..	66
Schéma IV:6 Propargylation du triclosan	66
Schéma IV:7 Complexe [Li-DMAc] ⁺ Cl ⁻ /Cellulose.....	68
Schéma IV:8 Tosylation de la pâte Kraft.....	69
Schéma IV:9 Azidation de la pâte Kraft.....	73
Schéma IV:10 Couplage de la pâte Kraft azidée et du triclosan propargylé	75
Schéma V:1 Stratégie de greffage de la porphyrine neutre sur les fibres lignocellulosiques.....	99
Schéma V:2 Synthèse de la TPP-NH ₂	101



Schéma V:3 Synthèse de la TPP-N ₃	103
Schéma V:4 Formation de la Zn-TPP-N ₃	105
Schéma V:5 Propargylation de la pâte Kraft dans le système NaCl/H ₂ O.....	106
Schéma V:6 Greffage de la TPP-N ₃ sur la pâte propargylée.....	109
Schéma V:7 Synthèse du support porphyrinique cationique.....	111
Schéma V:8 Propargylation de la TPyP.....	112
Schéma V:9 Métallation de la TPPyP.....	113
Schéma V:10 Réaction de greffage de la Zn-TPPyP sur la pâte Kraft.....	115
Schéma V:11 Photooxygénation de l'ergostérol.....	117
Schéma V:12 Préparation de la pâte Kraft triazolylée.....	121
Schéma VI:1 Exemple de dérivés de fluconazole synthétisés [145].....	131
Schéma VI:2 Structure générale des composés à base de saccharose [146].....	132
Schéma VI:3 Chalcones propargylée couplées à l'azoture de benzyle [147].....	133
Schéma VI:4 Schéma général de greffages d'azoture d'aryles avec l'acétylène [148].....	133
Schéma VI:5 Greffage du phénylacétylène sur le polyazoture de glycidyle [149].....	134
Schéma VI:6 Formation des dérivés azidés.....	136
Schéma VI:7: Couplage de l'azidoaryle avec la pâte Kraft propargylée.....	137



Table des tableaux

Tableau II:1 Composition de la pâte Kraft	52
Tableau III:1 Degré de polymérisation de cellulose provenant de différentes espèces végétales.	54
Tableau IV:1 Comparaison des méthodes de tosylation.	69
Tableau IV:2 Résultats des analyses DRX de la cellulose traitée dans les systèmes NaOH/H ₂ O et NaCl/H ₂ O	71
Tableau IV:3 Propriétés physiques des fibres traitées dans les systèmes NaOH/H ₂ O et NaCl/H ₂ O comparées à celles de fibres non traitées	71
Tableau IV:4 Analyses XPS des fibres Kraft modifiées.....	72
Tableau IV:5 Analyses XPS des fibres Kraft modifiées.....	74
Tableau V:1 Rendements des produits obtenus après purification	100
Tableau V:2 Pourcentages atomiques en C et en O avant et après modification chimique des fibres.....	108
Tableau V:3 Pourcentages atomiques des éléments constituant les matériaux lignocellulosiques avant et après réaction de couplage	110
Tableau V:4 Pourcentages atomiques des matériaux lignocellulosiques avant et après réaction de couplage	116
Tableau V:5 Caractéristiques de l'irradiation lumineuse du dispositif PACT.....	119



Liste des abréviations

AATCC100 : Assessment of Antibacterial Finishes on Textile Materials

Azb : Azidobenzène

Bazb : Butyl-azidobenzène

CCM : chromatographie sur couche mince

CMI : concentration minimale inhibitrice

coll. : collaborateur

CPβCD : β-cyclodextrines cationiques

CuAAC : cycloaddition d'un azide et d'un alcyne, catalysée par le cuivre (I)

d : doublet

D.P. : degré de polymérisation

dd : double doublet

DS : degré de substitution

ENR : énoyl-ACP réductase

EPS : exopolysaccharides

éq. : équivalent

h : heure

Hazb : Hydroxyéthyl-azidobenzène

IAS : infections associées aux soins

InVS : Institut national de Veille Sanitaire

IR : infrarouge

J : constante de couplage

LCSN : Laboratoire de Chimie des Substances Naturelles

m : multiplet

M.O. : micro-ondes

m/z : rapport masse sur charge

MALDI : désorption-ionisation laser assisté par matrice

MEB : microscopie électronique à balayage

min : minute

NP : nanoparticules

PACT : photochimiothérapie antimicrobienne

PCL : polycaprolactone

PDT : photothérapie dynamique

PEI : polyéthylèneimine

PHEEA : polymères de N-hydroxyéthylacrilamide

PHMB : polyhexaméthylène biguanide

PHMG : polyhexaméthylène de guanidine

PHMG : polyhexaméthylènediamine biguanide

PK : pâte Kraft

PK-Azb : "matériau pâte Kraft-azidobenzène"

PK-Bazb : "matériau pâte Kraft-Butylazidobenzène"

PK-Hazb : "matériau pâte Kraft-Hydroxyéthylazidobenzène"

PK-N₃ : pâte Kraft azidée

PK-Pcat : pâte Kraft porphyrinique cationique

PK-PN : pâte Kraft porphyrinique neutre

PK-PROP : pâte Kraft propargylée

PK-Tos : pâte Kraft tosylée

PK-TRIAZ : pâte Kraft triazolylée

PK-TRIC : matériau "pâte Kraft-Triclosan"

PP : polypropylène

Pp IX : protoporphyrine IX

ppm : partie par million

PS : photosensibilisateur

PVA : alcool polyvinylique

q : quadruplet

QAS : sels d'ammonium quaternaire

R_f : rapport frontal

RMN : résonance magnétique nucléaire

ROS: espèces réactives de l'oxygène

s : singulet

sél : singulet élargi

SIDA : Syndrome d'immunodéficience acquise

SM : spectrométrie de masse

SPH : 5,5-diméthyle-3-(3'-triéthoxysilylpropyl)hydantoine

SPODA : 3-(triméthoxysilylpropyl)octadecyldiméthyl ammonium chloride

st : sextuplet

t : triplet

TA : température ambiante

TCS : triclosan

T_f : température de fusion

TMS : tétraméthylsilane

TPP : 5,10,15,20-tétraphényl porphyrine

TPP-N₃ : 5-(4-azidophényl)-10,15,20-triphényl porphyrine

TPP-NH₂ : 5-(4-aminophényl)-10,15,20-triphényl porphyrine

TPP-NO₂ : 5-(4-nitrophényl)-10,15,20-triphényl porphyrine

TPPyP : 5,10,15,20-Tetrapropargyle(4-pyridyl)porphyrine

TPyP : 5,10,15,20-Tetra(4-pyridyl)porphyrine

UFC : unité formant colonie

UV : ultraviolet

XPS: spectrométrie photoélectronique X

Zn-TPPN₃ : 5-(4-azidophényl)-10,15,20-triphényl porphyrinato zinc

Zn-TPPyP : 5,10,15,20-Tetrapropargyle(4-pyridyl)porphyrinato zinc



INTRODUCTION GENERALE

À la fin des années 1970, a été décrétée «la fin des maladies infectieuses ». Avec l'apparition des pathologies liées au SIDA (Syndrome d'ImmunoDéficiency Acquisée) et la découverte de nouveaux agents infectieux, le retour des maladies infectieuses a été prononcé 15 à 20 ans après, donnant naissance aux « infections émergentes » [1]. La diminution de la sensibilité de la plupart des germes aux antimicrobiens ne cesse de se développer et touche notamment les bactéries les plus courantes comme *Streptococcus pneumoniae* et *Escherichia coli*. Les bactéries sont abondantes dans l'environnement (eau, sol et air) et chez les êtres vivants. Une majorité d'entre elles est présente naturellement chez l'homme (flore cutanée et flore intestinale) et ne cause pas d'effets néfastes à la santé, et certaines sont même essentielles à l'organisme humain.

Les risques pour la santé apparaissent lorsque les concentrations de certaines espèces deviennent anormalement élevées surtout dans des endroits qui doivent rester aseptiques comme les hôpitaux, les industries agroalimentaires ou l'industrie pharmaceutique. Cette contamination consiste en l'adhésion de bactéries pathogènes ou opportunistes qui peuvent former des biofilms. Ces derniers sont à l'origine de la mise en place de résistance de certaines souches aux traitements conventionnels, et sont responsables de près de 65 à 80 % des infections nosocomiales [2]. Les infections nosocomiales qui, par définition sont des infections contractées dans des établissements de santé et qui s'étendent aujourd'hui aux infections associées aux soins comptent parmi les plus meurtrières. D'après une étude de l'Institut national de Veille Sanitaire (InVS) datant de 2012, un patient hospitalisé sur 20 contracte une infection dans l'établissement au sein duquel il est soigné [3]. En France, ces infections sont la cause directe de 4000 décès, et représentent un coût de prise en charge important pour la société évalué jusqu'à 800 millions d'euros par an [4]. Cela en fait actuellement un problème majeur en santé publique [5].

Il s'avère donc important de développer des stratégies visant à diminuer la contamination par ces microorganismes. Pour cela, plusieurs recherches [6] axées sur

l'élaboration de surfaces antimicrobiennes se sont révélées être une stratégie alternative pour lutter contre les proliférations bactériennes.

C'est pour répondre à cette problématique que de nombreux travaux se sont orientés vers la recherche de nouvelles alternatives notamment la photochimiothérapie antimicrobienne (PACT) [7]. Elle consiste à induire un effet bactéricide sous l'action de la lumière visible en présence d'un photosensibilisateur. Le microorganisme est détruit par une espèce réactive toxique produite au cours de ce processus, l'oxygène singulet. C'est dans ce contexte que le Laboratoire de Chimie des Substances Naturelles s'est intéressé à des photo-antibactériens sur supports solides par l'élaboration de matériaux photobactéricides actifs aussi bien sur les bactéries à Gram (+) que sur les bactéries à Gram (-), à partir de fibres lignocellulosiques et de porphyrines naturelles ou synthétiques. La pâte Kraft est composée majoritairement de fibres de cellulose et constitue une matrice de choix pour des modifications chimiques.

Au cours de cette thèse, nous avons choisi de nous intéresser dans un premier temps à la fixation de manière covalente d'un antibactérien commercial, le triclosan, sur des fibres lignocellulosiques de la pâte à papier ; puis dans une deuxième approche nous nous sommes orientés vers la fixation de porphyrines sur ces supports. Enfin dans une troisième approche, nous avons étudié le greffage d'azotures d'aryles sur ces mêmes fibres lignocellulosiques. Des tests microbiologiques ont permis d'évaluer l'activité des biomatériaux obtenus.

Première partie

Les surfaces antimicrobiennes: Contaminations bactériennes et stratégies anti-infectieuses existantes





I. LES SURFACES ANTIBACTERIENNES

Pour répondre aux problèmes de biocontamination des surfaces, de nombreux matériaux aux propriétés biocides ont été mis au point à ce jour. Avant de voir l'état de l'art sur la conception de ces matériaux, une présentation va être dédiée aux généralités sur les bactéries et le processus mis en jeu lors de la contamination des surfaces.

I.1 Généralités sur les bactéries

Les bactéries sont des organismes unicellulaires procaryotes. Ce sont les êtres vivants les plus vieux et les plus abondants sur la Terre. On peut les trouver dans l'eau, dans l'air, et notamment dans les sols. Ils existent sous deux formes : une forme allongée dite bacille ou une forme ronde dite *cocci*. Les cellules bactériennes sont entourées par une paroi. Cette paroi cellulaire représente une caractéristique très importante qui permet de diviser les bactéries en deux groupes, en se basant sur la différence de la structure et de la composition moléculaire de cette paroi, grâce à la coloration de Gram (**Figure I:1**). On distingue:

- Les bactéries à Gram (+) : leur paroi est composée essentiellement d'un peptidoglycane (ou muréine) épais. Elle est traversée par des acides téichoïques et lipotéichoïques. (ex : *Staphylococcus aureus*)
- Les bactéries à Gram (-) : leur paroi possède un peptidoglycane fin localisé au-dessous d'une bicouche lipidique surmontée par des lipopolysaccharides. (ex : *Escherichia coli*)

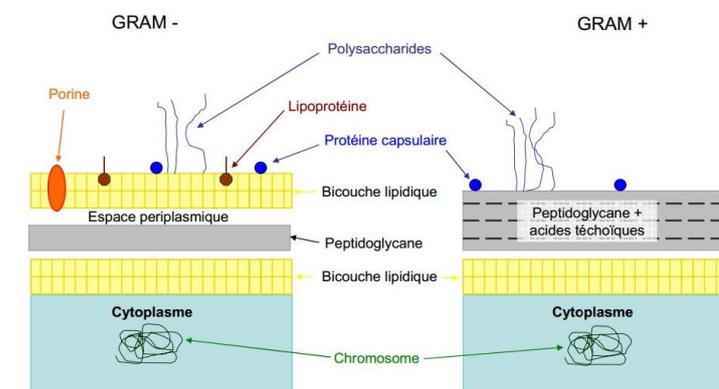


Figure I:1. Schématisation de deux types de parois cellulaires bactériennes à Gram positif et négatif

Ces bactéries sont ubiquitaires et sont présentes dans tous les types de biotopes rencontrés sur Terre. Chez l'Homme, certaines bactéries sont utiles pour son organisme tandis que d'autres peuvent être à l'origine de maladies infectieuses. Dans l'environnement des paramètres physico-chimiques influencent leur croissance tels que le pH (acidité et alcalinité), la température, la présence de dioxygène (O₂), de dioxyde de carbone (CO₂) et la disponibilité de l'eau.

Les risques de contamination et de contracter des maladies dangereuses augmentent lorsque ces bactéries sont introduites dans des sites où elles ne sont pas habituellement présentes. Les contaminations des surfaces dans les établissements hospitaliers par exemple sont à l'origine d'infections nosocomiales [8].

I.2 Contamination des surfaces

La grande majorité des microorganismes peuvent vivre selon deux états physiologiques différents. L'un où les populations bactériennes peuvent être isolées et flottent dans le milieu environnemental (état planctonique), l'autre où elles sont attachées sur une surface et vivent en communauté (état sessile). En effet, les bactéries ont le pouvoir d'adhérer et de se multiplier sur divers supports inertes tels que les sols et les surfaces internes de canalisations d'eau ou de conduits d'air. L'attachement sur une surface est une stratégie de survie qui permet à la bactérie de s'installer et de coloniser un environnement [9]. Après cet attachement sur un support biotique ou abiotique, les bactéries vont mettre en place et développer une communauté organisée à laquelle William Costerton a donné le nom de «**biofilm**» en 1978 [10]. Ainsi, un biofilm est défini comme étant une communauté de microorganismes fixée à une surface et maintenue par la sécrétion d'une matrice d'exopolysaccharides (EPS). Ces biofilms représentent un problème majeur de santé publique d'autant plus qu'ils sont impliqués dans près de 65 à 80 % des infections bactériennes chez l'Homme [2]. Pour lutter efficacement contre ces proliférations microbiennes, il serait important de comprendre les mécanismes liés à leur formation.



I.2.1 Formation des biofilms

D'une manière générale, la formation d'un biofilm est considérée comme une adaptation des bactéries à un environnement hostile comme une pression environnementale (indisponibilité en oxygène ou en nutriment) ou un traitement antimicrobien (traitement chimique ou antibiothérapie). L'observation par microscopie électronique, ainsi que les nombreuses études génétiques réalisées sur les biofilms, ont permis de décrire un modèle de développement physico-chimique se déroulant en cinq étapes (Figure I:2) [11,12].

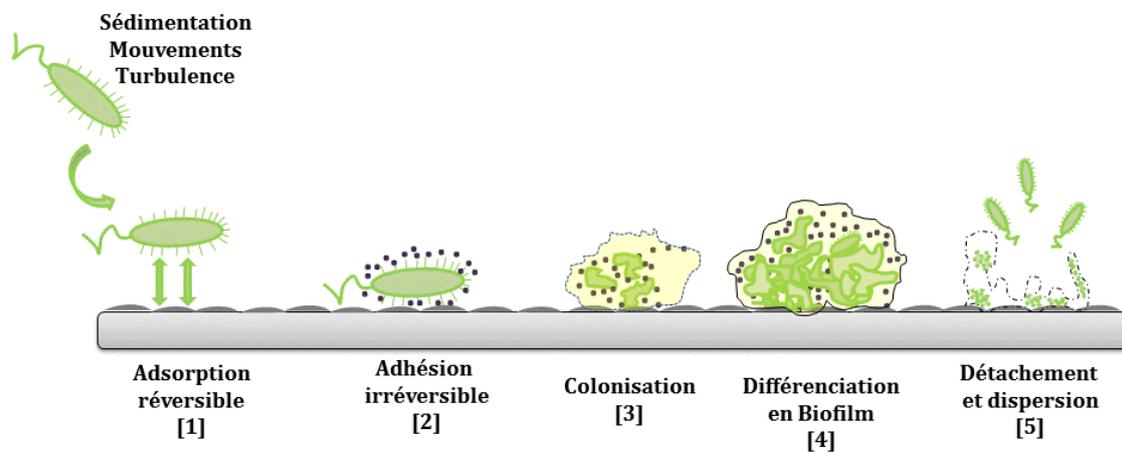


Figure I:2. Modèle représentant les étapes de la formation d'un biofilm bactérien [13].

I.2.1.1 Attachement primaire transitoire et réversible en surface : Adhèrence

La première étape est la formation d'un film primaire ou film de conditionnement composé de protéines, de glucides, de lipides et de matières minérales [14]. Ce film de conditionnement intervient dès le rapprochement de la bactérie à la surface. Ce rapprochement peut inclure des mouvements Brownien et une sédimentation due aux différences de gravité entre les bactéries et le milieu, ou au transfert de masse dans lequel les bactéries sont transportées physiquement vers la surface [15]. L'adhésion bactérienne débute ainsi par l'attachement des cellules grâce à des forces physico-chimiques, relativement faibles (forces de Van der Waals, liaisons hydrogènes, interactions électrostatiques et hydrophobes) qui conduisent à une interaction dite réversible avec la surface.

I.2.1.2 Attachement secondaire irréversible en surface : Adhésion

Dans un second temps, à mesure que les cellules se divisent, le nombre de bactéries associées à la surface augmente et l'adhésion devient irréversible. Cette transition vers une adhésion irréversible correspond à la sécrétion par la bactérie de structures ou substances polymériques constituant le « glycocalyx ». Le glycocalyx est un manteau membranaire constitué de glycoprotéines, glycolipides et protéoglycanes fixés à la surface de la membrane cellulaire. Celui-ci va permettre aux microorganismes d'adhérer plus fortement à la surface et cela va s'accompagner d'une profonde modification du profil d'expression des gènes essentiels à la formation du biofilm. Il s'agit en particulier de l'expression et la sécrétion des composants de la matrice qui constituent le « ciment » qui va tenir entre elles les bactéries et maintenir ancrés à la surface les éléments du biofilm [16,17]. Les bactéries forment alors des amas et produisent des polysaccharides extracellulaires. La présence de molécules organiques est un facteur aggravant car la surface devient alors une surface-substrat pour le développement des microorganismes.

I.2.1.3 Développement du biofilm

La troisième étape correspond à un développement précoce de l'architecture du biofilm. Elle est caractérisée par la formation de microcolonies composées à la fois des bactéries initiales qui se divisent et de bactéries qui s'attachent sur le biofilm en formation.

I.2.1.4 Différenciation du biofilm

La différenciation du biofilm correspond à la synthèse des exopolysaccharides de nature essentiellement polysaccharidique et dont les fractions organiques comprennent des glycoprotéines, des glucides et des substances humiques. En effet, lorsque les conditions de température et d'humidité sont réunies, les bactéries se développent en micro-colonies et forment progressivement un biofilm, structure multicouche de bactéries enrobées dans un magma de substances polymériques extracellulaires. Celui-ci grandit, murît et s'épaissit jusqu'à devenir macroscopique. Le biofilm est composé de

cellules bactériennes vivantes, de débris cellulaires et de diverses espèces microbiennes recrutées en surface.

I.2.1.5 Détachement et dispersion du biofilm

La dernière étape correspond à un détachement des bactéries du biofilm mature qui vont rentrer dans une phase de dissémination. En effet, sous l'effet du vieillissement du biofilm, de certains stress ou carences, les microorganismes peuvent se séparer du biofilm, parfois en consommant la matrice exopolysaccharidique qui représente une source d'énergie. Ces microorganismes retournent à l'état planctonique et peuvent coloniser de nouvelles surfaces complétant ainsi le cycle de vie d'un biofilm [18].

Plusieurs facteurs peuvent ainsi influencer l'adhésion d'une bactérie sur un support et favoriser tous les processus de pathogénicité qui en découlent.

I.2.2 Les facteurs d'adhésion des bactéries

Plusieurs facteurs sont impliqués dans l'adhésion des bactéries sur des surfaces. Parmi ces facteurs, l'hydrophobicité, la charge de surface des bactéries, la disponibilité en nutriments, la structure des membranes bactériennes et le type de substances exopolymériques synthétisées en surface de ces membranes sont déterminants dans l'adhésion bactérienne.

I.2.2.1 L'hydrophobicité

L'attachement des bactéries repose également sur l'hydrophobicité des groupes hydrophobes constituant leurs parois cellulaires. Il s'agit essentiellement de protéines de surface telles que les glycoprotéines et les glycolipides. Ces groupes permettent aux cellules bactériennes d'approcher le substrat en opérant des changements conformationnels à la surface de ce dernier pour favoriser des interactions de courte portée [15,19]. De manière générale, des bactéries possédant des propriétés hydrophobes vont adhérer à des surfaces hydrophobes et celles hydrophiles vont adhérer à des surfaces hydrophiles. Les bactéries hydrophobes adhèrent de façon plus importante que celles hydrophiles [20].

I.2.2.2 Les caractéristiques physico-chimiques de la bactérie

Les caractéristiques physico-chimiques diffèrent en fonction des espèces et des souches. Ces différences interviennent au niveau de l'architecture des membranes cellulaires et des fonctions des biomolécules qui les composent. Les bactéries Gram (+) sont composées d'un peptidoglycane épais (30 nm) qui constituent un réseau de sucres et de peptides qui agissent comme une barrière solide et flexible capable de résister au stress extérieur. Les parois des bactéries Gram (-) sont constituées d'un mince peptidoglycane (10 nm) surmonté d'une membrane phospholipidique externe constituée de polymères bactériens tels que le LPS (LipoPolySaccharide) et les phospholipides. L'espace entre ces deux membranes phospholipidiques (interne et externe) est appelé espace périplasmique qui joue un rôle dans le passage de protéines du cytoplasme vers la membrane extérieure. L'adhésion des bactéries va varier en fonction des propriétés physicochimiques des différentes souches bactériennes ou encore de leur condition de croissance. La présence d'un flagelle va faciliter l'attachement de bactéries Gram (-) sur des surfaces [21]. D'autres études ont également montré un attachement important des *fimbriae* (pili de petite taille) sur des surfaces [22].

I.2.2.3 Structure de surface de la bactérie

En plus d'être hétérogène, la structure de la surface des bactéries peut profondément être modifiée en réponse à des changements de leur environnement. La présence d'exopolysaccharides (EPS) en surface joue un rôle important sur l'étendue de l'adhésion des microorganismes. Long et coll. [23] ont montré que l'absence d'EPS diminue le dépôt cellulaire indépendamment du type de bactéries et de leur motilité. La présence d'éléments externes dans l'environnement tels que des sels ont également montré une influence dans l'adhésion et la formation de biofilms [24].

I.2.2.4 La charge de surface des bactéries:

Les bactéries acquièrent une charge de surface due à l'ionisation des fonctions acides et basiques des groupements contenus dans leurs membranes. En effet, en milieu aqueux les bactéries ont généralement une charge nette négative au niveau de leur

membrane cellulaire à pH neutre. Toutefois, la charge peut changer d'une espèce à l'autre en fonction de la force ionique, du pH et de la structure de la surface de la bactérie. Subramani et coll. [25] ont montré que les bactéries dont les membranes possèdent une électronégativité élevée adhèrent faiblement aux surfaces.

I.2.3 Les infections associées aux biofilms et leur tolérance aux antibiotiques

Les biofilms sont présents dans tous les environnements naturels. Certains peuvent exercer des effets bénéfiques, par exemple au travers de la symbiose végétal/bactérie ou au cours de la dégradation de la matière organique [26]. Leur implication en pathologie humaine n'a été démontrée qu'à partir de la fin des années 1970 [27]. Depuis, le nombre d'infections humaines associées aux biofilms ne cesse de croître, du fait de leur tolérance aux antibiotiques constituant un des problèmes majeurs en médecine humaine.

I.2.3.1 Les infections associées aux biofilms

A la fin des années 1970, plusieurs équipes scientifiques ont mis en évidence dans des sécrétions de patients atteints de mucoviscidose et colonisés par la bactérie *Pseudomonas aeruginosa*, la présence d'agrégats bactériens denses et enrobés d'une matrice extracellulaire [28]. Quelques années plus tard, l'analyse en microscopie électronique d'une sonde de stimulateur cardiaque extraite en raison de bactériémies récidivantes à *Staphylococcus aureus* a permis d'authentifier, pour la première fois, la présence de biofilms à la surface d'un dispositif implanté. Ces travaux ont permis de délimiter le cadre des infections associées au biofilm et de les subdiviser en deux groupes : les infections liées à un dispositif implanté et les infections survenant sur tissu natif, le plus souvent au contact d'une muqueuse. Le nombre d'infections au cours desquelles un biofilm a été identifié est en constante augmentation et tous les dispositifs médicaux implantés sont concernés par cette complication [29].

I.2.3.2 Tolérance des biofilms aux antibiotiques

Le principal mécanisme évoqué pour expliquer la tolérance des biofilms est la réduction de la diffusion des antibiotiques au travers de la matrice extracellulaire [30].

Par la suite, d'autres mécanismes ont été identifiés pour expliquer ce phénomène de résistance aux antibiotiques (**Figure I:3**).

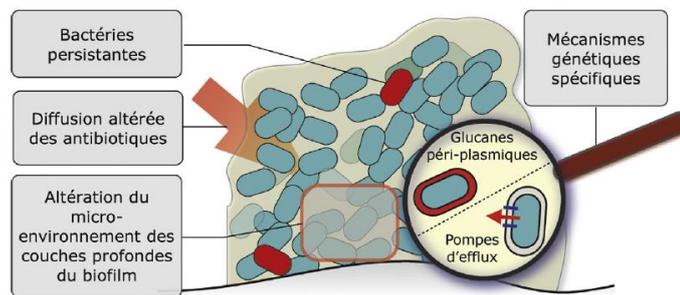


Figure I:3 Hypothèses expliquant le phénomène de tolérance du biofilm vis-à-vis des antibiotiques [29].

I.2.3.2.1 Diffusion altérée des antibiotiques

La visualisation de biofilms en microscopie a conduit assez rapidement à imaginer que la matrice extracellulaire enrobant les biofilms pouvait jouer un rôle dans leur tolérance aux antibiotiques. De nombreux travaux *in vitro* ont en effet démontré que les propriétés mécaniques ou physico-chimiques de la matrice extracellulaire pouvaient réduire ou ralentir la diffusion de multiples molécules, y compris les antibiotiques ou les antiseptiques. Par exemple, les antibiotiques chargés positivement comme les aminosides peuvent être adsorbés par les polymères de la matrice du fait de leur charge négative et ainsi mal diffuser [31].

I.2.3.2.2 Altération du microenvironnement

La matrice extracellulaire des biofilms peut ralentir la diffusion de nombreuses molécules et ainsi permettre la formation de gradients de concentration. La disponibilité en oxygène et la concentration en nutriments décroissent à mesure que l'on s'éloigne de la zone d'interface avec le milieu extérieur au biofilm. Par ailleurs, les différents déchets produits par les bactéries vont diffuser et être en concentration croissante depuis l'intérieur du biofilm vers la zone d'interface avec le milieu. Ainsi, les couches profondes du biofilm sont caractérisées par une carence en oxygène et en nutriment, une accumulation de déchets, et un pH acide [32]. Ces conditions sont défavorables à l'action de certains antibiotiques. Du fait de la carence nutritionnelle, les bactéries des couches

profondes ne se multiplient pas et sont donc peu sensibles par exemple à l'action des β -lactames [33]. De plus, les variations de pH et la diminution de la quantité d'oxygène au sein du biofilm sont défavorables à l'action des aminosides [34].

1.2.3.2.3 Les mécanismes génétiques spécifiques

La tolérance des biofilms aux antibiotiques est dite « phénotypique », car elle disparaît en grande partie après la remise en suspension des bactéries du biofilm. Il ne s'agit donc pas de mécanismes de résistance héréditaires d'une bactérie mère à une bactérie fille. Des études ont été menées pour la recherche de gènes induits lors de la formation du biofilm, conduisant à la mise en place de mécanismes de survie des bactéries présents dans un biofilm au cours d'une antibiothérapie. Ceux-ci ont mis en évidence des gènes qui codent des polysaccharides tels que les glucanes qui vont s'accumuler dans le périplasma des bactéries (*E. coli* ou *P. aeruginosa* par exemple) et séquestrer l'entrée d'antibiotiques comme les aminoglycosides (kanamycine,...) [35].

1.2.3.2.4 Les bactéries persistantes

Malgré la bonne diffusion de certains antibiotiques et leur action biocide contre les bactéries, il est difficile d'éradiquer la totalité des bactéries d'un biofilm [36]. En effet, une petite fraction de bactéries appelée « bactéries persistantes » ne sont pas tuées. La persistance correspond à un état de dormance qui permet aux bactéries persistantes d'être insensibles à l'action des antibiotiques [37]. La persistance étant réversible, les bactéries persistantes peuvent revenir à un état physiologique normal une fois le traitement antibiotique terminé. Ces bactéries auront la capacité de générer de nouvelles infections. Le phénomène de persistance rend les infections chroniques très difficiles à soigner et il n'existe aujourd'hui aucun moyen thérapeutique pour éradiquer les cellules persistantes.

Au final, les biofilms sont responsables de nombreuses résistances aux traitements conventionnels, favorisant leur prolifération et une pathogénicité accrue. C'est dans le but d'éliminer ou de réduire substantiellement leur prolifération que des efforts ont été réalisés pour la fabrication de nouvelles surfaces antimicrobiennes.

De récents travaux ont permis l'élaboration de biomatériaux antimicrobiens qui s'avèrent être une alternative prometteuse dans la lutte contre ces biofilms. Ils peuvent être utilisés dans des secteurs d'activités très variés tels que les hôpitaux, les industries alimentaires et textiles mais aussi dans le traitement des eaux et de l'air. Parmi ces molécules actives, on cite les ammoniums quaternaires, les N-halamines, le chitosan et certains métaux.

I.3 Les matériaux antibactériens supportés

En dépit des récents progrès dans le développement des nanobiotechnologies et des techniques de nanofabrication, la mise en œuvre de nouvelles surfaces antibactériennes, reste une priorité de la recherche [38,39]. Une très grande variété de concepts et d'approches ont été développées pour arriver à des biomatériaux dotés de propriétés antimicrobiennes [40]. On retrouve notamment des surfaces antiadhésives, des matériaux à base de motifs dotés d'une bioactivité intrinsèque, ceux obtenus par revêtement de substances actives ; des biomatériaux à libération contrôlée de principes actifs ; des biomatériaux nanostructurés ainsi que des biomatériaux interférant avec la formation de biofilms.

- Les surfaces antiadhésives :

Les surfaces antiadhésives sont des surfaces généralement inertes présentant l'avantage de limiter l'adhésion bactérienne en évitant les étapes ultérieures de colonisation. Elles sont d'origine très variée et peuvent être notamment obtenues par différentes approches de modifications chimiques en surface des biomatériaux. Elles peuvent être mises au point par monocouches auto-assemblées, par revêtement de polymères et d'hydrogels ou par le greffage de polymères zwitterioniques en surface. Une pré-adsorption de molécules connues pour accroître l'hydrophobicité ou entrer en compétition avec les adhésines bactériennes peut influencer le comportement bactérien et engendrer une faible adhésion de l'agent pathogène. Les propriétés physico-chimiques et fonctionnelles des groupements en surface des biomatériaux interagissent avec ceux des cellules bactériennes qui déterminent la cinétique de l'adhésion bactérienne [41].

- Matériaux bioactifs intrinsèques

Des matériaux exerçant une action antibactérienne en l'absence de modifications chimiques telles que l'insertion de substances ou le revêtement bactéricide par des molécules actives sont généralement décrits comme étant bioactifs intrinsèques. De nombreuses substances sont connues pour posséder des propriétés bactéricides. Parmi celles-ci, on retrouve notamment plusieurs métaux (argent, zinc, cuivre,...), des matériaux polymères (chitosan et ses dérivés) et divers verres bioactifs. Dans le cas des métaux, le mécanisme impliqué dans l'activité bactéricide est loin d'être entièrement connu et différents modes d'action ont été décrits dans la littérature. Pour certains métaux, l'activité antimicrobienne est associée à la forme ionique plutôt qu'à celle du métal élémentaire. Par exemple, l'argent va inactiver les enzymes essentielles à l'appareil respiratoire bactérien dont la succinate déshydrogénase par une liaison de l'argent aux groupements thiols menant à l'induction de radicaux hydroxyyles [42].

- Revêtement antibactériens

Les matériaux obtenus par revêtement de molécules bioactives ont été développés dans le but de conférer de nouvelles propriétés antimicrobiennes à la surface des tissus/biomatériaux. La conception de ces matériaux résulte de diverses stratégies. Elle peut consister en :

- un dépôt de polymères portant des groupements fonctionnels actifs (amines tertiaires, N-halamines) ;
- un dépôt de polymères permettant un relargage de molécules bactéricides (monoxyde d'azote) ou d'espèces réactives de l'oxygène ;
- un revêtement des biomatériaux par des motifs permettant une activité bactéricide photo-induite ou au dépôt d'une ou plusieurs couches de molécules organiques ou inorganiques devant être libérée au cours de leur utilisation [40].
- un greffage en surface de molécules antimicrobiennes connues (chlorhexidine, chlorure de benzalkonium, triclosan).



- Biomatériaux à libération contrôlée de molécules actives

Ce sont des matériaux obtenus par incorporation de substances antimicrobiennes au sein d'un biomatériau et qui permettent une libération contrôlée de l'agent actif. Ces actifs peuvent être : soit intégrés aux matériaux durant la phase de production, menant à une adsorption de manière covalente à l'intérieur des biomatériaux perméables ou poreux, soit sous forme moléculaire ou de petites particules incorporées dans un auto-assemblage de revêtement de monocouches organiques. La libération de ces molécules peut se faire suivant divers modes : (i) par diffusion des actifs dans la phase aqueuse, (ii) par érosion/dégradation des matrices chargées se résorbant progressivement, (iii) par hydrolyse des liaisons covalentes. De nombreux travaux ont mis au point des systèmes avec des cinétiques de libération du principe actif en fonction de la stabilité des liaisons moléculaires ou de la vitesse de biodégradation/bioérosion des matrices piégeant l'antimicrobien [40].

- Biomatériaux nanostructurés actifs

Actuellement, les récentes avancées dans l'utilisation des nanotechnologies ont permis l'élaboration de matériaux nanostructurés, qui ont montré des propriétés antibactériennes et qui pourrait trouver une application dans la fabrication de biomatériaux antimicrobiens. Des travaux ont décrit la possibilité de mettre au point des surfaces super-hydrophobes ou des surfaces antisalissures en agissant sur la nanotopologie du biomatériau. Ce qui réduit ainsi la surface disponible aux bactéries pour adhérer. Les plus utilisées dans ce domaines sont les nanoparticules (NP) de forme régulière (nanotubes) ou irrégulière et de taille inférieure à 100 nm. Certains oxydes de métaux et nanoparticules à base de métaux ont montré une forte activité bactéricide [43]. Les mécanismes impliqués dans l'activité de ces NP sont la production d'espèces réactives de l'oxygène (ROS) et l'altération de la membrane cellulaire des bactéries. Néanmoins, une inquiétude se pose toujours quant à la toxicité de tels matériaux. En effet, des études montrent la capacité des nanoparticules (nanoparticule de titane

TiO₂,...) à franchir les barrières physiologiques entraînant une bioaccumulation dans le corps (Figure I:4).

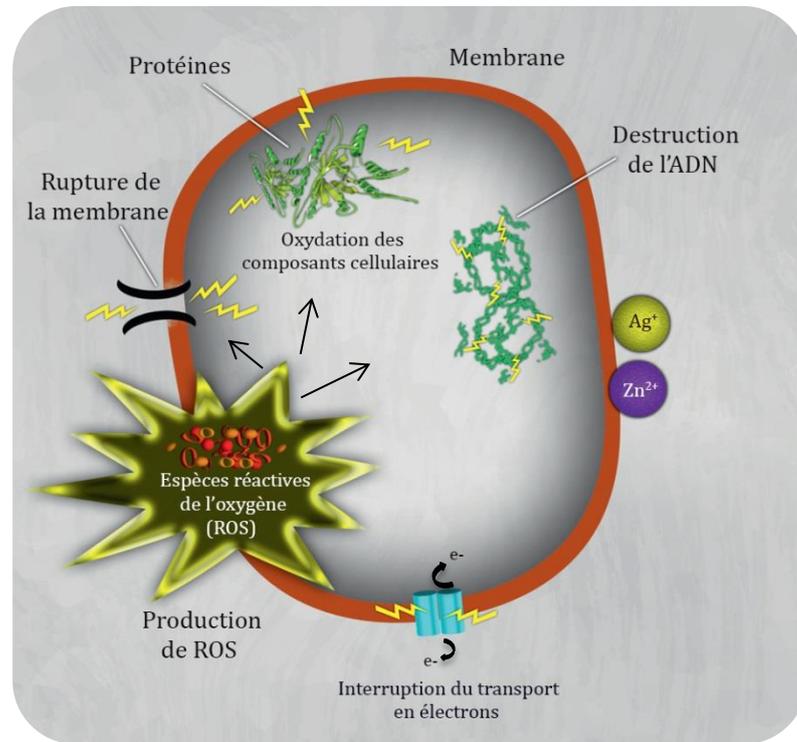


Figure I:4 Mécanismes de toxicité des nanoparticules(NP) contre les bactéries [43]

- Molécules bioactives interférant avec la formation de biofilms

Les progrès dans la connaissance des mécanismes moléculaires impliqués dans la physiologie de la formation des biofilms de différentes espèces bactériennes a récemment permis de mettre au point de nouvelles approches limitant l'adhésion des bactéries à la surface des biomatériaux. Un large éventail de substances possédant une activité antibiofilm a été effectivement caractérisé [44]. Elles peuvent être soit greffées sur des surfaces de biomatériaux ou libérées après dépôt. Ces substances actives incluent des molécules avec des modes d'actions différents : des enzymes capables de dégrader sélectivement des EPS du biofilm (Dispersin B, ADNrh I) ; des molécules bactéricides capables de tuer même des cellules bactériennes métaboliquement actives au sein du biofilm (Lysostaphine) ; des molécules interférant avec le *Quorum sensing* bactérien, induisant ainsi la dispersion du biofilm (Furanone) ; des molécules empêchant l'expression du gène responsable de la synthèse des EPS (*N*-acétylcystéine).

De plus, il a été décrit l'élaboration de biomatériaux qui consiste en la fixation d'agents antimicrobiens conventionnels suivant des procédés différents.

I.3.1 Les ammoniums quaternaires

Les sels d'ammonium quaternaires (QAS) sont des cations polyatomiques dérivés de l'ammoniac ayant pour structure R_4N^+ , où R est un groupement alkyle ou aryle (**Schéma I:1**). Il en existe à courtes et à longues chaînes.

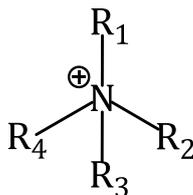


Schéma I:1 Structure d'un ammonium quaternaire

Les groupements ammonium quaternaires ont une importante activité antimicrobienne. Ils se révèlent même efficaces contre des bactéries résistantes à d'autres agents antibactériens cationiques.

En effet, l'activité antibactérienne d'un ammonium quaternaire à courtes chaînes alkyle résulte d'une interaction favorisée entre la charge positive du groupe ammonium et la membrane cellulaire des bactéries chargées négativement. Cela conduit à la perturbation de la fonction de cette membrane cellulaire, la rupture d'équilibre des ions essentiels (H^+ , Na^+ , Mg^{2+} , Cl^- , Fe^{3+}), la perturbation de l'activité des protéines et l'endommagement du matériel génétique bactérien. Les ammoniums quaternaires à longues chaînes alkyle peuvent avoir une activité supplémentaire due à leur insertion dans la membrane, entraînant une perturbation physique [45]. Des données de la littérature ont montré qu'il est possible d'exploiter l'activité biocide de ces structures en les fixant sur des surfaces sans que leur action ne soit réduite. Poveronov et coll. [46] ont fixé un ammonium quaternaire sur de l'alcool polyvinylique (PVA) et le verre par des liaisons covalentes directes.

Le PVA est un polymère largement utilisé dans les domaines de la médecine, de l'industrie et de l'emballage alimentaire. La modification de ce polymère a été effectuée en solution aqueuse (**Schéma I:2**).

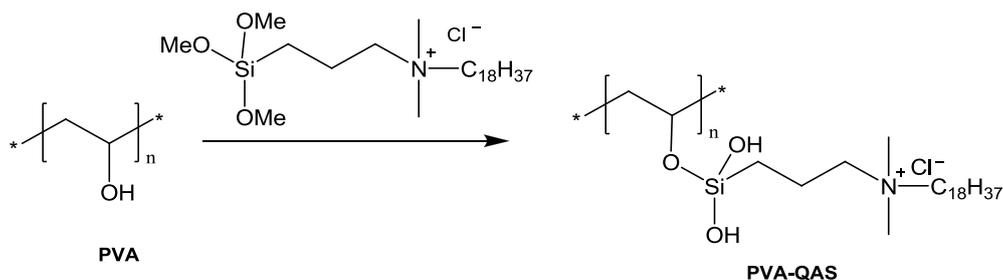


Schéma I:2 Synthèse du support PVA-QAS

Les tests microbiologiques effectués sur *Staphylococcus aureus* et *Escherichia coli* révèlent que le matériau obtenu (PVA-QAS) présente une activité antibactérienne très importante. Après 60 min de contact, il y a inactivation totale des cellules de *S. aureus* et 80 % des cellules d'*E. coli*, sachant que le PVA seul ne présente aucune activité.

Pour le verre, le même principe de fixation a été effectué, mais l'activité antibactérienne était plus faible, vu qu'après 60 min de contact, 60 % de cellules de *S.aureus* ont été détruites contre 40 % de celles d'*E. coli*.

Un autre type de support a été utilisé par Liu et coll. [47]. Ces derniers ont fixé des sels d'ammoniums quaternaires (QAS) contenant une fonction époxyde, sur la gélatine (Schéma I:3).

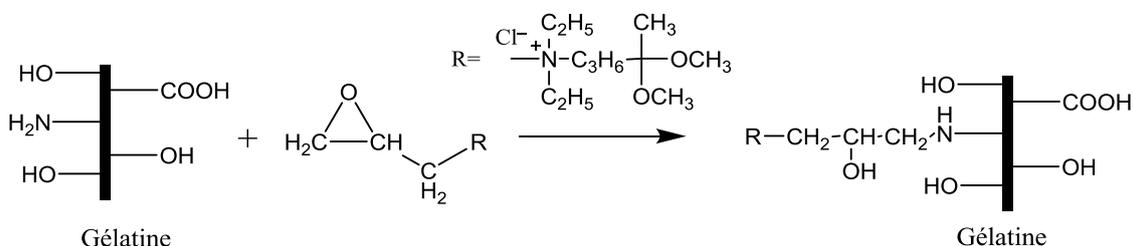


Schéma I:3 Synthèse du support gélatine-QAS

Le support obtenu présente une activité antibactérienne significative avec des zones d'inhibition importante et une inhibition de croissance des bactéries Gram (+) légèrement supérieure à celles des bactéries Gram (-).

I.3.2 Les N-Halamines

Les N-Halamines sont des composés formés par N-chloration d'amide, amine ou imide, et qui présentent une activité antibactérienne excellente et rapide contre un large

spectre de microorganismes. Leur action est due à la présence d'un halogène oxydant qui peut être transféré directement à la membrane cellulaire des microorganismes, puis les inactiver [48]. Des données de la littérature ont montré que les N-Halamines peuvent être fixés sur plusieurs types de surfaces telles que le coton, le nylon, les gels de silice et les peintures. Leur immobilisation ne limite pas leur activité antibactérienne. Les supports ainsi obtenus sont rechargeables, et reprennent leur activité après chaque halogénéation.

Liu et coll. [48] ont réalisé le dépôt d'une N-halamine, la 5,5-diméthyle-3-(3'-triéthoxysilylpropyl)hydantoïne (SPH) (**Figure 1:5**), sur du coton. Après obtention du matériau, celui-ci subit une étape de chloration avec une solution d'hypochlorite de sodium à 5 % (eau de javel).

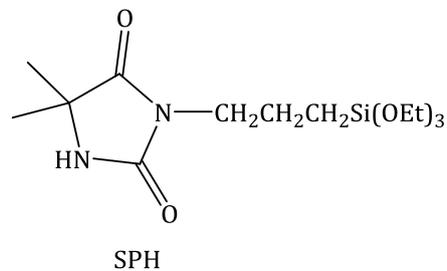


Figure 1:5 Structure de la 5,5-diméthyle-3-(3'-triéthoxysilylpropyl)hydantoïne

Le matériau a une activité antibactérienne conséquente vis-à-vis des bactéries Gram (+) et Gram (-) vu qu'après 30 min de contact toutes les bactéries ont été détruites.

Cette équipe s'est également intéressée à la fixation de deux molécules actives, l'halamine précédente (SPH) et un sel d'ammonium quaternaire, le chlorure de 3-(triméthoxysilylpropyl)octadecyldiméthylammonium (SPODA) (**Figure:6**) sur du coton dans l'objectif de comparer l'effet du matériau avec la combinaison des deux molécules actives à celui comprenant uniquement l'halamine.

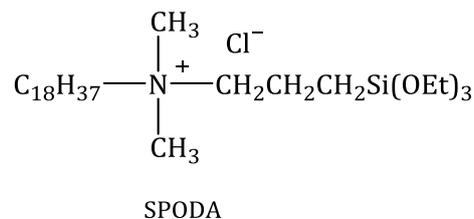


Figure:6 Structure du chlorure de 3-(triméthoxysilylpropyl)octadecyldiméthyl ammonium (SPODA)

Le revêtement de ce mélange améliore l'efficacité bactéricide du support puisque le « Cotton – SPH-SPODA » inhibe toutes les bactéries après 10 min de contact.

Liu et coll. [49] ont greffé une molécule qui contient à la fois un groupement ammonium quaternaire et un précurseur de N-Halamine, le chlorure de (3-acrylamidopropyl) triméthylammonium (**Figure I:7**) sur le coton par polymérisation radicalaire.

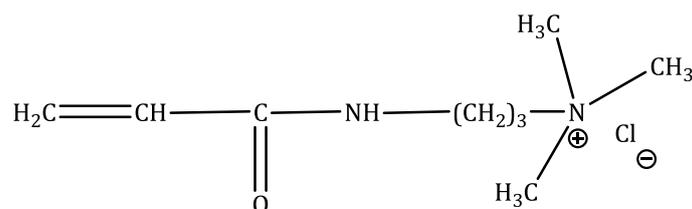


Figure I:7 Structure du chlorure de 3-(acrylamidopropyl) triméthylammonium

Après chloration du coton greffé, ce dernier montre une efficacité antimicrobienne très importante contre des bactéries Gram (+) et Gram (-). Après 5 min de contact, 100 % des bactéries sont éradiquées. Les échantillons non chlorés ne présentent pas une efficacité biocide importante, cela montre que les ammoniums quaternaires sont moins actifs que les N-Halamines. La présence d'un groupement QAS prolonge la durée de conservation du matériau car même si tous les chlores de N-Halamine ont réagi il reste encore une capacité antibactérienne contre les bactéries Gram (+) due aux sites ammonium.

I.3.3 Le chitosane

Le chitosane est un polysaccharide constitué de la distribution aléatoire d'unités D-glucosamine et d'unités N-acétyl-D-glucosamine liées entre elles par des liaisons β -(1,4) (**Figure I:8**). Il est obtenu par désacétylation chimique ou enzymatique de la chitine, qui est un composant présent dans la carapace des crustacés et des mollusques ainsi que dans certains champignons [50].

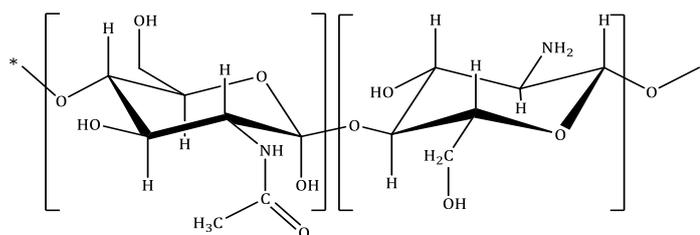


Figure 1:8 Structure du chitosane

Le chitosane et ses dérivés ont un large spectre d'activité biologique, notamment une activité bactéricide. En effet, le chitosane favorise l'agrégation des cellules bactériennes et la désorganisation de la paroi cellulaire ainsi que de la membrane plasmique. Cela conduit à la perte des fluides et des organites contenus dans les cellules. Ces changements structuraux peuvent entraîner la mort cellulaire selon les souches bactériennes examinées.

Ferrero et coll. [51] décrivent l'utilisation du chitosane solubilisé dans de l'acide acétique, sur de la gaze, qui est un tissu en coton très léger et transparent composé de fibres de cellulose. Des tests antibactériens ont été effectués sur *S. aureus* puis sur deux bactéries Gram (-), *E. coli* et *Klebsiella pneumoniae*. Dans un premier temps, des tests sont effectués en milieu acide, dans une gamme de pH comprise entre 3 et 6, la charge positive à la surface du support augmente grâce à la protonation des fonctions amine du chitosane. Cela induit un renforcement des interactions électrostatiques entre le chitosane et les microorganismes alors qu'à pH plus élevé, il n'y a pas de protonation, par conséquent son activité antibactérienne est nulle.

Dans un second temps, des tests sur le matériau obtenu sont réalisés en flux continu d'effluents. En 4 secondes de contact seulement, le matériau élimine la totalité de *S. aureus* et 80 % de *K. pneumoniae* et après 8 secondes, la charge en *K. pneumoniae* est réduite de 98 %. Dans tous les cas, l'inhibition des souches bactériennes ne descend pas en dessous de 80 % et est très rapide dans le second cas. La gaze traitée avec le chitosane a une activité antibactérienne efficace et représente donc une application intéressante comme filtre pour la désinfection biologique de l'eau.

Par ailleurs, Cooper et coll. [52] ont développé des membranes nanofibreuses de polycaprolactone (PCL) à base de chitosane afin d'utiliser les propriétés antibactériennes de ce dernier pour une application en tant que pré-filtre pour l'eau ;

dans le but d'améliorer l'efficacité et la sécurité de la filtration ultérieure. La polycaprolactone est un polyester biodégradable préparé par réaction de polymérisation, par ouverture de cycle de l' ϵ -caprolactone en utilisant un catalyseur [53]. Ces membranes fibreuses à base de chitosane ont été synthétisées sans réticulation chimique, par un procédé d'électrofilage.

Des tests antibactériens réalisés sur *S. aureus* ont montré que le matériau chitosane-PCL contenant 25 % de chitosane présente une importante activité antibactérienne (95 %).

1.3.4 Les polybiguanides

Les polybiguanides sont des amines polycationiques qui comprennent plusieurs unités répétitives de biguanides cationiques séparées par des chaînes d'hexaméthylène. Ces chaînes jouent un rôle de liaison et peuvent être de longueur identique ou différente entre deux biguanides. Parmi les plus importants agents antibactériens de ce type, on retrouve le chlorhydrate de polyhexaméthylène biguanide (PHMB, **Figure I:9**).

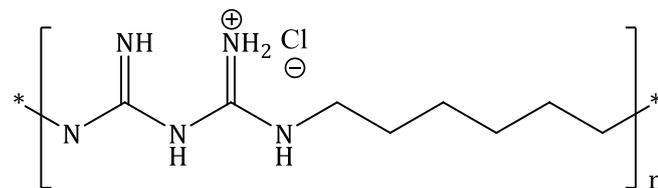


Figure I:9 Structure du chlorhydrate de polyhexaméthylène biguanide

Le PHMB est communément utilisé en médecine en tant qu'agent antiseptique pour prévenir l'infection des plaies par des bactéries résistantes aux antibiotiques. C'est une molécule antimicrobienne à large spectre d'action qui cible les parois bactériennes en interagissant progressivement avec les composants acides de la membrane plasmique. Cela entraîne une perte totale de la fluidité membranaire. En effet, selon Gilbert et coll. [54], l'action du PHMB se décompose en plusieurs phases :

- la liaison du PHMB aux parois bactériennes chargées négativement et l'adsorption spécifique aux composés contenant des phosphates;
- la déstabilisation de l'intégrité membranaire avec une attraction de la molécule vers la membrane interne ;

- la liaison aux phospholipides membranaires avec augmentation de la perméabilité membranaire et fuite des ions K^+ ;
- la perte totale des fonctions membranaires et la précipitation des constituants intracellulaires entraînant la mort cellulaire.

En raison de la forte activité biocide et la faible toxicité du PHMB, de nombreuses recherches ont montré un intérêt à les utiliser pour l'élaboration de textiles antimicrobiens [55].

En effet, Blackburn et coll. [56] ont montré que le PHMB peut se lier à des groupements carboxyliques ionisés sur la cellulose. A de faibles concentrations, les interactions électrostatiques entre le PHMB et ces groupements carboxyliques ionisés sont importantes. De plus, les liaisons hydrogènes entre le PHMB et la cellulose entraînent une adsorption multicouche qui croît avec l'augmentation de la concentration en PHMB. Cette adsorption multicouche du PHMB sur la cellulose est attribuée aux interactions électrostatiques de la cellulose avec le contre-ion et les liaisons hydrogène des groupes biguanides. Par ailleurs, Li et coll. [57] ont décrit le greffage d'une autre polybiguanide, le chlorhydrate de polyhexaméthylènediamine biguanide (PHMG, **Figure I:10**), par des liaisons chimiques covalentes sur une matrice de polypropylène (PP) suivant le procédé du CO_2 supercritique (**Schéma I:4**).

.

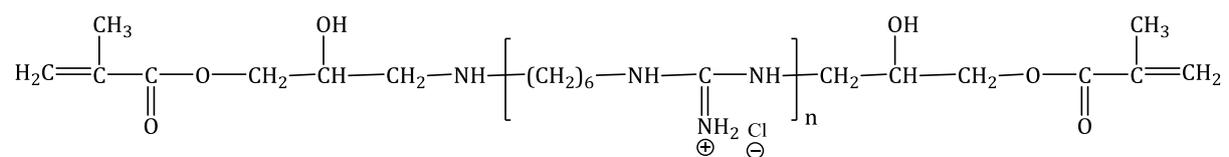


Figure I:10 Structure moléculaire du chlorhydrate de polyhexaméthylènediamine biguanide

Du fait de son fort taux de greffage, le PHMG est dispersé sans agrégat dans la matrice de polypropylène (PP), ce qui a pour effet d'augmenter l'activité antimicrobienne.

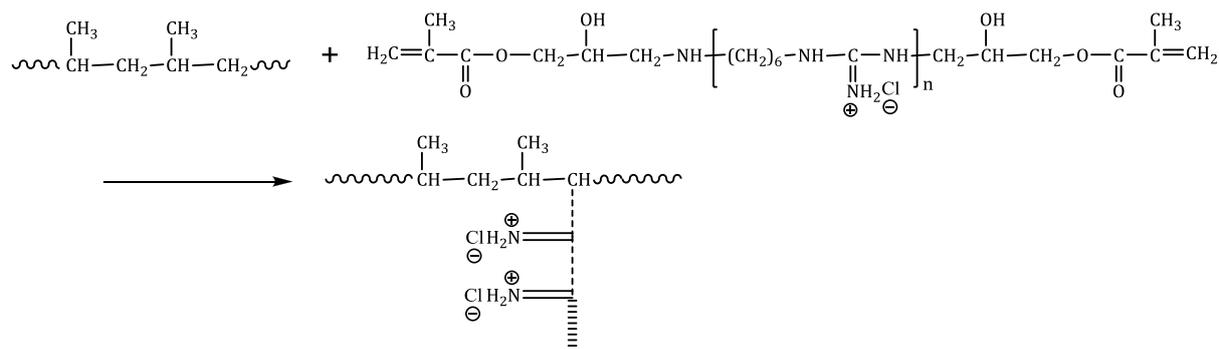


Schéma I:4 Formation du PHMG-PP

En effet, le matériau PHMG a montré une activité antimicrobienne rapide et efficace contre *E. coli* et de *S. aureus* avec une inactivation de 98 % en seulement 10 min de contact.

I.3.5 Les métaux

Certains métaux sont connus pour leurs propriétés antibactériennes comme le cuivre, le cobalt, le zinc, le titane et plus particulièrement l'argent dont les propriétés sont connues depuis l'Antiquité. L'effet antimicrobien des métaux lourds à partir de certaines concentrations semble dû à l'inactivation de l'activité d'enzymes. En effet, Liu et coll. [58] ont élaboré deux nanocomposites avec des nanoparticules d'argent et des nanoparticules de silice. Les nanoparticules de dioxyde de titane, d'oxyde de cuivre et d'oxyde d'argent présentent une activité bactéricide. L'argent a été largement employé pour combattre les infections. Son activité est le résultat de l'interaction entre les ions Ag^+ et trois constituants de la cellule bactérienne: le peptidoglycane, l'ADN bactérien et des enzymes bactériennes. Ces nanoparticules d'argent sont incorporées dans la paroi causant la fuite des substances intracellulaires et éventuellement la mort cellulaire. L'activité antibactérienne des nanoparticules d'argent augmente lorsque leur taille diminue.

Dhanalekshmi et coll. [59] ont préparé des matériaux désinfectants inorganiques tels que des nanoparticules à base d'oxyde de métaux: le dioxyde de titane (TiO_2) et le dioxyde de silicium (SiO_2) qui sont très stables chimiquement, non toxiques et qui permettent une excellente dégradation des polluants organiques. L'évaluation

antibactérienne des matériaux obtenus Ag-TiO₂ et Ag-SiO₂ sur *E. coli* et *S. aureus* montre que ces matériaux sont actifs et que pour une même concentration de nanoparticules, Ag-SiO₂ a une activité plus élevée que celle de Ag-TiO₂. L'effet antibactérien augmente lorsque la concentration des nanoparticules augmente et est plus grand sur *E. coli* que sur *S. aureus* du fait des diversités structurales de leurs membranes.

Par ailleurs, Petkova et coll. [60] ont fabriqué des tissus en coton hybride en déposant des nanoparticules d'oxyde de zinc (NP ZnO) et du chitosane, par sonochimie. Le mécanisme de l'action des NP ZnO implique la dissolution de l'oxyde de zinc pour donner des ions Zn²⁺, associés à un stress oxydatif dans les cellules bactériennes et à la libération d'espèces réactives de l'oxygène. Ces dernières causent l'inhibition de l'activité d'enzymes bactériennes conduisant à la mort cellulaire. Des tests ont été réalisés sur *S. aureus* et *E. coli*. La présence de chitosane améliore l'effet antibactérien des tissus de coton sur les deux souches bactériennes étudiées indépendamment de la concentration en zinc dans le complexe ZnO-chitosane. Le tissu hybride conduit à une réduction de 98 % de la croissance bactérienne de *S. aureus* après 60 min de contact tandis que ZnO et le chitosane pris séparément réduisent la croissance bactérienne de 61 % et 31 %, respectivement. Les tissus hybrides réduisent la croissance bactérienne d'*E. coli* de plus de 96 % après 15 min de contact. Presque la totalité des bactéries sont tuées après un contact de 60 min avec les tissus hybrides. La présence de chitosane permet d'améliorer la biocompatibilité de ZnO, ce qui évite les effets négatifs sur la santé humaine. Les tissus élaborés lors de cette étude peuvent être utilisés en milieu hospitalier afin de prévenir la propagation des bactéries responsables d'infections nosocomiales.

II. OBJET DU TRAVAIL

Dans un souci de répondre aux problèmes de prolifération bactérienne, et des contaminations des surfaces, le présent projet porte sur le développement de nouveaux matériaux lignocellulosiques bioactifs, par un greffage covalent de molécules antimicrobiennes. L'objectif est de démontrer leur capacité à limiter la dissémination, voire empêcher la croissance de germes de l'environnement.

Nous nous sommes intéressés au greffage de diverses molécules sur un support cellulosique, la pâte à papier. Notre choix s'est porté sur un antimicrobien connu, le triclosan puis sur des molécules largement étudiées au sein du Laboratoire de Chimie des Substances Naturelles, les porphyrines. Enfin, nous avons fixés des molécules aromatiques qui n'acquièrent leur potentiel antimicrobien qu'après greffage sur le support *via* le lien triazole.

Le greffage de ces molécules est réalisé par réaction de cycloaddition 1,3-dipolaire de Huisgen (Click chemistry). (**Figure II:1**)

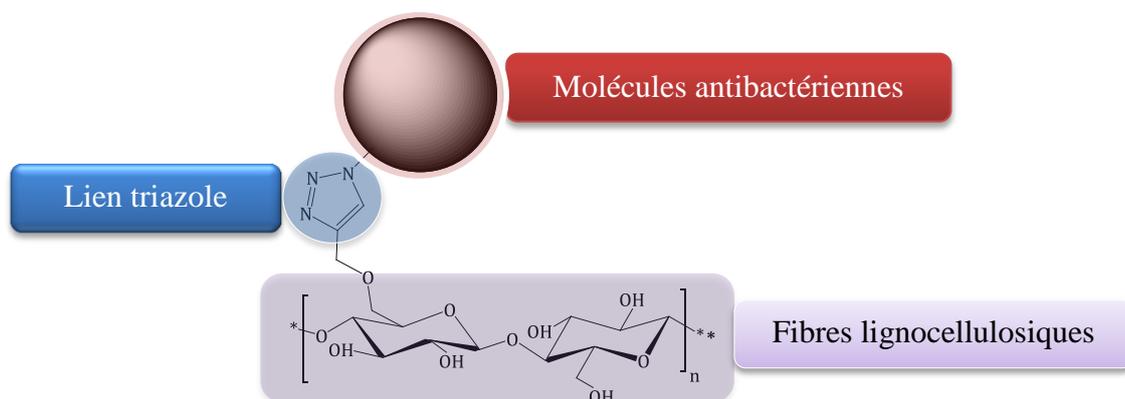


Figure II:1 Schéma général de greffage des molécules sur la pâte Kraft

La réaction de « Click chemistry » entraîne la formation d'un lien triazole entre la molécule active et le support. Ce lien est issu d'une réaction de cycloaddition entre un azoture et un alcyne terminal, catalysée par le cuivre (I). (**Schéma II:1**). Cette réaction est caractérisée non seulement par sa simplicité de mise en œuvre mais également par sa fiabilité et sa compatibilité avec certains principes de chimie verte. Le lien triazole présente une relative résistance aux hydrolyses acide et basique mais aussi aux

conditions réductrices et oxydantes. C'est un lien également résistant à toute dégradation métabolique et ne pose pas de problèmes particuliers de toxicité [61].

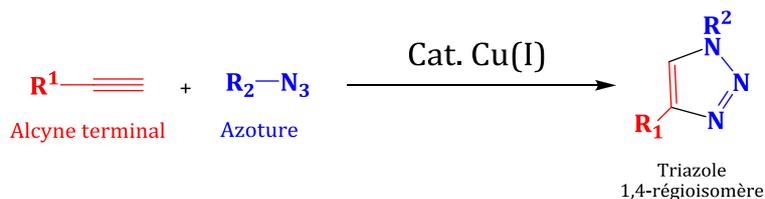


Schéma II:1 Schéma général de la réaction de Click chemistry

Le choix de la pâte Kraft est basé sur son abondance, sa biodégradabilité. Elle est également facilement modifiable et adaptée à plusieurs utilisations.

Cette liaison covalente, permet d'augmenter la durabilité du matériau obtenu et le papier antibactérien ainsi synthétisé peut être utilisé comme filtre à air, filtre à effluents ou encore comme emballage actif dans le secteur agroalimentaire.

Intérêt de la pâte Kraft

L'industrie papetière occidentale est en pleine crise financière. Les facteurs influençant cette crise sont l'augmentation du prix des matières premières et de l'énergie, ainsi que le développement des réseaux de communication. Il devient urgent de développer de nouveaux débouchés pour la production de papier. Le présent projet a pour but la valorisation de la pâte à papier par greffage de molécules antimicrobiennes formant des matériaux bioactifs. Le choix de la pâte Kraft comme support s'inscrit également dans un souci de valorisation de la biomasse.

- La pâte à papier

Les pâtes à papier sont fabriquées à partir de bois. Le bois est constitué de fibres cellulosiques, d'hémicelluloses, de lignines et d'autres produits (résines, sels minéraux, etc.). Schématiquement, la lignine sert de liant aux fibres cellulosiques et donne la solidité de l'ensemble. La préparation de la pâte à papier consiste à isoler les fibres cellulosiques contenues dans le bois, c'est-à-dire extraire les fibres et vaisseaux cellulosiques, tout en conservant le mieux possible leurs propriétés. Pour cela il existe deux voies :

- **La voie mécanique**, par cisaillement du bois qui produit la pâte mécanique; La mise en pâte mécanique donne les meilleurs rendements (90-95 %), car la composition des fibres obtenues est très proche du bois utilisé. En effet, peu de constituants du bois sont éliminés. La pâte mécanique contient les lignines et les hémicelluloses, ce qui entraîne une instabilité des caractéristiques de la pâte dans le temps, notamment son jaunissement.
- **La voie chimique** (bois des conifères ou gymnospermes) qui produit la pâte chimique. Il existe deux types de procédés chimiques : le procédé au bisulfite qui repose sur l'action du dioxyde de soufre SO_2 afin de transformer la lignine en matière soluble en milieu acide; le procédé au sulfate ou Kraft par contre a lieu en milieu basique, utilise de la soude et du sulfure de sodium pour dissoudre les lignines et une partie des hémicelluloses.
C'est cette pâte chimique, appelée également pâte Kraft, que nous avons choisie comme support au cours de cette étude.

- **La pâte Kraft** :

Le procédé Kraft est le plus utilisé pour la fabrication de pâte à papier dans le monde en raison des meilleures propriétés de résistance de la pâte obtenue, de la possibilité de son application à toutes les espèces de bois, ainsi qu'en raison de la mise en place de systèmes efficaces de récupération des produits chimiques.

Les pâtes chimiques sont obtenues avec un rendement faible (50-55 %). Elles ont une très bonne résistance mécanique et supportent beaucoup mieux le passage du temps puisqu'il n'y a pas ou peu de jaunissement dû à la lumière. Ce sont de très bons supports pour des réactions chimiques, en particulier pour leur très forte concentration en cellulose [62]. En effet, les fibres lignocellulosiques de pâte Kraft sont composées majoritairement de trois types de polymères : la cellulose, les hémicelluloses et les lignines (**Tableau II:1**). Leurs proportions varient en fonction de leur localisation dans les fibres lignocellulosiques.

Tableau II:1 Composition de la pâte Kraft

Composition	%
Lignine	3,50
Extractibles	1
Cellulose + Hémicelluloses	95,50

- La lignine

Très abondante dans les plantes, la lignine est un polymère tridimensionnel, amorphe et de nature phénolique, qui assure la rigidité de la paroi cellulaire. Dans le bois, elle est biosynthétisée à partir de trois alcools phénoliques : les alcools *p*-coumarylique, coniférylique et sinapylique.

Parmi ces composés, la cellulose présente l'avantage d'être une matière première abondante, biodégradable, peu coûteuse et offrir des propriétés physiques (matériau souple, rigide et résistant aux tractions) et chimiques intéressantes (stable thermiquement jusqu'à 250°C, matériau hydrophile).

- Les matières extractibles

Les extractibles sont des molécules qui peuvent être extraites du bois par des solvants polaires (acétone, eau, éthanol) ou apolaires (toluène, cyclohexane, dichlorométhane). La teneur et la composition de ces extractibles varient fortement d'une essence à l'autre, les résineux en contenant généralement plus que les feuillus. Il existe trois types d'extractibles : les terpénoides (myrcène, limonène, pinène...), les polyphénols (tannins condensés et hydrolysables, flavonoïdes, tropolones, stilbènes, quinones...) et les composés aliphatiques (acides gras saturés et insaturés, triglycérides, alcaloïdes...). Bien qu'ils ne représentent qu'un faible pourcentage, l'odeur, la couleur et la résistance aux agents de dégradation biologique, dépendent en grande partie de ces extraits.

- Les hémicelluloses

Les hémicelluloses sont des polyoses, dont les unités sont des pentoses, hexoses, acides hexauroniques et désoxyoses. Elles sont constituées de chaînes moléculaires courtes et par des ramifications sur la chaîne principale. En général, elles ont une



structure amorphe ; leur teneur et leur composition varient en fonction des essences. On en distingue différents types : les xylanes, les mannanes, les glucanes et les galactanes.

- La cellulose

La pâte Kraft contient plus de 85 % de cellulose, c'est sur ce polymère que nous nous baserons pour l'étude de l'élaboration de matériaux bioactifs. Pour cela nous commencerons par donner quelques généralités sur la cellulose et les supports cellulosiques antibactériens.



III. LA CELLULOSE

III.1 Structure de la cellulose

La cellulose est un homopolymère linéaire, composé uniquement de D-glucopyranose reliés par des liaisons β -1,4. L'unité répétitive, composée de deux glucoses, est appelée cellobiose. (Figure III:1)

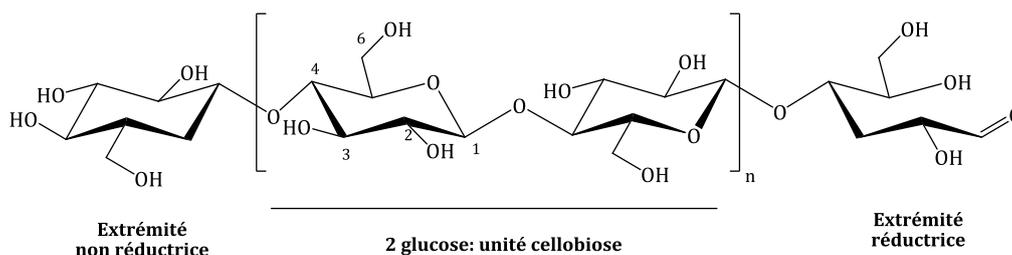


Figure III:1 Structure de la cellulose

Les deux extrémités d'une chaîne sont chimiquement différentes. L'une est appelée extrémité réductrice et correspond à l'extrémité dont la fonction alcool anomérique de l'unité anhydroglucose est libre. De ce fait, la forme hémiacétal est en équilibre avec la forme aldéhyde minoritaire. L'autre extrémité est appelée extrémité non réductrice, car le groupement hydroxyle anomérique est engagé dans une liaison osidique empêchant l'équilibre avec la forme aldéhyde. La cellulose est caractérisée par son degré de polymérisation (D.P.), autrement dit le nombre d'unités anhydroglucose qui composent la chaîne. Le D.P. varie en fonction de l'espèce végétale fournissant la cellulose et la méthode de son extraction (Tableau III:1).

Tableau III:1 Degré de polymérisation de cellulose provenant de différentes espèces végétales [63].

Espèce végétale	DP
Épicéa (épinette)	8 000
Chanvre, lin	9 000
Bouleau	10 000
Coton	20 000
Algue valonia	26 500

La cellulose forme de nombreuses liaisons hydrogènes intra- et intermoléculaire (Figure III:2).

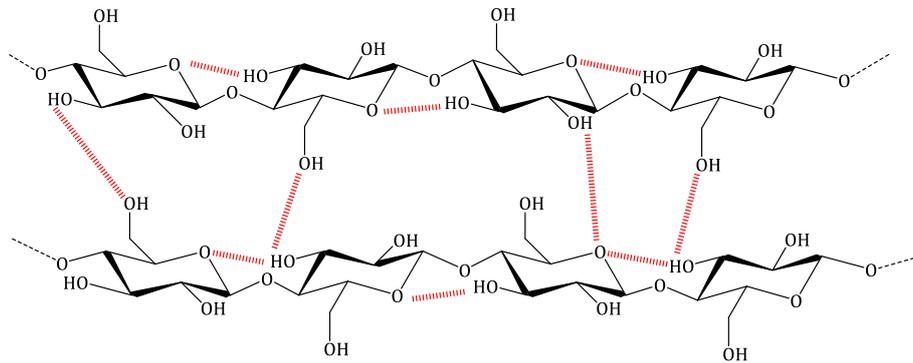


Figure III:2 Liaisons hydrogène inter- et intramoléculaires au sein de la cellulose.

Ce sont toutes ces liaisons hydrogènes qui confèrent à la cellulose ses principales propriétés, la rendant notamment insoluble dans l'eau et lui conférant sa structure fibrillaire et partiellement cristalline.

De récentes données de la littérature ont montré un intérêt quant à la valorisation de la cellulose en tant que supports antibactériens [64–66].

III.2 Supports cellulosiques antibactériens :

La recherche visant la mise au point de matériaux non vivant utilisé dans un dispositif médical encore appelés biomatériaux constitue l'un des principaux défis de la communauté scientifique pour les prochaines décennies. L'avènement de tels matériaux pourrait apporter de nombreuses solutions à des questions d'ordre international tel que l'épuisement des énergies fossiles. Il existe différentes stratégies de valorisation de la biomasse : la fragmentation de la biomasse, la production de biomonomères, les biotechnologies, etc...

Les matériaux antibactériens à base de cellulose sont par ailleurs largement utilisés dans plusieurs domaines sensibles à la contamination par des bactéries, comme les hôpitaux, l'agroalimentaire, les textiles et le traitement des eaux.

Comme nous l'avons décrit précédemment, Poverenov et coll. par exemple [46] ont fixé un ammonium quaternaire sur de la cellulose. Le support obtenu a montré une activité antibactérienne très importante.

Dans un souci de purification d'eaux usées, Dankovich et coll. [67] ont pour leur part incorporé par une méthode de préparation directe et *in situ*, des nanoparticules de cuivre (CuNPs) dans du papier, en réduisant les ions cuivres formés avec de l'acide ascorbique. Les CuNPs formés se distribuent à la surface des fibres de papier. L'activité antimicrobienne de ce papier-CuNPs a été évaluée en faisant passer des suspensions d'*E. coli* à travers celui-ci. En effet les résultats montrent une importante réduction de la croissance des bactéries, le taux de cuivre libéré dans l'effluent étant très en dessous de celui recommandé dans de l'eau du robinet (1 ppm). Kukharenko et coll. [68] ont décrit pour leur part l'élaboration d'un nouveau matériau antimicrobien constitué d'un polymère biocide, le chlorure de polyhexaméthylène guanidine (PHMG-Cl) qui a été introduit dans une matrice cellulosique poreuse (**Schéma III:3**).

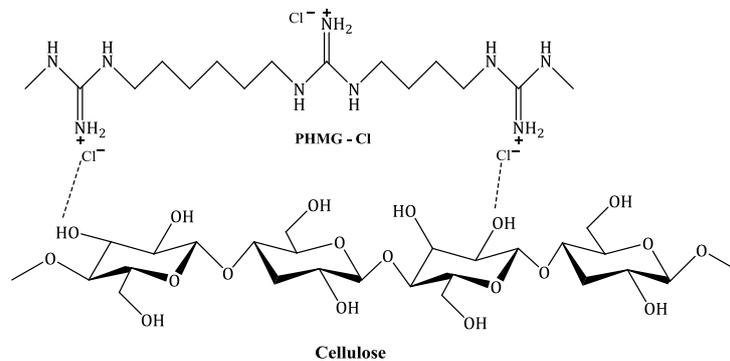


Schéma III:1 Incorporation du chlorure de polyhexaméthylène guanidine (PHMG-Cl) dans la matrice cellulosique[68]

Le matériau PHMG-Cl/Cellulose obtenu est formé d'un réseau de fibres interconnectées par les liaisons hydrogènes entre les ions chlorure du polymère biocide et les groupes hydroxyles de la cellulose. Ce PHMG-Cl/Cellulose a montré une excellente efficacité contre les souches *S. aureus* et *K. pneumonie*, les bactéries phytopatogènes *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* IMBG299 et *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* DC3000.

De plus, Samir Kamel [69], a eu recours aux fibres cellulosiques en déposant des nanoparticules d'argent (AgNP) obtenues par réduction *in situ* de nitrates d'argent sur du papier contenant des fonctions acrylamides et en présence de molécules de citrate utilisées comme agents stabilisants. L'activité antimicrobienne du papier obtenu, a montré des propriétés biocides contre des bactéries à Gram (+) telle que *S. aureus* avec

une zone d'inhibition de 13 mm de diamètre et contre des bactéries Gram (-) telles que *P. aeruginosa* et la souche de levure *Candida albicans* avec respectivement des zones d'inhibition de 14 et 16 mm de diamètre.

Deuxième partie

Elaboration de matériaux bioactifs par greffage covalent de motifs antibactériens sur des fibres lignocellulosiques





IV. ELABORATION D'UN MATERIAU BIOACTIF PAR GREFFAGE DU TRICLOSAN SUR DES FIBRES LIGNOCELLULOSIQUES-EVALUTION BIOLOGIQUE

Avant de travailler sur l'élaboration de matériaux porphyriniques, nous avons choisi de réaliser le greffage d'une molécule antimicrobienne commerciale dont l'activité biologique est connue, le triclosan. Le but de cette étude est d'évaluer si, une fois modifié et greffée de manière covalente sur support cellulosique, cette molécule conserve son activité antibactérienne. Une présentation va être dédiée aux généralités sur le triclosan.

IV.1 Le triclosan

IV.1.1 Généralités

Le 5-chloro-2-(2,4-dichlorophénoxy)phénol, mieux connu sous le nom de triclosan, est un agent antimicrobien synthétique à large spectre d'activité biologique. Il est capable de détruire ou d'empêcher la croissance d'un large éventail de microorganismes, qu'il s'agisse de bactéries, de virus ou de champignons (**Figure IV:1**). Selon les souches bactériennes, à de faibles concentrations, il est bactériostatique c'est-à-dire qu'il stoppe la croissance des microorganismes ; tandis qu'à de fortes concentrations il est bactéricide, il tue ces microorganismes [70].

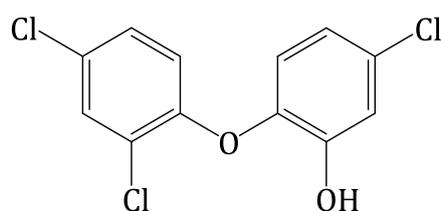


Figure IV:1 Structure chimique du triclosan (2,4,4'-trichloro-2'-hydroxy-diphényléther)

Le triclosan est utilisé depuis plus de 30 ans et son apparition en chirurgie date de 1972. Il était jusqu'alors majoritairement utilisé pour tuer les bactéries sur la peau, les matériels médicaux et d'autres surfaces, mais parfois pour préserver les produits tels que les textiles, le cuir, le papier, le plastique ou le caoutchouc de la détérioration causée par les microbes. Ces dernières années, son utilisation s'est étendue dans les produits de

consommation antibactériens, les savons, les déodorants, les dentifrices, les bains de bouches et les cosmétiques plastiques. Il est commercialisé sous le nom de Microban® pour une utilisation dans les plastiques et les vêtements et sous le nom de Biofresh® pour une utilisation dans les fibres acryliques.

Du fait de son importante utilisation, le triclosan est souvent retrouvé dans les effluents liquides et dans les réseaux d'eau destinée à la consommation. Les composés issus de sa biodégradation comme le méthyl-triclosan, très lipophiles, ont la particularité de se bioaccumuler dans les tissus adipeux des poissons et de perturber ainsi leur système endocrinien [71].

IV.1.2 Mode d'action du triclosan

Plusieurs modes d'action du triclosan ont été décrits dans la littérature. En général, le triclosan agit en bloquant le site actif de l'énoyl-acyl-carrier-protein réductase à NADH ou l'énoyl-ACP réductase (ENR) qui est une enzyme essentielle pour la synthèse des acides gras par les bactéries [72]. Une inhibition de l'activité de l'ENR impacte négativement la division cellulaire. Regös et coll. [73] ont par ailleurs rapporté qu'à faible concentration, le triclosan perturbe l'absorption des nutriments par la bactérie tandis qu'à des concentrations élevées, il provoque la fuite des composants cellulaires bactériens. Des études montrent que le triclosan possède des propriétés antiinflammatoires. Le triclosan tient son activité antiinflammatoire par sa capacité à bloquer l'action de l'interleukines-1 et bloquant ainsi la biosynthèse des prostaglandines, molécules proinflammatoires [74,75]. De récents travaux *in vitro* ont aussi indiqués que le triclosan pouvait induire des mécanismes d'apoptose c'est-à-dire la mort cellulaire programmée des cellules gingivales humaines [76].

IV.1.3 Mise au point bibliographique : Les supports antimicrobiens à base de triclosan

Au regard de sa grande activité antimicrobienne, le triclosan a ouvert la voie à de nombreux axes de valorisation concernant notamment l'élaboration de surfaces

bioactives à base de triclosan. A l'état libre, le triclosan est un produit qui, en se dégradant dans l'eau, réagit avec le chlore libre pour former du chloroforme et des produits classés cancérigènes potentiels, d'où son interdiction dans certains pays tels que le Japon et le Canada. Une fixation, par liaison covalente, du triclosan sur des surfaces évitera sa libération dans l'environnement.

Des surfaces, tels que le polyéthylène, la polyéthylèneimine ou les cyclodextrines, présentent l'avantage d'être biocompatibles. Des enquêtes approfondies ont été menées sur la toxicité du triclosan et il a été jugé non toxique par voie orale et ne présente pas d'effets mutagènes, cancérigènes ou tératogènes chez l'Homme [77]. Selon la littérature, divers supports à base de triclosan ont été élaborés à ce jour en vue d'une application antimicrobienne.

En effet, Wu et coll. [78] ont décrit la mise au point d'une surface active à base de titane contenant des polymères de *N*-hydroxyéthylacrylamide (PHEEA) greffés en sa surface. Le matériau Ti-PHEEA y est décrit comme étant capable de réduire l'adhésion bactérienne sans parvenir à inhiber leur croissance. Seulement, après dépôt d'une solution de triclosan (TCS) à sa surface, le matériau final Ti-PHEEA-TCS a montré une forte activité bactéricide (**Schéma IV:1**). Des tests microbiologiques effectués sur des souches telles que *Streptococcus mutans* et *Actinomyces naeslundii*, décrivent une réduction de la population bactérienne en surface de l'ordre de 97 % au bout de 24h.

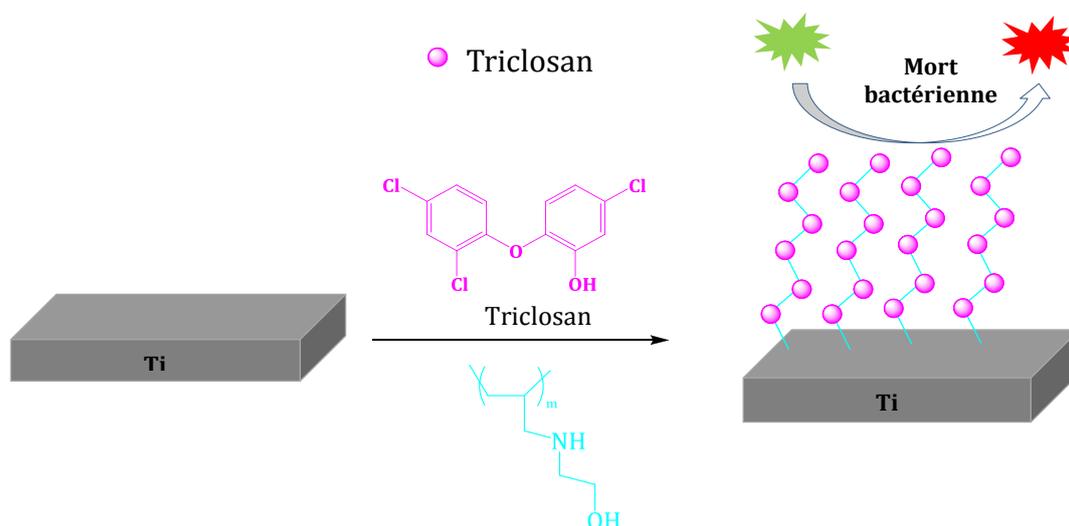


Schéma IV:1 Fixation du triclosan (TCS) sur une surface à base de Titane contenant des polymères de *N*-hydroxyéthylacrylamide (PHEEA) [78].

Le triclosan greffé de manière covalente au matériau Ti-PHEEA forme par interaction avec les acides aminés du site actif des enzymes, un complexe ternaire stable qui affecte la membrane des bactéries.

Kalyon et coll. [79] ont évalué l'efficacité antibactérienne du triclosan après incorporation de ce dernier dans un polymère amorphe utilisé dans l'industrie, le polystyrène, à l'état fondu. Ils ont évalué l'activité microbiologique du matériau moulé en petits disques sur des souches d'*E. coli* et de *Bacillus thuringiensis*. Une importante réduction de la croissance des deux souches est observée dès les 5 premières heures d'expérimentation. Popelka et coll. [80] ont pour leur part fait intervenir un autre polymère assez largement utilisé dans le milieu biomédical pour ses propriétés mécaniques, le polyéthylène. Par traitement plasma (200 W, 15s, 15 kHz, 10 kV), ces derniers ont activé une surface de polyéthylène de faible densité (LPDE) à température ambiante et sous pression atmosphérique. Ils l'ont ensuite immergé dans une solution aqueuse d'acide acrylique afin d'y greffer de manière efficace l'acide polyacrylique (PAA) par polymérisation radicalaire, pour former le matériau LPDE-PAA. Ce matériau LPDE-PAA est enfin immergé dans une solution contenant du triclosan. Le triclosan est piégé dans le polymère grâce aux radicaux libres présent sur ce matériau (**Schéma IV:2**).

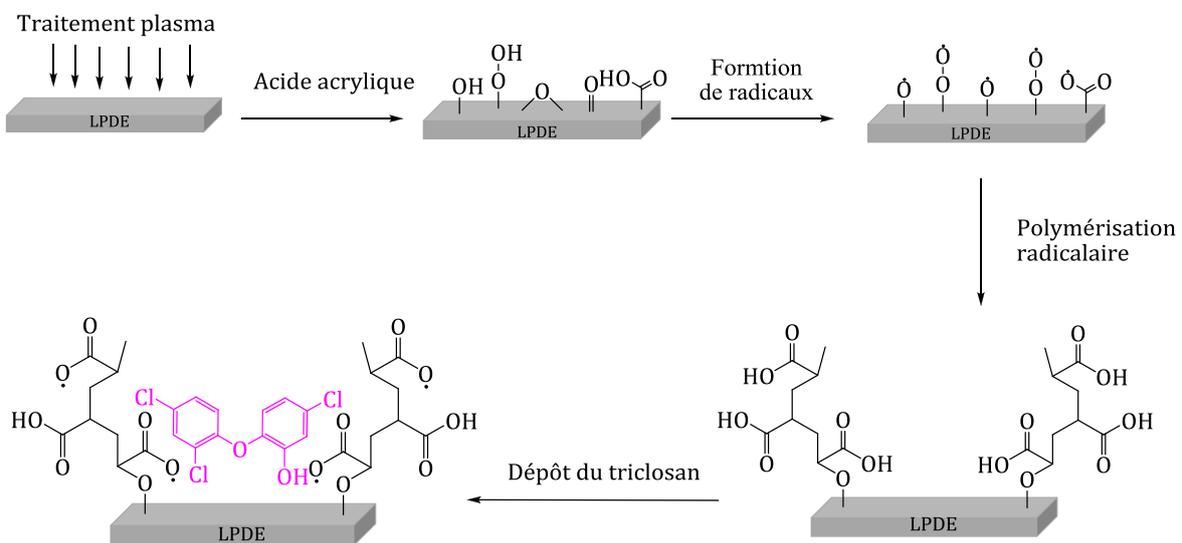


Schéma IV:2 Fixation du triclosan (TCS) sur une surface à base de polyéthylène de faible densité (LDPE) contenant des polymères d'acide acrylique (PAA) [80].

L'effet antibactérien du LDPE traité a été prouvé contre les bactéries *E. coli* et *S. aureus* avec une adhérence des bactéries aux polymères considérablement diminuée.

Kugel et coll. [81] ont fixé sur des polymères de polyéthylèneimine (PEI), le triclosan (TCS) préalablement converti en l'un de ses dérivés époxydés, le 2-((5-chloro-2-(2,4-dichlorophenoxy)phenoxy)methyl)oxirane (ETCS) (**Schéma IV:3**).

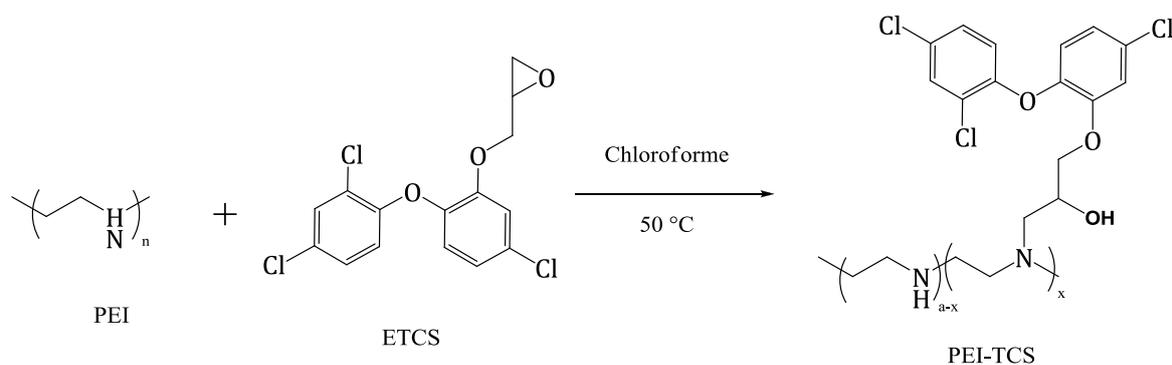


Schéma IV:3 Fixation du triclosan préalablement époxydé (TCS) sur une la polyéthylèneimine [82].

L'activité microbiologique du matériau PEI-TCS obtenu a été évalué sur les souches *S. epidermidis* et *E. coli*. Les matériaux à base de PEI de faible masse moléculaire ont montré une forte activité inhibitrice sur la croissance des deux souches, tandis que ceux de masse élevée sont inefficaces. Bien que le mécanisme d'action associé à l'activité biocide du matériau PEI-TCS soit inconnu, les auteurs pensent que les caractéristiques d'adsorption et de diffusion des polymères par rapport à la paroi des cellules bactériennes sont des facteurs importants dans cette activité.

D'autres études ont exploités les propriétés biocides du triclosan par des procédés d'inclusion dans des cyclodextrines qui sont des oligomères cycliques utilisés dans diverses applications industrielles (cosmétiques, pharmaceutiques, agroalimentaire) et technologiques (dépollution de l'eau et de l'air).

Les cyclodextrines ont la caractéristique d'encapsuler des molécules antibactériennes hydrophobes dans leurs cavités lipophiles en augmentant leur solubilité, leur stabilité chimique, leur dissolution et leur biodisponibilité [83]. Qian et coll. [84] ont par exemple réalisé l'inclusion par complexation du triclosan, dans des polymères de β -cyclodextrines cationiques (CP β CD) afin d'apporter une activité antimicrobiennes à des produits celluloses. Cabrales et coll. [85] ont greffé de manière covalente une

cyclodextrine, la monochlorotriazinyl- β -cyclodextrine (MCT- β -CD) sur du coton par réaction de substitution nucléophile entre les groupes hydroxyles du coton et le cycle chlorotriazine (**Schéma IV:4**). Puis, la molécule de triclosan (TCS) a été solubilisée dans de l'éthanol avant d'être incluse dans la cavité de la cyclodextrine greffée. Le matériau Cellulose-MCT- β -CD/TCS obtenu a montré une forte activité antimicrobienne vis-à-vis d'*E. coli* avec une réduction de la croissance bactérienne proche de 100 %.

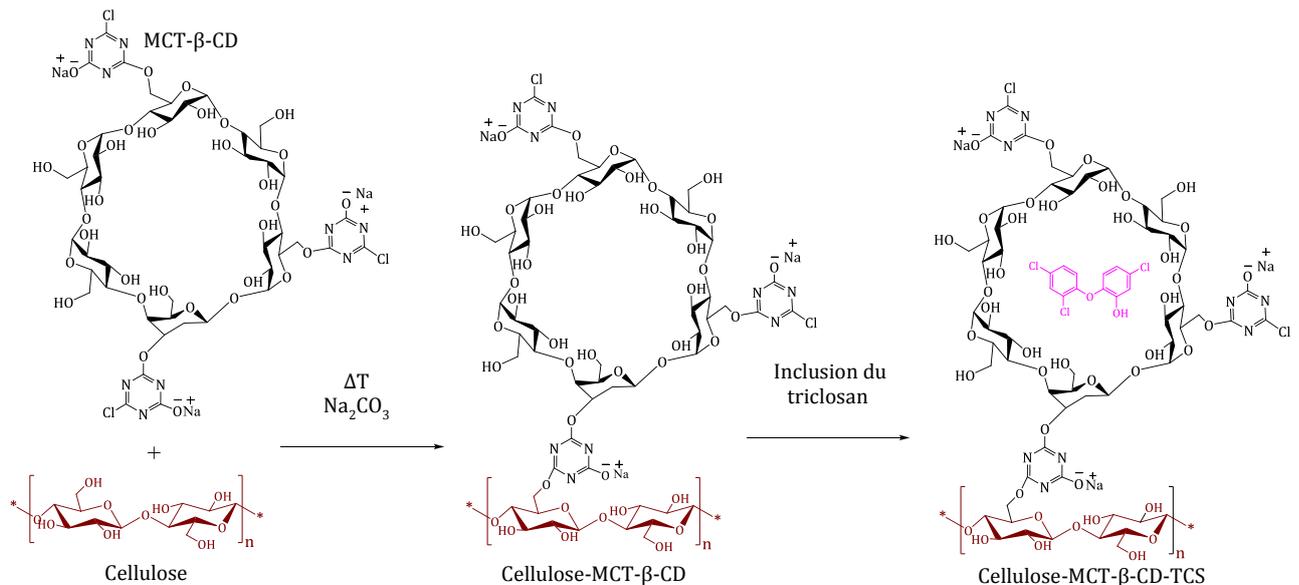


Schéma IV:4 Réaction de greffage de la monochlorotriazinyl- β -cyclodextrine (MCT- β -CD) sur la cellulose et inclusion du triclosan dans la cavité du matériau Cellulose-MCT- β -CD [85].

D'autres travaux de recherches récents ont décrit l'utilisation de certains oxydes comme support antimicrobiens du fait de leurs propriétés adsorbantes vis-à-vis des biomolécules telles que le triclosan. En effet, grâce à leurs surfaces poreuses, ces oxydes sont capables de piéger les agents actifs et permettent une libération contrôlée de ces derniers pour une application thérapeutique.

Wang et coll. [86] ont incorporé du triclosan dans des particules mésoporeuses de silicium. Leur travail a montré que ces particules de silicium constituent un support efficace pour la libération prolongée d'agents antimicrobiens. L'activité antibactérienne des particules mésoporeuses a été comparée avec celle des particules macroporeuses sur *S. aureus*. Les particules mésoporeuses ont une activité inhibitrice importante et stable avec une zone d'inhibition de 23 mm de diamètre durant les 15 jours d'exposition

alors que les particules macroporeuses présentent dans les premières 24h une zone d'inhibition de 19 mn qui décroît à 10 mn après 15 jours. Récemment, Cui et coll. [87] ont utilisé des nanoparticules d'oxyde de magnésium (MgO) qui présentent une résistance thermique élevée et des défauts de structure favorable à l'adsorption d'agents actifs. Ces derniers ont ainsi adsorbé du triclosan dans la structure de l'oxyde de magnésium pour former un matériau composite qui a montré une stabilité thermique améliorée et une forte activité antibactérienne contre *E. coli*.

IV.1.4 Greffage du triclosan sur la pâte à papier.

IV.1.4.1 Stratégie de synthèse

Les exemples précédents ont montré l'immobilisation du triclosan sur des supports variés et selon des approches différentes. Certaines de ces approches s'avèrent très efficaces contre les proliférations bactériennes. Toutefois, un relargage du triclosan est observé au bout d'une certaine durée d'utilisation des supports sur lesquels celui-ci a été incorporé, encapsulé ou simplement déposé. Cela entraîne aujourd'hui une pollution de l'environnement et une exposition des populations à des produits cancérigènes. Dans le but d'éviter cette libération ultérieure du triclosan, il conviendrait d'opter pour un mode de fixation plus durable de ce dernier sur support, tout en nous assurant que celui-ci conserve ses propriétés antimicrobiennes. Afin de valider cette approche, nous avons choisi de greffer le triclosan de manière covalente sur des fibres lignocellulosiques de pâte Kraft *via* une réaction de « Click Chemistry ».

La stratégie mise en place lors de ces travaux est présentée sur le **Schéma IV:5**. Elle débute par la synthèse du propargyltriclosan et la fixation sur les fibres de pâte Kraft de groupements tosyles, bons nucléofuges qui permettront par substitution nucléophile la fixation de groupement azoture. Le greffage est ensuite réalisé par réaction de cycloaddition (CuAAC) entre le triclosan propargylé et la pâte kraft azidée.

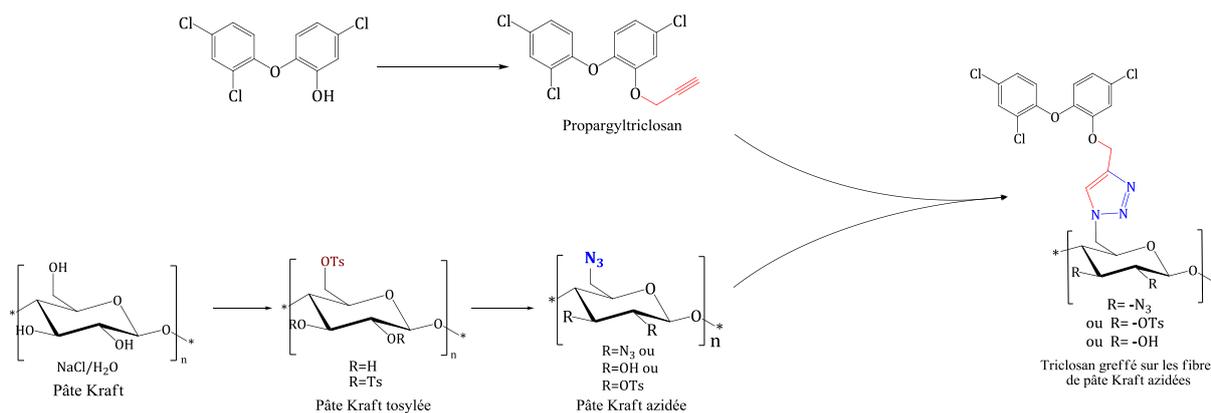


Schéma IV:5 Stratégie de greffage du triclosan sur les fibres de pâte lignocellulosique

IV.1.4.2 Propargylation du triclosan

La propargylation du triclosan est réalisée suivant une approche de *O*-alkylation développée par Chaleix et coll. [88] au sein de notre laboratoire. Le triclosan est mis à réagir avec 2 équivalents de bromure de propargyle, en présence de 10 équivalents de K₂CO₃, dans le DMF (Schéma IV:6). La réaction est activée par irradiation microondes (60°C, 200W, 2 x 5 min) et le suivi est réalisé par CCM. La réaction est arrêtée lorsque le triclosan a été entièrement consommé.

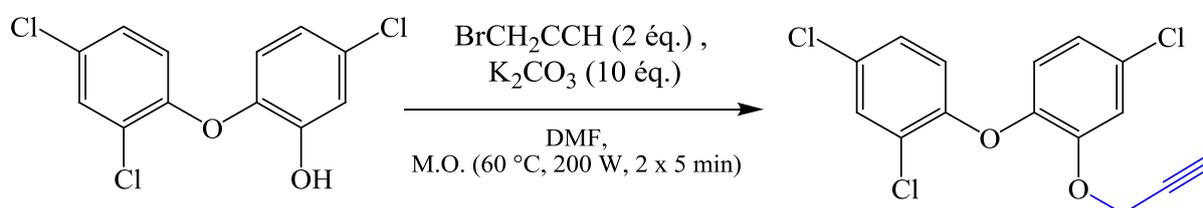


Schéma IV:6 Propargylation du triclosan

Le DMF est ensuite évaporé et l'huile obtenue est recristallisée dans l'éthanol. Après filtration on obtient des cristaux blancs avec un rendement de 85 %.

Le spectre infrarouge du produit obtenu montre une bande fine à 2131 cm⁻¹ dans la zone caractéristique d'élongation de la triple liaison.

Le spectre RMN ¹H dans le DMSO montre deux familles de protons. Les protons aromatiques du cycle disubstitué par le chlore sont plus déblindés que ceux du cycle qui porte le propargyle. Les protons aromatiques résonnent aux alentours de 6,8 et 7,7 ppm et les protons du propargyle entre 3 et 5 ppm. Les protons du -CH₂ résonnent à 4,89

ppm sous forme d'un doublet plus déblindés que le proton du -CH qui résonne à 3,60 ppm sous forme d'un triplet. Les différents déplacements et la forme des signaux des protons sont décrits dans la partie expérimentale.

IV.1.4.3 MODIFICATION CHIMIQUE DES FIBRES LIGNOCELLULOSIQUE EN MILIEU ACQUEUX

IV.1.4.3.1 Solubilisation de la cellulose

Les nombreuses liaisons hydrogènes intra- et intermoléculaires rendent les fibres de cellulose insolubles dans la plupart des solvants organiques et leur modification chimique complexe. Afin de faciliter ces modifications, il est important de procéder dans un premier temps à leur solubilisation pour réaliser les réactions en milieu homogène et ainsi les favoriser.

Une étude bibliographique montre qu'il y a deux familles de solvant capables de dissoudre la cellulose, les solvants dérivatisants et les solvants non dérivatisants.

- Les solvants dérivatisants réagissent avec la cellulose pour former des intermédiaires cellulosiques organo-solubles. On peut citer le couple DMF/N₂O₄ ou le couple DMSO/Formaldéhyde. Ces solvants sont toxiques et entraînent parfois des réactions parasites.
- Les solvants non dérivatisants ne réagissent pas avec la cellulose. On peut citer les solutions d'hydroxyde de cuprammonium (Cuam) ou le système chlorure de lithium/N,N-diméthylacétamide qui est le plus utilisé. Développé par McCormick et coll. [89] en 1979, le système chlorure de lithium/N,N-diméthylacétamide forme un complexe avec les groupements hydroxyles de la cellulose (**Schéma IV:7**), le lithium permet quant à lui de rompre les liaisons hydrogène et ainsi obtenir une solution de cellulose homogène et limpide. De plus, le système LiCl/DMAc ne dégrade presque pas la cellulose [90]. Néanmoins, une série d'échange de solvant H₂O/MeOH et MeOH/DMAc est nécessaire pour pouvoir effectuer la dissolution.

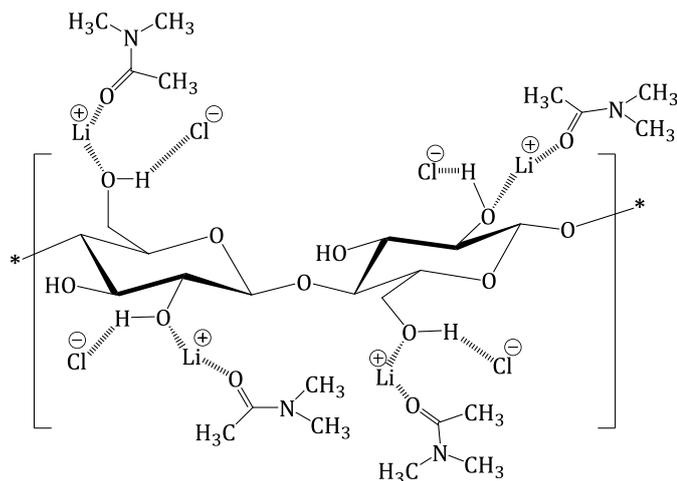


Schéma IV:7 Complexé $[Li-DMAC]^+Cl^-/Cellulose$

Dans le cas. de la cellulose de faible D.P., Isogai et Atalla [91] ont obtenu une solution aqueuse limpide à 5 % de soude contenant 2 % de cellulose après une congélation et une décongélation de la solution. Une étude réalisée au laboratoire dans les mêmes conditions NaOH/H₂O a permis de mettre au point les réactions de tosylation et de propargylation de la cellulose.

Depuis 2002, un nouveau type de solvant non dérivatisant est utilisé pour dissoudre la cellulose : les liquides ioniques [92,93]. Ces sels présentent des propriétés intéressantes pour la solubilisation des composés organiques et même inorganiques. De bons résultats ont été obtenus en utilisant le chlorure de 1-butyl-3-méthylimidazolium pour une dissolution plus rapide de la cellulose de D.P. faible et moyen.

IV.1.4.3.2 Préparation de la pâte Kraft Azidée

L'azidation des fibres de pâte Kraft a été réalisée en deux étapes. Tout d'abord, on procède à la fixation d'un bon groupe nucléofuge, le tosylo, puis le groupement azido est introduit par substitution nucléophile.

IV.1.4.3.2.1 Tosylation de la pâte Kraft

Classiquement la tosylcellulose est obtenue à partir d'une solution de cellulose dissoute dans le système LiCl/DMAC [90], dans des liquides ioniques [94] ou en utilisant des solvants organiques anhydres.

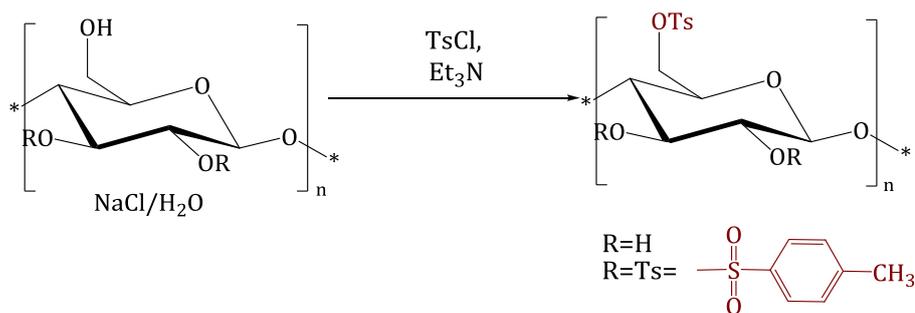


Schéma IV:8 Torsylation de la pâte Kraft

Au sein du LCSN, Elchinger et coll. [95] ont décrit la préparation de la tosylcellulose en milieu aqueux en utilisant de la triéthylamine comme base et agent activant (**Schéma IV:8**). Ces derniers ont étudié l'influence de plusieurs paramètres tels que la quantité de chlorure de tosylo, la présence de la triéthylamine, les temps de réaction et l'utilisation de l'hydroxyde de sodium ou du chlorure de sodium (**Tableau IV:1**).

Tableau IV:1 Comparaison des méthodes de torsylations.

Entrée	1	2	3	4	5	6	7
	Heinze et coll. [96]	Heinze et coll. [94]	Heinze et coll. [94]	Elchinger et coll. [95]			
Solvant	LiCl/DMAC	BMIMCl	BMIMCl	NaOH/H ₂ O	NaOH/H ₂ O	NaCl/H ₂ O	NaCl/H ₂ O
Co-solvant	-	pyridine	DMI	-	-	-	-
Conditions	24 h (5 °C)	16 h (80 °C) + 8 h (25 °C)	16 h (80 °C) + 8 h (25 °C)	24 h (TA)	24 h (TA)	24 h (TA)	24 h (TA)
TsCl (éq./UAG)	6	4	3	6	12	6	12
Base (éq./UAG)	Et ₃ N 12	Pyridine 20	BIM 6	Et ₃ N 6	Et ₃ N 12	Et ₃ N 6	Et ₃ N 12
DS	2,02	1,03	1,14	0,96	1,70	0,50	0,75

BMIMCl: 1-Butyl-3-methylimidazolium chloride, DMI: 1,3-dimethyl-2-imidazolidinone, BIM: 1-butyylimidazole

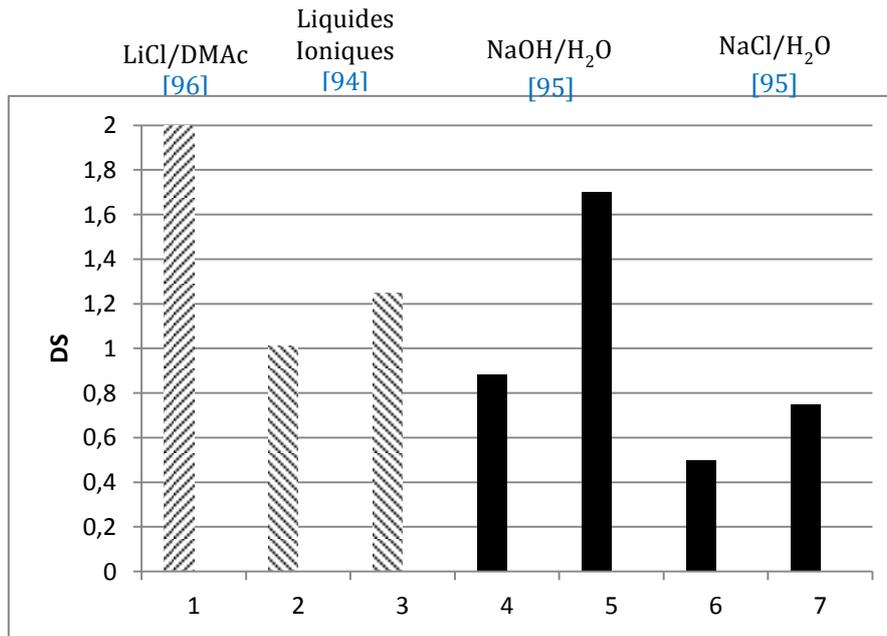


Figure IV:2 Diagramme de comparaison des DS des différentes méthodes de la littérature.

Les résultats obtenus avec un excès de chlorure de tosyle dans le système aqueux NaOH/H₂O sont comparables à ceux obtenus dans le système organique LiCl/DMAc. Dans le cas de l'utilisation du système NaCl/H₂O, les degrés de substitution sont plus faibles.

L'étude de la cristallinité de la cellulose traitée par NaOH et par NaCl montre une dégradation des fibres de cellulose dans le cas du traitement basique. Dans le cas du traitement et de la modification de la cellulose dans la solution saline, on n'observe pas de dégradation (**Tableau IV:2**) [95].



Tableau IV:2 Résultats des analyses DRX de la cellulose traitée dans les systèmes NaOH/H₂O et NaCl/H₂O

	Cellulose non traitée	Prétraitement avec NaOH/H ₂ O		Prétraitement avec NaCl/H ₂ O	
		Cellulose NaOH	Tosylcellulose	Cellulose NaCl	Tosylcellulose
Taille cristallite (nm)	2,8±0,1	1,9±0,1	1,3±0,1	2,9±0,1	2,9±0,1
Degré de cristallinité (%)	71±1	70±6	77±2	68±1	76±2
Ratio en Cellulose I/II	100/0	50/50	50/50	100/0	100/0

L'application de ces conditions de tosylation sur de la pâte Kraft a montré la même dégradation dans le cas de la modification en milieu basique [97,98]. Dans le cas du traitement dans la solution saline, les propriétés mécaniques de la pâte sont améliorées, comme le montre le **Tableau IV:3**.

Tableau IV:3 Propriétés physiques des fibres traitées dans les systèmes NaOH/H₂O et NaCl/H₂O comparées à celles de fibres non traitées

	Fibres non traitées	Fibres prétraitées avec NaOH/H ₂ O	Fibres prétraitées avec NaCl/H ₂ O
Opacité	79,5%	-2,6 %	+1,8 %
Blancheur	78,1%	+0,9 %	+4,5 %
Indice de déchirure	4,04 mN.m ² .g ⁻¹	-23,9 %	+108,4 %
Indice de rupture	2,38 km	-31,0 %	-21,0 %
Elongation	1,68 %	-29,1 %	+2,6 %

Ces résultats nous ont poussés à réaliser la tosylation de la pâte Kraft dans le système NaCl/H₂O. Les fibres lignocellulosiques de pâte Kraft sont dispersées dans une solution aqueuse de chlorure de sodium. La solution est ensuite congelée pendant 24h, décongelée puis diluée. Ensuite, on ajoute 12 équivalents de triéthylamine et 6 équivalents de chlorure de tosyloxy. L'ensemble est mis sous agitation mécanique, à température ambiante. Après 24h, les fibres sont filtrées, lavées à l'eau et à l'éthanol puis séchées à l'étuve à 60°C.

La pâte Kraft tosylée est obtenue sous la forme de fibres blanches, avec un rendement massique de 113 %. L'analyse du spectre infrarouge du produit montre l'apparition de deux bandes à 1362 et 1169 cm⁻¹ caractéristiques de la zone d'élongation des groupements -SO₂ (**Figure IV:4**).



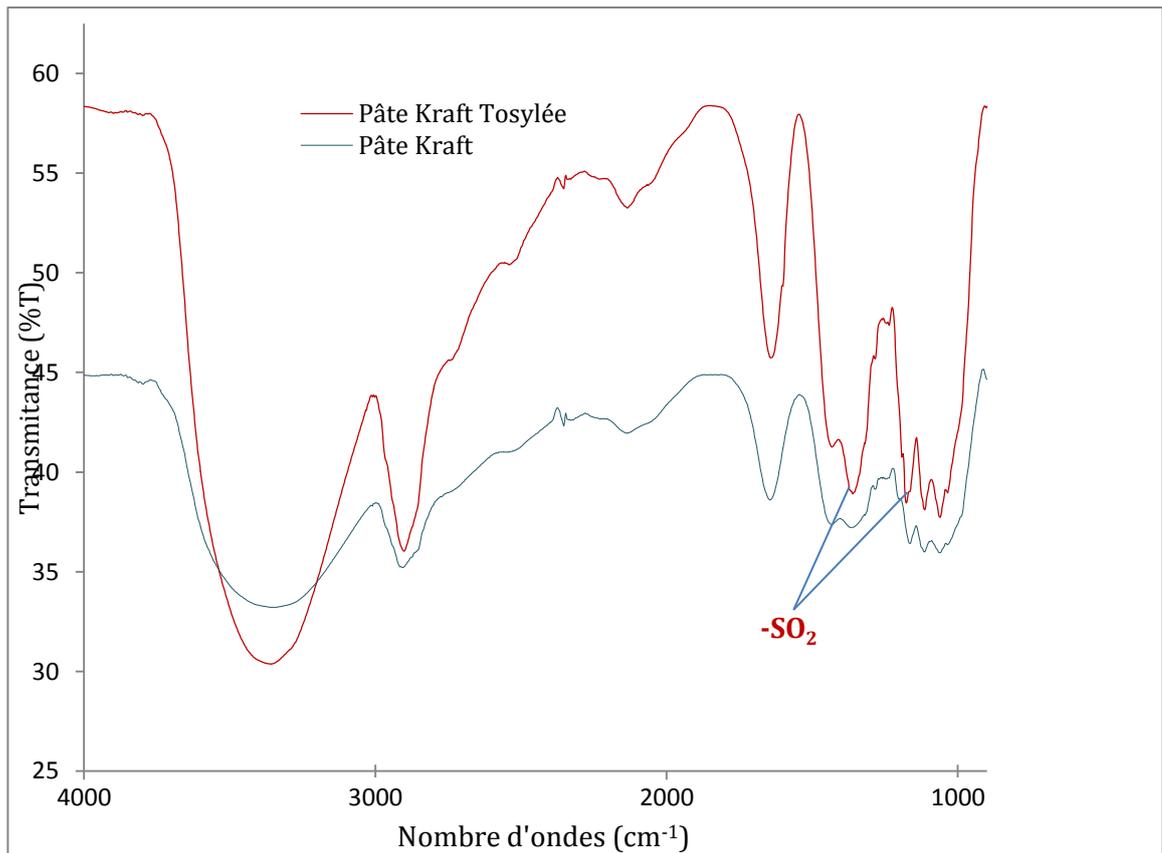


Figure IV:4 Spectre Infra-rouge de la pâte Kraft tosylée

Une analyse par spectrométrie photoélectronique (XPS) a été réalisée et révèle la présence de carbone, d'oxygène et de soufre à 285 eV (C_{1s}), 531 eV (O_{1s}) et 168 eV (S_{1s}), respectivement (**Figure IV:5**). L'apparition du soufre sur le spectre confirme le greffage du groupement tosyle. La variation du rapport C/O confirme cette fixation (**Tableau IV:4**). Afin de déterminer le degré de substitution, la pâte Kraft est assimilée à de la cellulose. Le degré de substitution calculé est de l'ordre de 0,28.

Tableau IV:4 Analyses XPS des fibres Kraft modifiées.

Echantillon	C [%]	O [%]	S [%]	DS
Pâte Kraft	59,89	40,11	-	-
Pâte Kraft tosylée	61,51	35,60	2,02	0,28

L'analyse par spectroscopie infrarouge de ces fibres montre la présence d'une bande fine d'intensité moyenne à 2111 cm^{-1} , qui correspond à la fréquence de vibration d'élongation des liaisons N=N, caractéristique du groupement azoture (**Figure IV:4**)

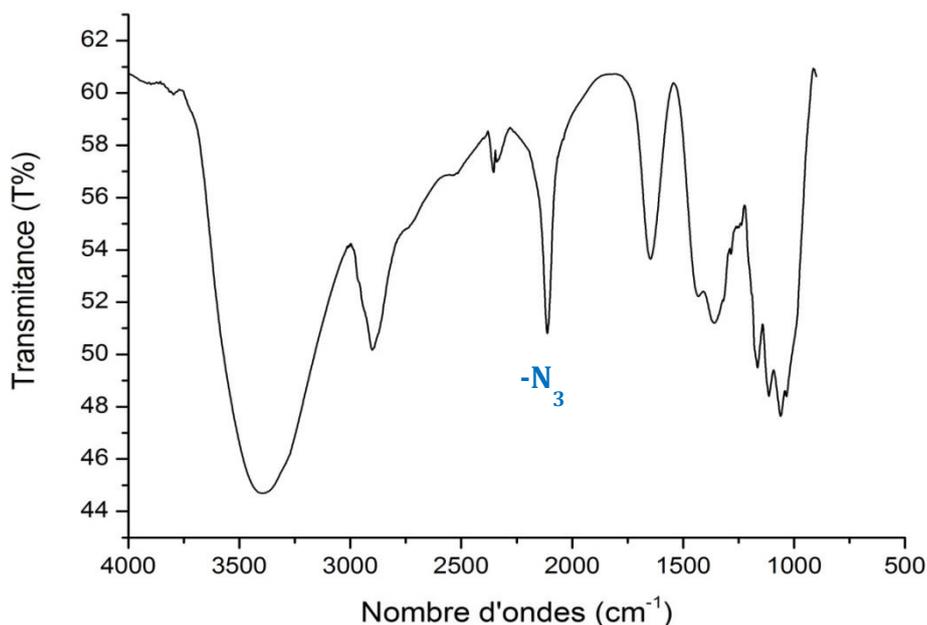


Figure IV:4 Spectre Infra-rouge de la pâte Kraft azidée

L'analyse par spectrométrie XPS permet de déterminer un DS_{N_3} de 0,09. Par ailleurs, elle montre également la présence d'atomes de soufre. Le degré de substitution des groupements tosylé restants est d'environ 0,1. Le taux de conversion des groupements tosylé est faible. La variation des conditions opératoires ou des quantités de réactifs ainsi que des essais d'azidation en milieu aqueux, n'ont pas permis d'amélioration (**Tableau IV:5**).

Tableau IV:5 Analyses XPS des fibres Kraft modifiées.

Echantillon	C [%]	O [%]	S [%]	N [%]	DS
Pâte Kraft	59,89	40,11	-	-	-
Pâte Kraft tosylée	61.51	35,60	2.02	-	0,28
Pâte Kraft azidée	61.5	35,85	0.72	1.93	$DS_{N_3}:0.09$ $DS_{Ts}: 0.1$

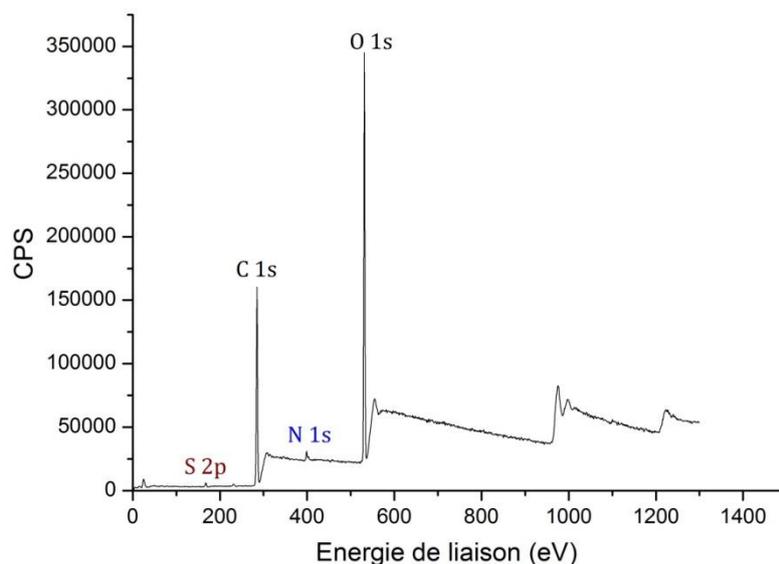


Figure IV:5 Spectre XPS de la pâte Kraft azidée

IV.1.4.3.3 Réaction de cycloaddition entre le propargyltriclosan et la pâte azidée.

Le triclosan a été greffé sur les fibres de pâte Kraft par réaction de cycloaddition 1,3-dipolaire de Huisgen en utilisant un mode opératoire mis au point au laboratoire [98-100]. Le triclosan propargylé est mis à réagir avec la pâte Kraft azidée dans le DMSO à température ambiante sous agitation, en présence de sulfate de cuivre et d'ascorbate de sodium. L'ascorbate de sodium joue ici le rôle de réducteur du cuivre (II) en cuivre (I), qui est l'espèce catalytiquement active (**Schéma IV:10**).

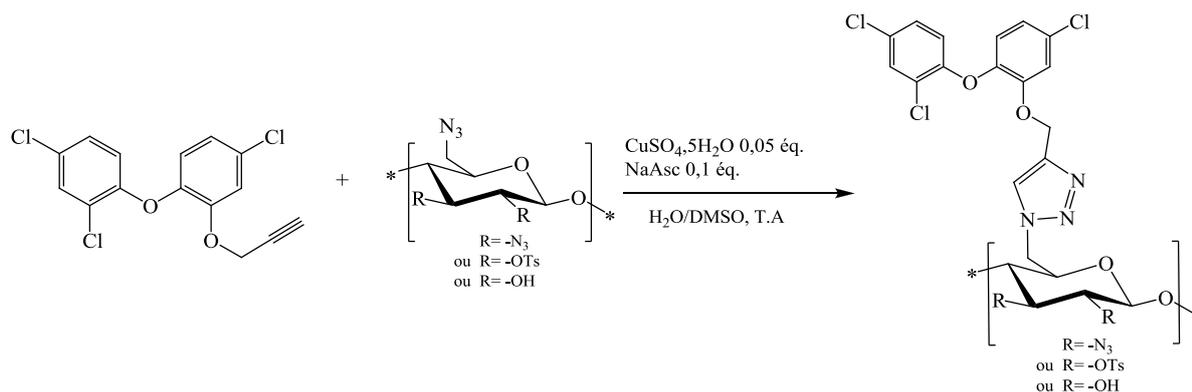


Schéma IV:10 Couplage de la pâte Kraft azidée et du triclosan propargylé

Après 3 jours de réaction, le mélange est filtré et la pâte Kraft modifiée obtenue est lavée puis séchée. Une pâte de coloration jaune est obtenue avec un rendement massique de 117% (**Figure IV:6**).



Figure IV:6 Fibres de pâte Kraft-triclosan

L'analyse par spectrométrie XPS du matériau obtenu révèle la présence d'oxygène, de carbone, d'azote, de chlore et de soufre à 531,00 (O_{1s}), 285,00 (C_{1s}), 399 eV (N_{1s}), 199(Cl_{2p}), 165,00 (S_{2p}) respectivement (**Figure IV:7**). L'apparition des pics de pourcentage atomique correspondant à l'atome de chlore sur le spectre, confirme le greffage de la molécule de triclosan. L'analyse a permis de déterminer un DS de 0,05.

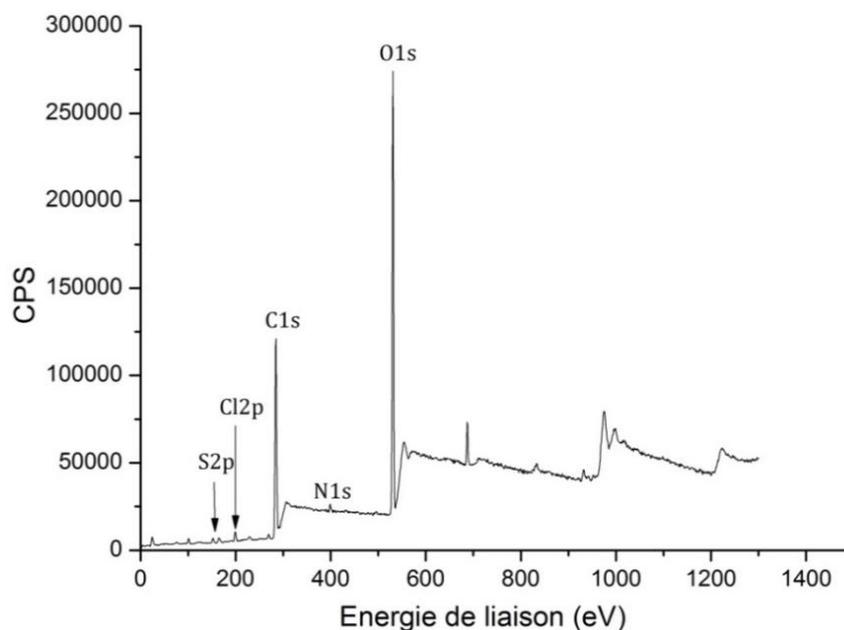


Figure IV:7 Spectre XPS des fibres de pâte Kraft-triclosan

IV.1.5 Evaluation biologique de l'activité antimicrobienne du support-triclosan

L'évaluation de l'activité antibactérienne du matériau obtenu a été réalisée selon une méthode basée sur la norme AATCC Test Method 100 – 2012 « Assessment of Antibacterial Finishes on Textile Materials ». C'est une méthode quantitative normalisée pour les textiles qui se déroule en deux étapes : (i) un dénombrement des bactéries à t_0 suivi (ii) d'un dénombrement à t_{24} , qui permet de tester l'activité antibactérienne après 24 h de contact.

IV.1.5.1 Mise au point des tests microbiologiques

IV.1.5.1.1 Préparation des échantillons

Les feuilles préparées à partir du produit de greffage du triclosan sur la pâte kraft et des feuilles servant de témoins ont été découpés en disques de 8 mm de diamètre (**Figure IV:8**). En effet, les disques témoins sont issus des différentes pâtes intermédiaires ayant permis d'élaborer le matériau «pâte Kraft-Triclosan» final, afin de vérifier leur comportement vis-à-vis des souches bactériennes : ce sont les contrôles négatifs. Il s'agit de la pâte Kraft (PK), la pâte Kraft tosylée (PK-Tos) et la pâte Kraft azidée (PK-N₃). L'ensemble des disques est stérilisé par autoclavage à 120°C pendant 15 min.

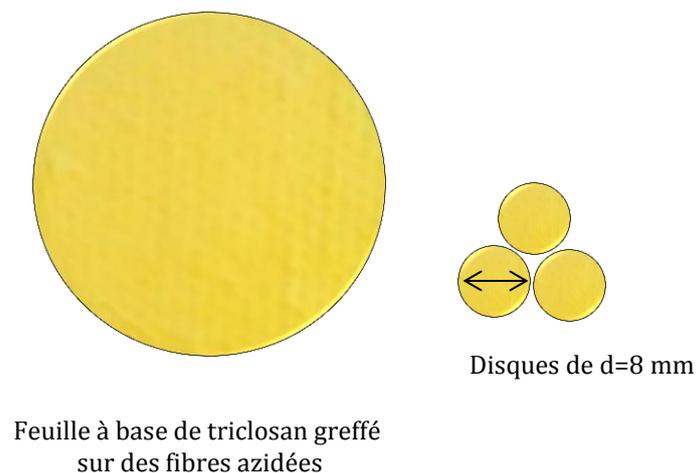


Figure IV:8 Découpe des feuilles de triclosan greffé.

IV.1.5.1.2 Tests microbiologiques

Les tests microbiologiques ont été réalisés sur quatre souches bactériennes: deux souches bactériennes Gram(+), *B. cereus* CH et *S. aureus* CIP 7625, et deux souches bactériennes Gram (-), *E. coli* CIP 54.8T et *P. aeruginosa* CIP 76110. Le choix des souches a été basé sur le type de leur paroi et leur implication dans les infections.

A partir d'une culture bactérienne en phase exponentielle de croissance, une suspension bactérienne à une concentration déterminée (10^5 UFC/mL) est préparée dans un milieu nutritif Trypticase soja (TS). 100 μ L de cette suspension à 10^5 UFC/mL ont été déposés sur trois disques du même échantillon (1 disque pour le dénombrement à t_0 et 2 disques restants pour le dénombrement à t_{24}).

Directement après le dépôt de la suspension bactérienne, un disque est récupéré et transféré dans 1 mL d'eau physiologique 0,9 % NaCl + 0,5 % Triton X-100 puis agité vigoureusement pendant deux heures afin de décrocher toutes les bactéries des différents matériaux. Ensuite, des dilutions en série au $10^{\text{ème}}$ sont effectuées et ensemencées sur des milieux gélosés (TS + 17 g/L Agar). Après 24h d'incubation à 37°C, les colonies bactériennes sont dénombrées, ce qui correspond à t_0 .

Les deux disques restants sont laissés à 37°C. Après 24 heures de contact avec le matériau, ces derniers sont traités de la même façon que le premier disque (t_0), afin de dénombrer les bactéries, ce qui correspond à t_{24} (**Figure IV:9**).

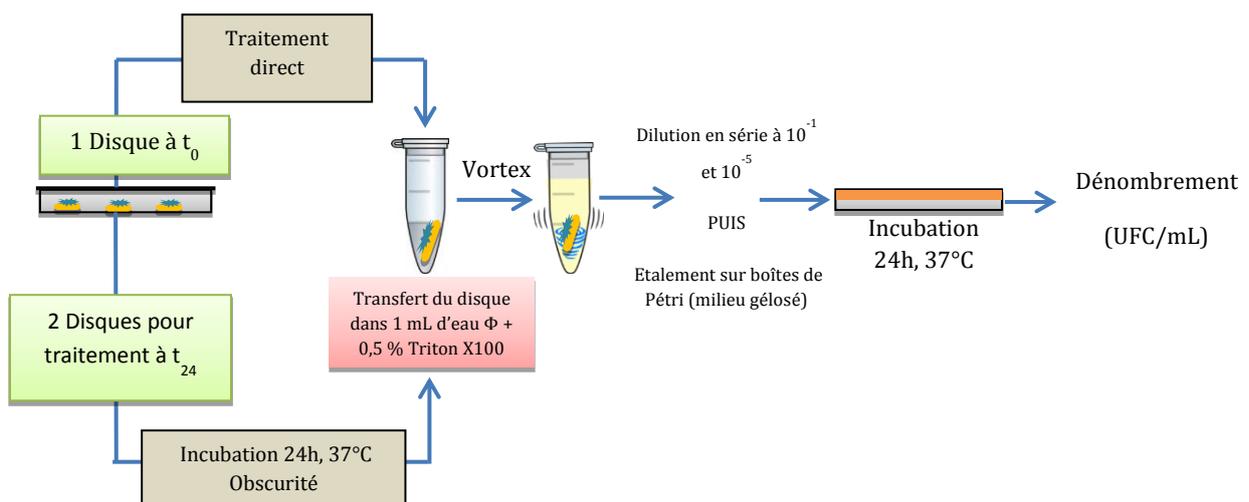


Figure IV:9 Protocole pour l'évaluation biologique des supports cellulose antimicrobiens

IV.1.5.2 Exploitation des résultats

IV.1.5.2.1 Évaluation biologique de l'activité du matériau triclosan

Les résultats concernant l'évaluation microbiologique des disques du matériau «pâte Kraft-Triclosan» sont présentés sur la **Figure IV:10**. Les différents contrôles négatifs (pâte Kraft, pâte Kraft tosylée, pâte Kraft azidée) ne présentent aucune activité antimicrobienne envers *E. coli*, *S. aureus* et *B. cereus*. En effet, après 24h de contact avec ces supports témoin, une croissance bactérienne de 3 log par rapport à la référence (t = 0, indiquant le nombre de bactéries initialement déposées sur un disque) est observée, quelle que soit la souche étudiée. Une croissance bactérienne de près de 4,7 log est d'ailleurs observée chez *S. aureus* en présence de la pâte Kraft azidée.

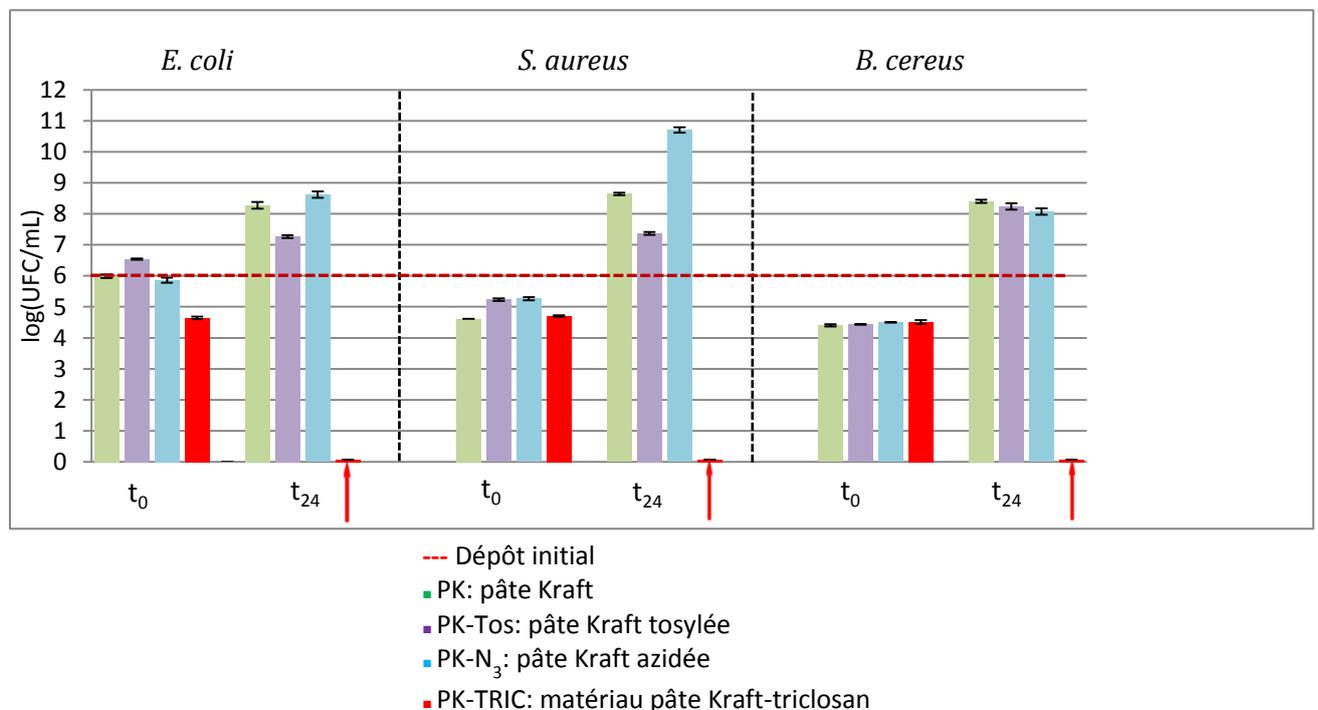


Figure IV:10 Activité antibactérienne du matériau « pâte kraft-triclosan » à t=24 h sur *E. coli*, *S. aureus* et *B. cereus*.

Par contre, après 24 heures de contact avec le matériau «pâte Kraft-Triclosan», une inhibition totale de la croissance bactérienne est observée par rapport au nombre initial d'UFC (t₀) quel que soit la souche étudiée. Ces résultats indiquent que le triclosan fixé au support cellulosique *via* un lien triazole, conserve ses propriétés antimicrobiennes.

Compte-tenu de la fixation covalente du Triclosan sur les fibres lignocellulosiques, son efficacité antimicrobienne ne semble pas nécessiter forcément une pénétration intracellulaire dans la bactérie, ce qui laisse supposer un mode d'action différent.

Escalada et coll. [101,102] ont par exemple tenté d'expliquer cette observation. Ils ont étudié plusieurs cibles pour l'inactivation bactérienne avec le Triclosan et ont mis en évidence que l'effet létal du triclosan ne peut être expliqué exclusivement par l'inhibition des voies métaboliques, telle que la synthèse des acides gras par l'énoyl-ACP réductase. Cela vient confirmer les travaux de Villalain et coll. [103] qui ont montré que le Triclosan pouvait interagir avec les phospholipides des membranes bactériennes en perturbant leur structure sans forcément occasionner la fuite des organites cellulaires. Cette perturbation engendre de manière conséquente la mort de la bactérie. C'est ce dernier mode d'action qui pourrait expliquer l'effet observé dans le cadre de notre étude.

Des essais préliminaires sur la souche *P.aeruginosa* ont montré une activité antibactérienne moins importante (44 % d'inhibition de la croissance) (**Figure IV:11**). Même si cette activité est faible, elle reste supérieure à celle du triclosan libre. Ce dernier ne possède aucune activité contre cette souche [104,105] avec une inactivation totale des bactéries (100 %).

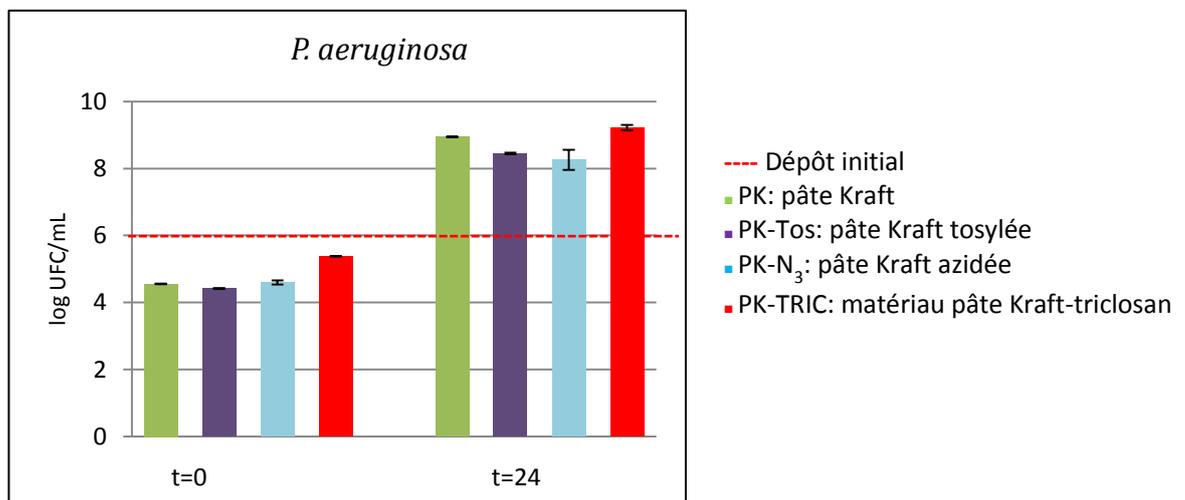


Figure IV:11 Activité antibactérienne du matériau « pâte kraft-triclosan » à t=24 h sur *P. aeruginosa*

IV.1.5.2.2 Évaluation de la durée d'activité biologique du matériau pâte Kraft-triclosan

En se basant sur les résultats précédents sur les trois souches (*E. coli*, *S. aureus* et *B. cereus*) qui ont montré une activité importante à t_{24} , nous avons évalué le temps durant lequel un support pâte Kraft-Triclosan reste actif. Pour cela, un nouveau protocole a été mis en place, basé sur la norme AATCC100 décrite précédemment.

100 μ l d'une suspension bactérienne (10^5 CFU/mL) sont déposés sur 5 disques de la pâte Kraft Triclosan. Comme précédemment, 1 disque a été directement traité après le dépôt de bactéries afin de dénombrer les bactéries à l'instant t_0 . Les 4 disques restants (disques t_{24}) ont été incubés à 37°C. Après 24 heures de contact, un des quatre disques restants a été récupéré et traité pour dénombrer les bactéries t_{24} . Sur les trois disques restants, 100 μ l d'une suspension bactérienne (10^5 CFU/mL), sont déposés puis mis à incuber à 37°C pendant 24h (disques t_{48}). Cette opération est répétée à nouveau 2 fois afin d'obtenir le dénombrement des bactéries t_{72} et t_{96} . La même démarche expérimentale a été appliquée aux témoins (pâte Kraft, pâte Kraft tosylée et pâte Kraft azidée).

Pour *E. coli*, une croissance bactérienne a été observée pour les différents témoins (pâte Kraft, pâte Kraft tosylée, pâte Kraft azidée) à t_0 , t_{24} , t_{48} , t_{72} et t_{96} . Pour la pâte Kraft Triclosan », à t_0 , le nombre de bactéries a diminué de 1 log par rapport au dépôt initial et par rapport aux différents témoins. Cela suggère qu'un faible temps de contact suffit pour initier un effet antimicrobien. A t_{24} , t_{48} , t_{72} et t_{96} , aucune bactérie n'a été dénombrée quelque soient les temps de contact (**Figure IV:12**).

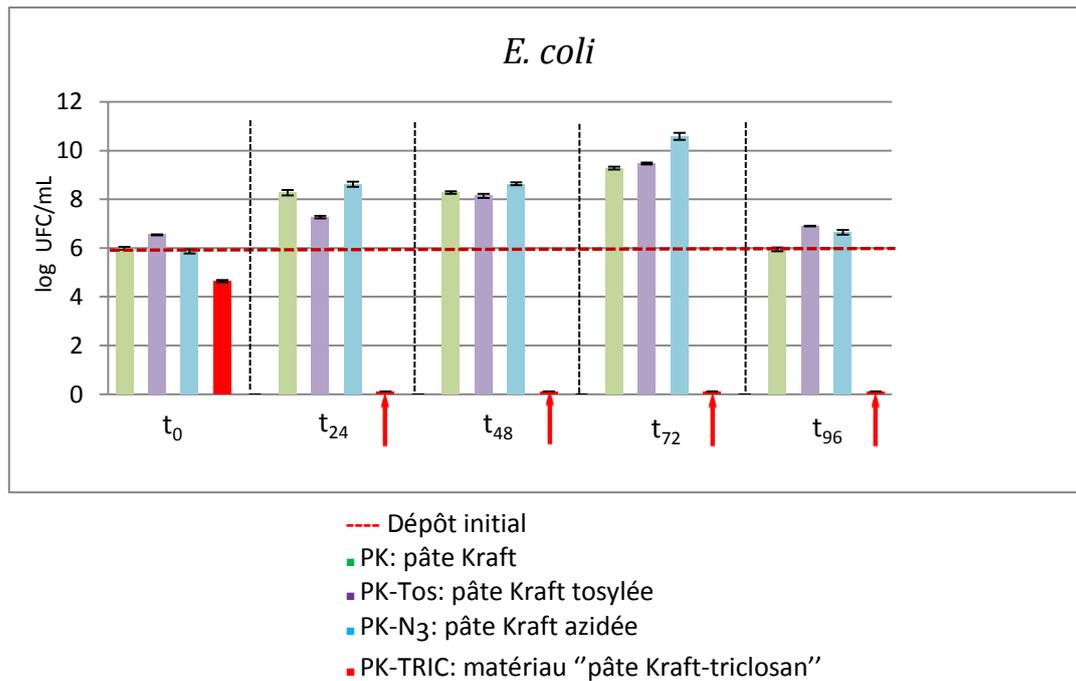


Figure IV:12 Activité antibactérienne du matériau « pâte Kraft-triclosan » de t₂₄ à t₉₆ sur *E. coli*

Comme précédemment, pour *S. aureus*, une croissance bactérienne a été observée pour les différents témoins à t₀, t₂₄, t₄₈, t₇₂ et t₉₆. Pour la pâte Kraft Triclosan, aucune bactérie n'a été dénombrée à t₂₄, t₄₈ et t₇₂ mais à t₉₆, une croissance bactérienne a été observée (**Figure IV:13**). Cela peut s'expliquer de deux manières, soit un développement d'une résistance par les bactéries résiduelles non-dénombrables par notre méthode d'ensemencement ou une perte d'accessibilité aux molécules du Triclosan due à interaction non-spécifique des débris cellulaires avec les molécules de Triclosan.

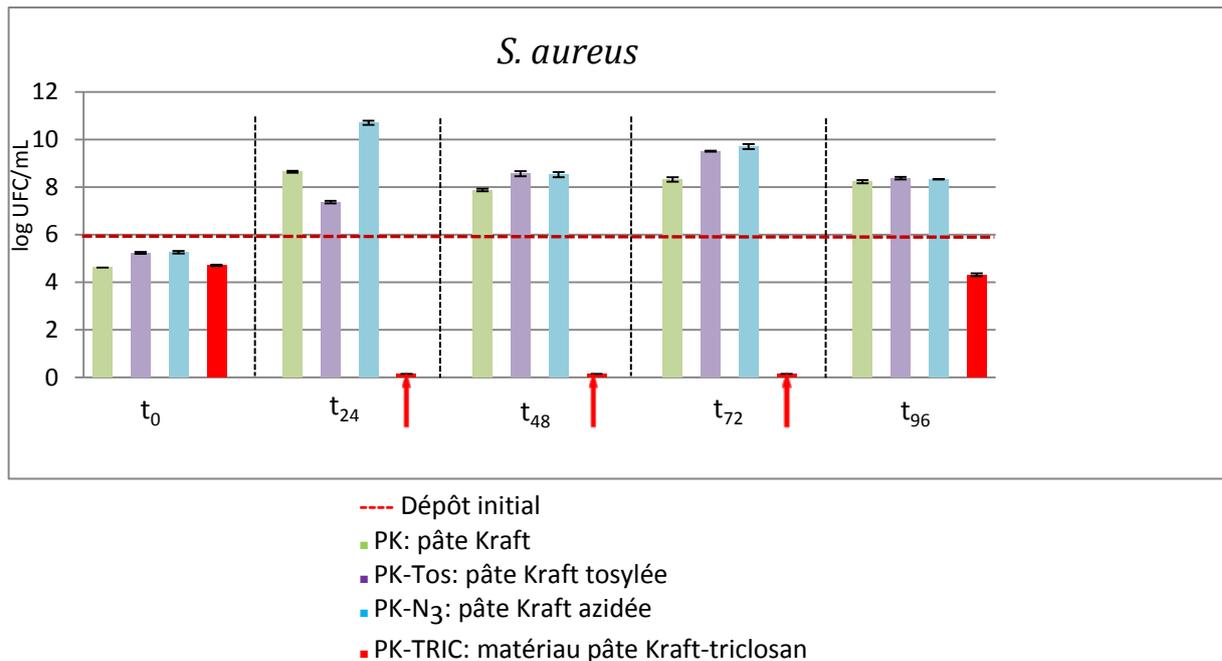


Figure IV:13 Activité antibactérienne du matériau « pâte Kraft-triclosan » à t₉₆ sur *S. aureus*.

Afin de vérifier la première hypothèse sur le développement d'une résistance, une culture bactérienne a été réalisée à partir d'une colonie de la condition t₉₆ afin d'évaluer la sensibilité de ces bactéries t₉₆ sur un nouveau disque de pâte Kraft-Triclosan. 100 µl de la suspension bactérienne t₉₆ (10⁵ CFU/mL) sont déposés sur un nouveau disque de pâte Kraft-Triclosan puis mis à incuber à 37°C pendant 24h. D'une manière similaire, la même opération a été effectuée avec une suspension bactérienne de *S. aureus*, qui n'a jamais été mis en contact avec un support Triclosan. Cet essai a été réalisé avec le même protocole basé sur la norme AATCC100.

Après 24h de contact, une croissance bactérienne a seulement été observée pour les bactéries t₉₆. Ce résultat semble indiquer que la souche *S. aureus* a développé une résistance à l'activité biologique du Triclosan qui n'est dénombrable qu'après 72h de contact avec le support de pâte Kraft-Triclosan.

Pour la souche *B. cereus*, à t₂₄, t₄₈, t₇₂ et t₉₆, une croissance bactérienne a été observée pour les différents témoins par rapport à t₀. Pour le support pâte Kraft-Triclosan, aucune bactérie n'a été dénombrée à t₂₄ et t₄₈. Cependant, à t₇₂ et t₉₆, une croissance bactérienne

est observée dont l'origine peut être expliquée de la même manière que pour *S. aureus* (Figure IV:14).

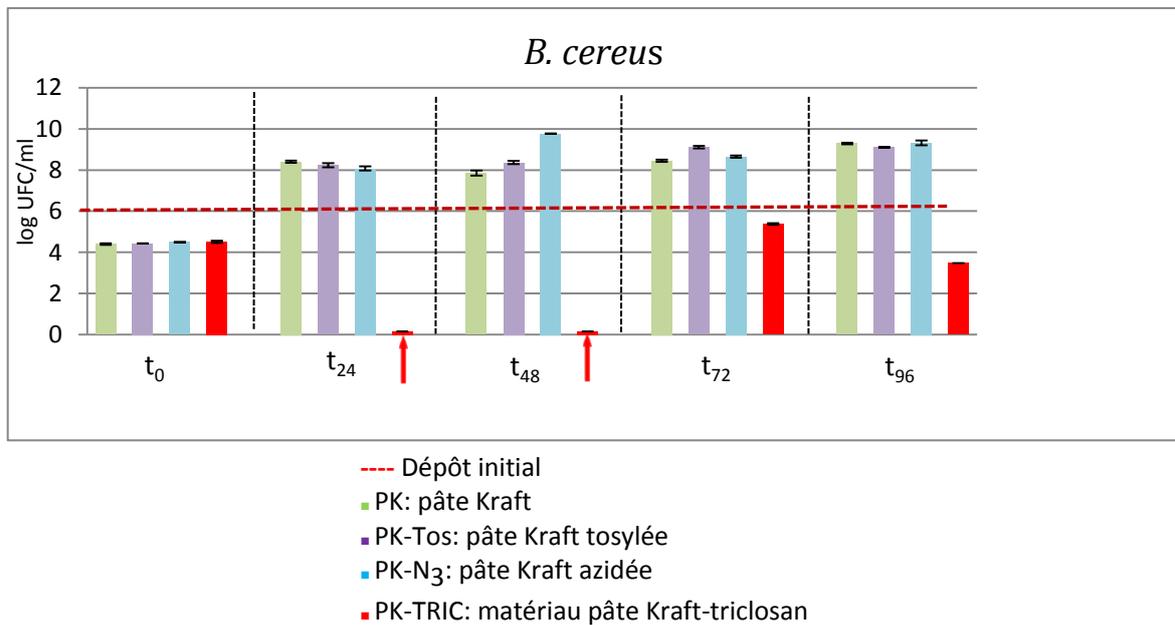


Figure IV:14 Activité antibactérienne du matériau « pâte Kraft-triclosan » à t₉₆ sur *Bacillus cereus*.

Des expériences complémentaires sont à réaliser pour déterminer l'origine de la croissance bactérienne à t₇₂ et t₉₆.

V. PRÉPARATION ET ÉVALUATION BIOLOGIQUE DE MATERIAUX BIOACTIFS OBTENUS PAR GREFFAGE DE PORPHYRINES SUR DES FIBRES LIGNOCELLULOSIQUES

Les résultats obtenus avec la molécule de Triclosan ont motivé notre étude sur le greffage de macromolécules de type porphyrinique sur ce support cellulosique.

En effet, en nous basant sur le savoir-faire de notre laboratoire dans le domaine des porphyrines, nous avons procédé au cours de ce travail au greffage de deux types de porphyrine : une porphyrine cationique et une porphyrine neutre. Avant de voir plus en détail le greffage de ces porphyrines sur support cellulosique, une présentation va être dédiée aux généralités sur les porphyrines et les approches décrivant l'immobilisation de ces dernières sur des supports solides en vue d'une application antimicrobienne.

V.1 Les porphyrines

V.1.1 Structure des porphyrines

Les porphyrines sont des macrocycles fortement conjugués constitués de quatre unités pyrroliques liées entre elles par des ponts méthine. Le squelette de base est aromatique. L'aromaticité est due, conformément à la règle de Hückel, à un système de 18 électrons π (**Figure V:1**). De ce fait, ces macrocycles sont d'une part particulièrement stables et d'autre part très fortement colorés. En outre, les porphyrines se comportent en fonction du pH comme des diacides ou des dibases et peuvent alors être métallées par presque tous les métaux. Elles constituent sous cette forme d'excellents agents d'oxydoréduction, thermiques ou photochimiques.

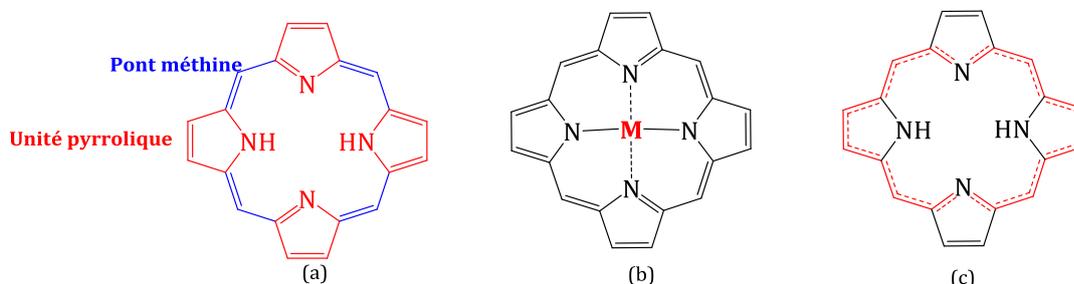


Figure V:1 (a) Porphyrine base libre ; (b) Porphyrine base métallée ; (c) Représentation du système de 18 électrons π aromatiques

Dans les années 30, le chimiste allemand Hans Fischer propose pour la première fois un système de nomenclature encore utilisé de nos jours pour désigner les porphyrines substituées sur les positions β -pyrroliques. Ainsi, les atomes de carbone des positions méthines, aussi appelées « *meso* » sont numérotés α , β , γ et δ et les carbones β -pyrroliques sont notés 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 et 8 (**Figure V:2**). Avec l'augmentation de la complexité des porphyrines synthétisées, une numérotation systématique du macrocycle a été adoptée en 1987. Les carbones *meso* portent alors les numéros 5, 10, 15, 20, les positions α et β des cycles pyrroliques sont notées respectivement 1, 4, 6, 9, 11, 14, 16, 19 et 2, 3, 7, 8, 12, 13, 17, 18 et enfin les numéros 21, 22, 23, 24 ont été attribués aux quatre atomes d'azote.

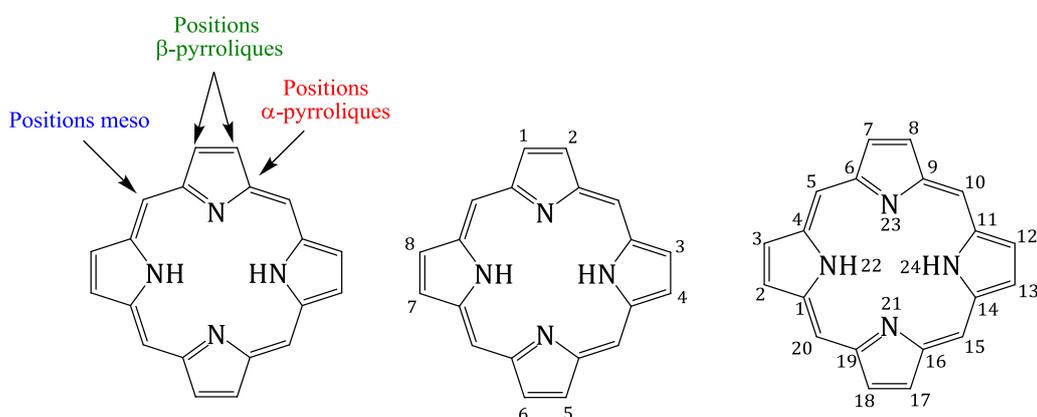


Figure V:2 Système de nomenclature conventionnel du macrocycle.

V.1.2 Caractérisation des porphyrines

V.1.2.1 Spectroscopie UV-Visible

Selon l'étymologie du mot « porphyrine », on constate qu'il provient du mot grec « *porphura* » qui désignait dans l'antiquité la teinte pourpre. Il n'y a donc rien d'étonnant à ce que les pionniers de la chimie des macrocycles tétrapyrroliques les aient dénommés ainsi, compte tenu de leur très forte coloration. En effet, parce que les porphyrines possèdent un système d'électrons π fortement conjugué, ces molécules absorbent dans le domaine du visible et présentent un spectre d'absorption très caractéristique. Il résulte de transitions $\pi \rightarrow \pi^*$ et se compose d'une bande intense ($\epsilon > 100000 \text{ L.mol}^{-1}.\text{cm}^{-1}$) entre 390 et 430 nm (proche UV) appelée **bande de Soret** (ou bande B) et de quatre

autres bandes situées entre 480 et 700 nm (Visible) d'intensité dix à vingt fois plus faible appelées **bandes Q**. La région du spectre située dans le domaine du visible, généralement sensible aux variations de structure, renseigne sur la substitution du macrocycle. En effet, les quatre bandes Q, numérotées de I à IV en partant des énergies les plus basses, voient leurs intensités relatives varier notablement en fonction de la nature et de la position des substituants [106] (**Figure V:3**).

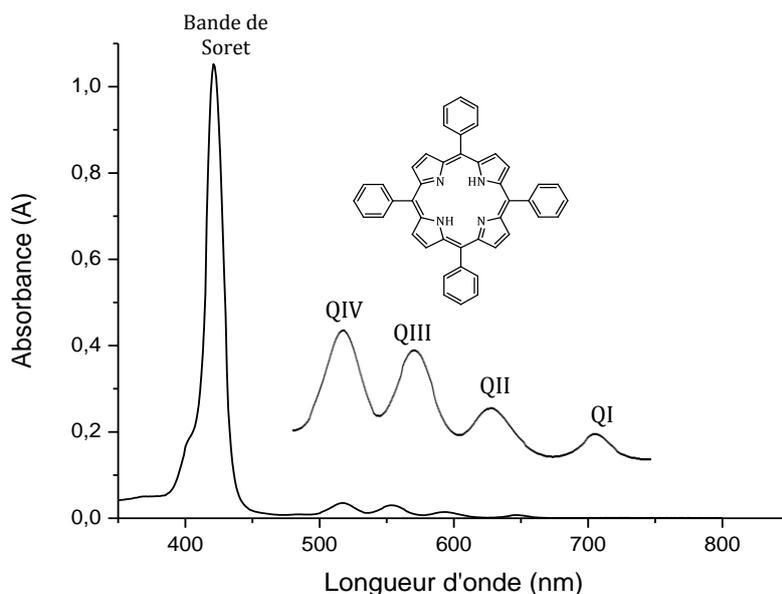


Figure V:3 Spectre UV-visible caractéristique d'une porphyrine base "libre" : la TPP (dans CHCl₃).

V.1.2.2 Résonance Magnétique Nucléaire : Spectroscopie RMN du proton

La RMN du proton appliquée aux macrocycles porphyriniques fournit des spectres très caractéristiques. Il arrive couramment qu'il ne soit pas possible d'expliquer le déplacement chimique uniquement à partir de l'électronégativité des groupements voisins. Ceci peut s'expliquer par un phénomène appelé anisotropie magnétique. De façon générale, on considère un proton dans un milieu sphérique qui est isotrope, c'est-à-dire qui possède les mêmes caractéristiques indépendamment de l'orientation. Si une distorsion existe dans la sphéricité du milieu dans lequel se trouve un proton, on remarquera alors un effet sur la constante d'écran. En effet, le courant de cycle induit par le champ magnétique imposé par l'appareil génère un important cône d'anisotropie

magnétique dont l'axe est perpendiculaire au plan du macrocycle (**Figure V:4**). Ainsi, les protons situés à l'intérieur de ce cône sont blindés par cette anisotropie magnétique alors que les protons situés à l'extérieur, dans le plan de la molécule, sont déblindés. Le spectre RMN est alors étendu sur une large zone de plus de 15 ppm [107].

Cette circulation d'électrons est appelée courant circulaire et génère un champ magnétique comme le ferait un courant électrique circulant dans une boucle de fil conducteur. Le champ magnétique généré occupe un volume spatial assez grand pour influencer le blindage des protons sur le cycle. Les protons, qui se trouvent à l'extérieur du cycle, sont alors déblindés par cette anisotropie magnétique et un déplacement chimique plus grand qu'envisagé est alors observé. Les zones propices au « blindage » ou au « déblindage » peuvent être visualisées par des cônes tels que représentés sur la **Figure V:4**.

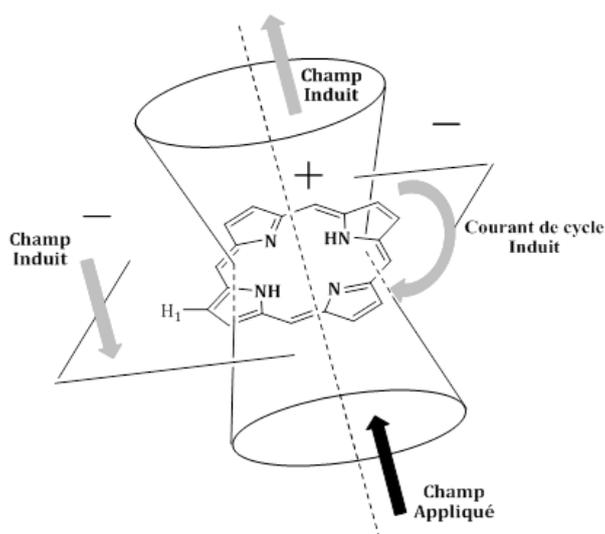


Figure V:4 Cône d'anisotropie magnétique d'une porphyrine..

V.2 Mise au point bibliographique : Les porphyrines et la lutte contre les proliférations bactérienne

La photosensibilisation des microorganismes a été décrite pour la première fois au début du 20^{ème} siècle, lorsqu'Oskar Raab a observé la phototoxicité de l'hydrochlorure d'acridine contre *Paramecia caudatum* [108]. Hermann von Tappeiner [109], a démontré que la présence d'oxygène est une condition essentielle pour la photosensibilisation et a confirmé que la désactivation des bactéries n'était pas due à la chaleur mais plutôt à

l'effet d'une activation à la lumière, d'où le terme de « réaction photodynamique ». Depuis la découverte de cette réaction photodynamique, beaucoup d'efforts de recherche ont été investis dans la photothérapie dynamique (PDT), particulièrement pour la détection des tumeurs et leur photo-destruction.

Ces travaux se sont étendus dans la lutte contre les proliférations microbiennes, donnant lieu à un nouveau type de traitement antimicrobien, la photochimiothérapie antimicrobienne (PACT).

V.2.1 La photochimiothérapie antimicrobienne (PACT)

La PACT est basée sur un effet photodynamique au cours duquel un photosensibilisateur (PS), en contact avec un microorganisme, est activé en présence d'une irradiation lumineuse de longueur d'onde appropriée. Cette irradiation va exciter le PS puis générer des espèces réactives dérivées de l'oxygène toxiques pour les cellules microbiennes [110]. Les principaux PS utilisés en PACT sont les porphyrines, les phthalocyanines, les chlorines, le Rose Bengale, les anthraquinones, les complexes au Ruthénium (II) et les phénothiazines. Ce sont des composés colorés capables de transférer l'énergie lumineuse absorbée à des molécules bioorganiques. L'absorption de la lumière visible se fait sur une gamme de longueur d'onde située entre 400 et 700 nm. Cette absorption fait passer le PS de l'état fondamental à un état électronique singulet excité, puis à l'état triplet par l'intermédiaire d'autres transitions (conversions intersystèmes). A l'état triplet, on peut distinguer deux types de mécanisme [111] (**Figure V:5**) : un mécanisme de type I (transfert d'électrons) et un mécanisme de type II (transfert d'énergie).

En effet, lors du mécanisme photochimique de type I, les molécules de PS réagissent avec des substrats ou des molécules bioorganiques tels que les constituants des membranes cellulaires des bactéries (phospholipides,...) et transfèrent un photon ou un électron pour former des radicaux libres ($\cdot\text{OH}$) et des ions radicalaires (ions superoxydes $\text{O}_2^{\cdot-}$). D'un autre côté, dans le mécanisme de type II, le PS excité peut transférer directement son énergie à l'oxygène moléculaire et produire des espèces réactives de l'oxygène capables de tuer des cellules microbiennes et des virus : il y a

production d'oxygène singulet ($^1\text{O}_2$). Les espèces réactives de l'oxygène (ROS) générées lors de l'irradiation du photosensibilisateur peuvent initier de multiples sites d'attaque : membranes cellulaires, protéines intracellulaires et ADN. Cette action sur plusieurs sites cellulaires rend improbable la mise en place de mécanismes de résistance durable contre le stress oxydatif induit par l'oxygène singulet [112].

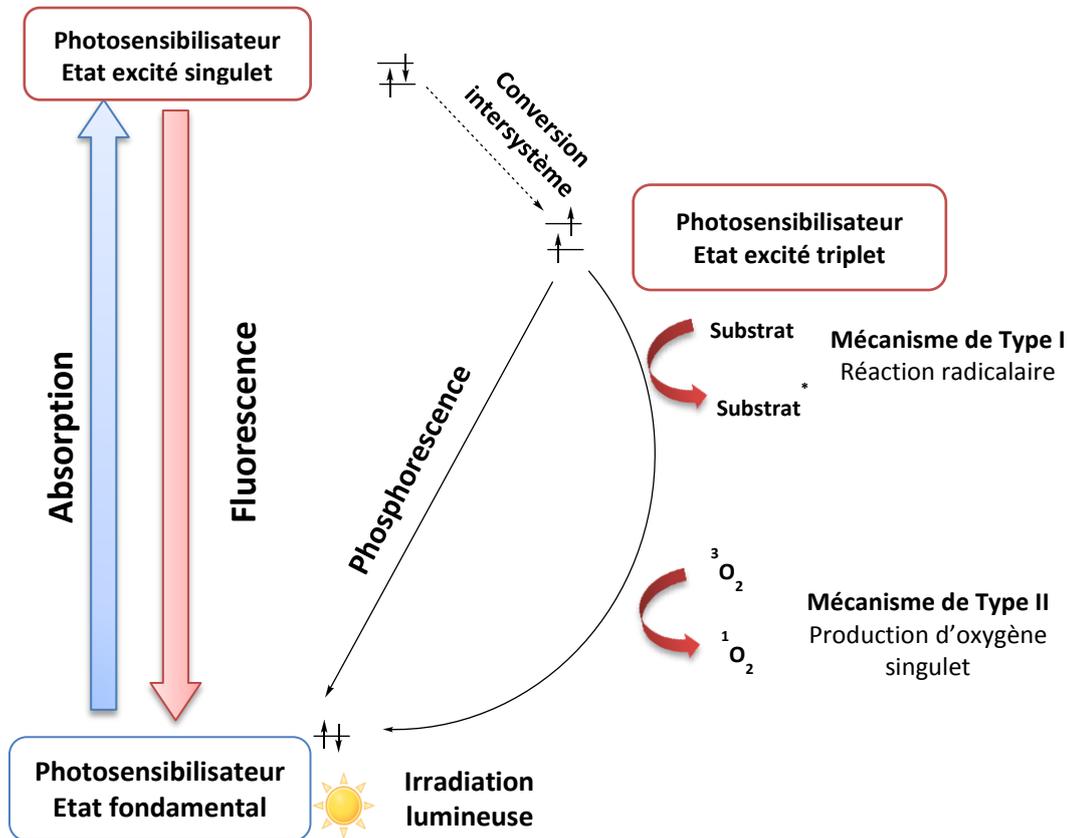


Figure V:5 Schéma de Jablonski représentant le processus impliqué dans la photothérapie [112].

V.2.2 Liaison des porphyrines aux cellules microbiennes

Dans la plupart des cas, les bactéries Gram (+) et Gram (-) sont sensibles à l'action bactéricide d'une large variété de photosensibilisateurs. De nombreuses études ont décrit l'inactivation photodynamique de souches telles que *E. coli*, *S. aureus*, *Streptococcus mutans*, *Porphyromonas gingivalis* et *P. aeruginosa*.

Cependant, d'autres études ont montré qu'il existe une différence fondamentale quant à la sensibilité des bactéries Gram (+) et des bactéries Gram (-) à la PACT (**Figure V:6**).

En effet, les bactéries Gram (+) sont plus sensibles à l'inactivation générée par la PACT du fait de la structure de leur paroi. La paroi possède une structure relativement

poreuse et perméable aux nutriments, aux glycopeptides et aux polysaccharides de poids moléculaire situés entre 30000 et 60000 Da. Elle permet ainsi la pénétration des PS [113]. A l'opposé, les bactéries Gram (-) sont moins sensibles à la PACT. En effet, la présence d'une fine couche de peptidoglycane et de deux membranes phospholipidiques rend difficile la pénétration de certains PS et d'espèces réactives photo-induites [114]. Seuls des composés hydrophiles de poids moléculaire inférieur à 600-700 Da peuvent diffuser à travers les canaux des porines localisées dans la paroi extérieure [115].

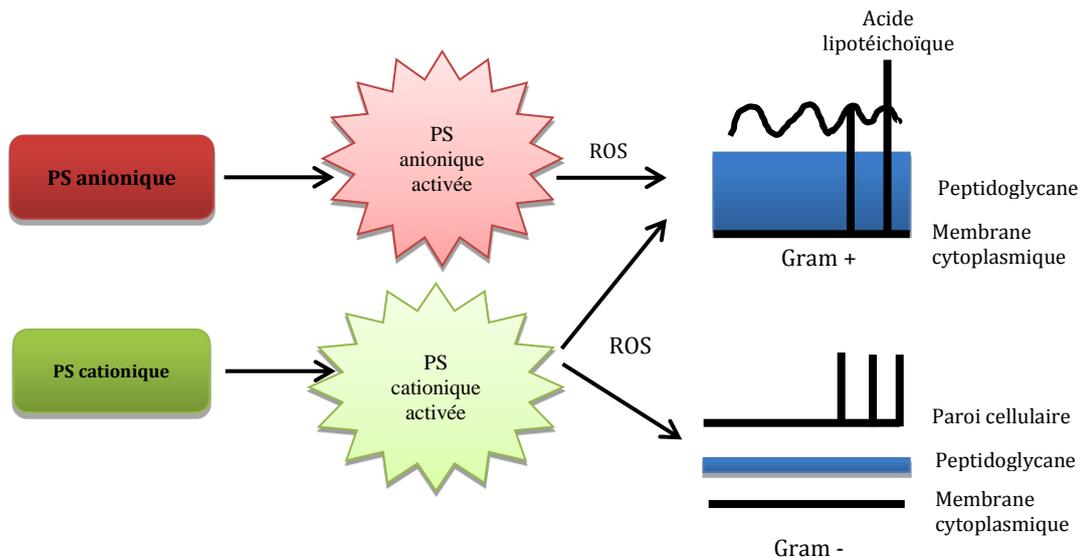


Figure V:6 Différence de réactivité des PS vis-à-vis de souches bactériennes Gram (+) et Gram (-)

V.2.3 Les mécanismes possibles de la photoinactivation bactérienne

Nitzan et Malik ont proposé un mécanisme en 1990 décrivant la photoinactivation des cellules bactériennes [116], comportant quatre étapes (**Figure V:7**):

- Absorption de la porphyrine au niveau du glycocalyx qui est le « manteau » membranaire constitué de glucides fixés à la surface de la membrane cellulaire de la bactérie
- Fixation de la porphyrine à la membrane cellulaire, cette fixation peut être réalisée à l'obscurité et n'est pas toxique pour les bactéries.
- La porphyrine subit par la suite une translocation dans le cytoplasme.
- La photoinactivation des bactéries est réalisée ensuite par les porphyrines liées à la membrane cellulaire ou par celles présentes dans le cytoplasme

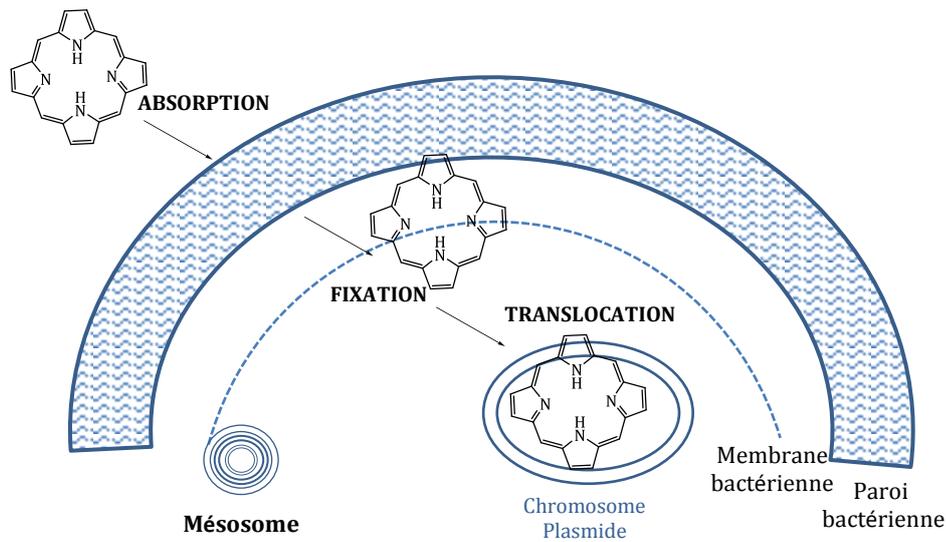


Figure V:7 Mécanisme proposé pour la photoinactivation des bactéries [116].

Le premier effet noté dans les cultures bactériennes traitées par les porphyrines et illuminées est une baisse de la croissance des cellules bactériennes, suivie d'une rapide mort cellulaire. Un autre site touché par le traitement photodynamique est la paroi bactérienne. En effet, il a été démontré que les réactions oxydo-dépendantes accrues par la photosensibilisation due aux porphyrines, induisent des désordres dans la synthèse des éléments constituant la paroi bactérienne (polymère, phospholipides,...). Des études menées par microscopie électronique à transmission ont révélé que la plupart des cellules traitées sont incapables d'accomplir la synthèse de leur glycocalyx ainsi que leur division cellulaire. De plus, durant le processus de mort cellulaire, la synthèse de l'ADN est immédiatement stoppée au début de l'interaction porphyrine-bactérie. Par conséquent, l'inhibition engendrée par les porphyrines affecte également la synthèse de l'ARN et donc des protéines.

V.2.4 2- Les supports antimicrobiens à base de porphyrines : Les surfaces photobactéricides

La PACT offre une stratégie alternative et prometteuse pour l'inactivation des microorganismes pathogènes. De nombreuses études ont décrit l'élaboration de surfaces photobactéricides consistant en la fixation de porphyrines sur des supports solides variés et suivant des approches physico-chimiques différentes (**Figure V:8**).

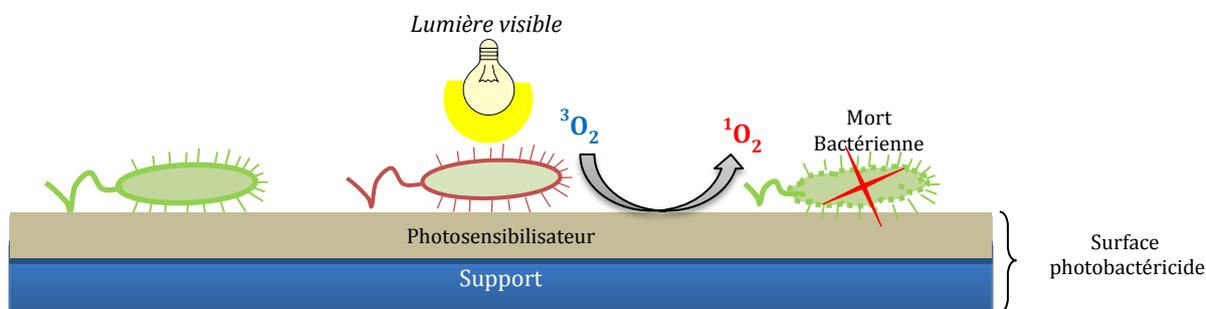
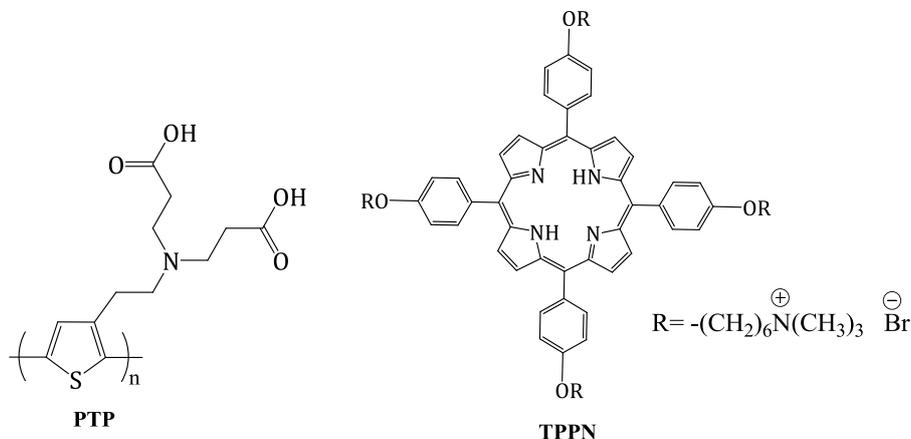
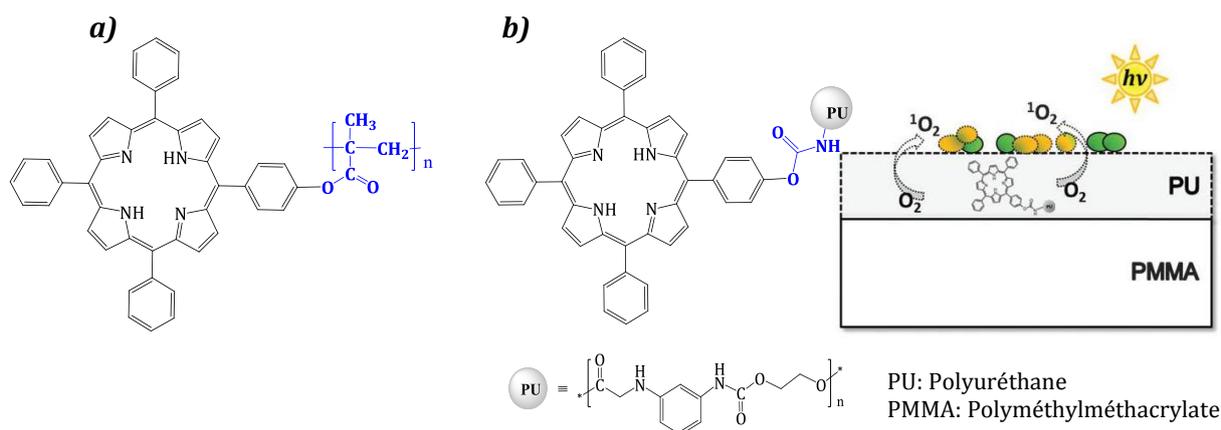


Figure V:8 Principe de la photochimiothérapie antimicrobienne (PACT)

Ces approches ont pour objet de conférer à la surface une capacité à combattre ou détruire les microorganismes sur un long terme.

Les porphyrines ont été liées à une grande variété de polymères synthétiques. Bonnet et coll. [117] ont par exemple immobilisé des porphyrines sur des films polymériques de méthylacrylate par polymérisation radicalaire et démontré l'action photobactéricide du matériau obtenu sur *S. aureus* (**Figure V:9 a**). Des travaux récents [118] ont décrit l'immobilisation d'une porphyrine dérivée de la *meso*-tétraphénylporphyrine, la TPP-OH. Celle-ci a été dissoute dans une solution à base de polyuréthane (PU). Une réaction de polymérisation se fait entre les groupements hydroxyles (-OH) de la porphyrine et les groupements isocyanates (-CNO) présents dans le polyuréthane. Le mélange est par la suite pulvérisé sur une fine couche de polyméthylméthacrylate (PMMA) d'environ 2 mm (**Figure V:9 b**). L'étude de l'activité antimicrobienne du matériau ainsi formé a révélé une phototoxicité de ce dernier envers la bactérie Gram (+) *S. aureus*. En effet, l'inactivation photodynamique a été conduite à des concentrations variables de PS et à différents temps d'exposition à la lumière. Le meilleur résultat est obtenu au bout de 30 min d'irradiation, avec une inhibition photodynamique de près de 99,9 %. De plus, le matériau possède l'avantage d'absorber continuellement l'énergie lumineuse, du fait de la photostabilité des porphyrines présentes dans le polyuréthane.



Les charges positives sur le complexe PTP/TPPN sont susceptibles de favoriser de fortes interactions électrostatiques avec les sites chargés négativement à la surface des bactéries Gram (+) ou Gram (-). Cela pourrait générer une activité antibactérienne efficace. Les tests réalisés sur *E. coli* et *B. subtilis* ont montré une activité

photosensibilisante du complexe PTP/TPPN avec près de 70 % de réduction de la viabilité bactérienne après seulement 5 min d'irradiation à une fluence de 27 J.cm².

Par ailleurs, les porphyrines ont été liées à des polymères naturels à des fins multiples. Plusieurs surfaces ont été développées en utilisant des porphyrines neutres, cationiques ou anioniques greffées de manière covalente sur supports naturels au sein de notre laboratoire.

Ringot et coll. [120,121] ont développé des surfaces photobactéricides en greffant de manière covalente des porphyrines anionique, neutre et cationique sur du coton sans modification préalable du support cellulosique en utilisant un lien 1,3,5-triazine (**Figure V:11**). Après 24 h d'exposition à une irradiation lumineuse, toutes les surfaces modifiées ont causé un effet photobactéricide envers *S. aureus*. Le matériau Coton-porphyrines cationiques a donné un meilleur résultat, soit 100 % d'inhibition de la croissance bactérienne, suivi par les matériaux Coton-porphyrines neutres (93,7%) et Coton-porphyrines anioniques (37 %).

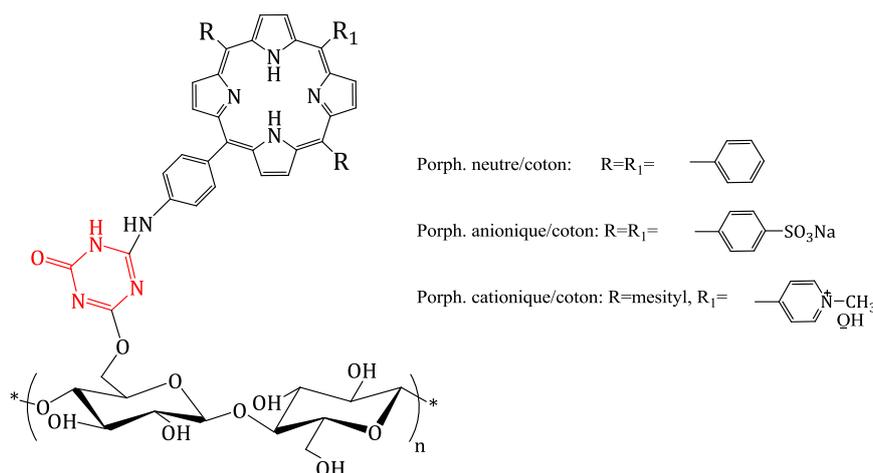


Figure V:11 Porphyrines neutres, anioniques et cationiques immobilisées sur du coton

Suivant une approche similaire, Mbakidi et coll. [122] ont récemment développé un nouveau papier antimicrobien en greffant une porphyrine tricationique, la 5-(4-aminophenyl)-10,15,20-tri(4-N-methylpyridyl)porphyrine sur des feuilles de papier filtre en utilisant le même lien triazine précédent. Les papiers obtenus ont été testés afin d'évaluer leurs propriétés antibactériennes sur deux souches, *E. coli* et *S. aureus*. Le matériau ne présente aucune activité antibactérienne en absence d'irradiation

lumineuse. En revanche, une fois éclairé, le matériau se révèle très efficace sur ces deux souches bactériennes en éliminant totalement les bactéries présentes à sa surface.

Toujours au sein du laboratoire, Krouit et coll. [123] ont pour leur part décrit le greffage d'un dérivé aminé de la protoporphyrine IX sur de la cellulose modifiées par l'acide polyacrylique par l'intermédiaire d'un lien amide. (**Figure V:12 b. et c.**) Après irradiation lumineuse, les films plastiques protoporphyriniques sont capables de détruire la souche *S. aureus*.

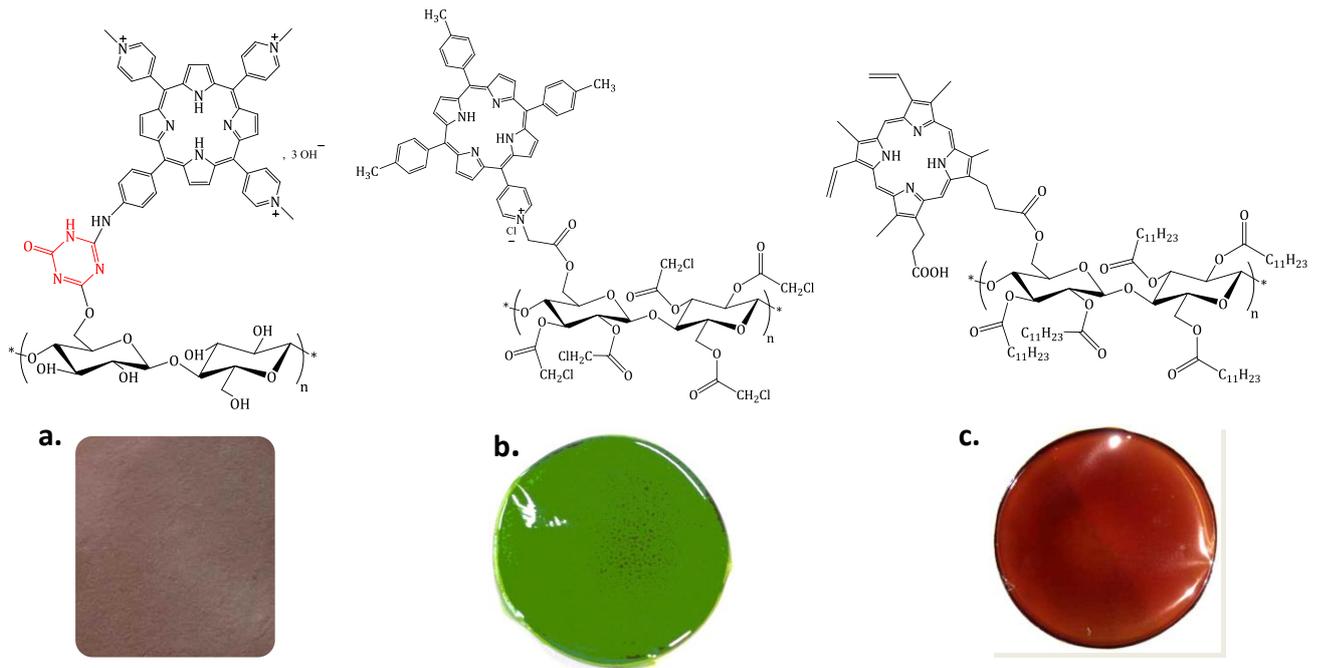


Figure V:12 a) la 5-(4-aminophenyl)-10,15,20-tri(4-N-méthylpyridyl)porphyrine greffée sur du papier filtre. (b) chloroacétate de cellulose pyridylporphyrinique cationique c) laurate de cellulose protoporphyrinique

Carpenter [124] et Feese [125] ont toutefois décrit l'utilisation des nanocristaux de cellulose (CNC) comme support pour la réalisation d'un matériau photobactéricide. Celui-ci a été réalisé à partir de l'attachement covalent de la [5,10,15-tri(4-N-méthylpyridyl)-20-(4-alkylphenyl)porphyrinato]zinc(II) sur une surface de nanocristaux de cellulose azidée par réaction de « Click-chemistry » (**Figure V:13**). L'activité photobactéricide des films de ce matériau a été testée contre plusieurs souches microbiennes telles que *A. baumannii*, *S. aureus* résistante à la méthicilline (MRSA), *P. aeruginosa*, *E. coli*, et *Mycobacterium smegmatis* (mycobactérie).

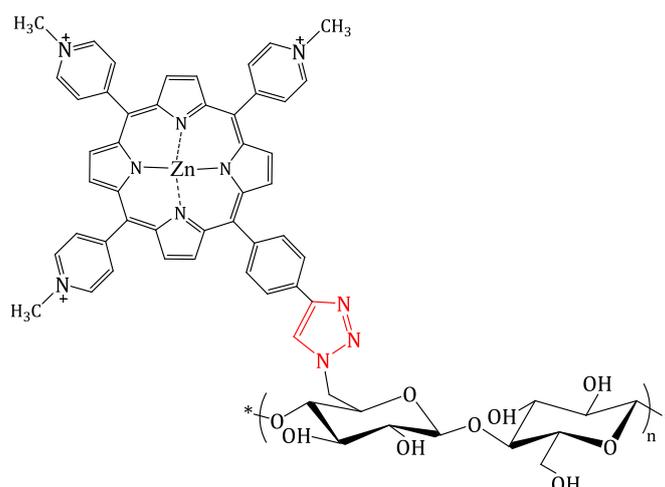


Figure V:13 Greffage de la [5,10,15-tri(4-N-méthylpyridyl)-20-(4-alkylphényl)porphyrinato]zinc(II)

L'illumination pendant 30 min, à la lumière blanche des souches bactériennes en présence du matériau CNC-Por, a montré une réduction notable de la croissance bactérienne du fait de la production d'une grande quantité d'espèces oxygénées réactives cytotoxiques, en particulier $^1\text{O}_2$.

D'un autre côté, Banerjee et coll. [126] ont mis au point l'attachement d'une protoporphyrine IX sur des nanotubes de carbones en vue d'élaborer un matériau aux propriétés antivirales. Des tests antimicrobiens du matériau obtenu ont été réalisés sur des souches virales du genre *Influenza*, des virus extrêmement contagieux dans la nature et qui causent des millions de morts chaque année. Au bout de 30 min d'exposition à la lumière visible, une réduction effective de la charge virale a été observée.

V.3 Elaboration de matériaux porphyriniques à partir de fibres lignocellulosiques

V.3.1 Elaboration de matériaux porphyriniques neutres à partir de fibres lignocellulosiques

Nous avons entrepris le greffage d'une porphyrine neutre. En 2009, des travaux réalisés au laboratoire par Boëns et coll. [127] ont décrit, *via* une variante de la méthode de Lindsey, la synthèse de porphyrines mono-fonctionnalisées dont la synthèse 5-(4-nitrophényl)-10,15,20-triphénylporphyrine. Ces travaux ont été mis au point en présence de quantités catalytiques d'iode moléculaire jouant le rôle de l'acide de Lewis ($\text{BF}_3 \cdot \text{OEt}_2$). Cette méthode présente l'avantage d'utiliser des réactifs et des solvants non distillés. L'utilisation d'activations microondes a été nécessaire pour obtenir la porphyrine avec un temps de réaction très court.

V.3.1.1 Stratégie de synthèse

La stratégie mise en place lors de ces travaux est présentée sur le **Schéma V:1**. La première partie est la synthèse de la 5-(4-nitrophényl)-10,15,20-triphénylporphyrine suivie de la réduction du groupement nitro pour donner une fonction amine. Après formation d'un sel de diazonium, on procède à une substitution nucléophile pour fixer un groupement azoture. Par ailleurs, le groupement propargyle est fixé sur de la pâte Kraft avant de procéder au couplage de la porphyrine azidée et de la pâte Kraft propargylée comme précédemment par réaction de cycloaddition d'un azide et d'un alcyne, catalysée par le cuivre (CuAAC). Nous commencerons par décrire la synthèse des deux substrats de départ.

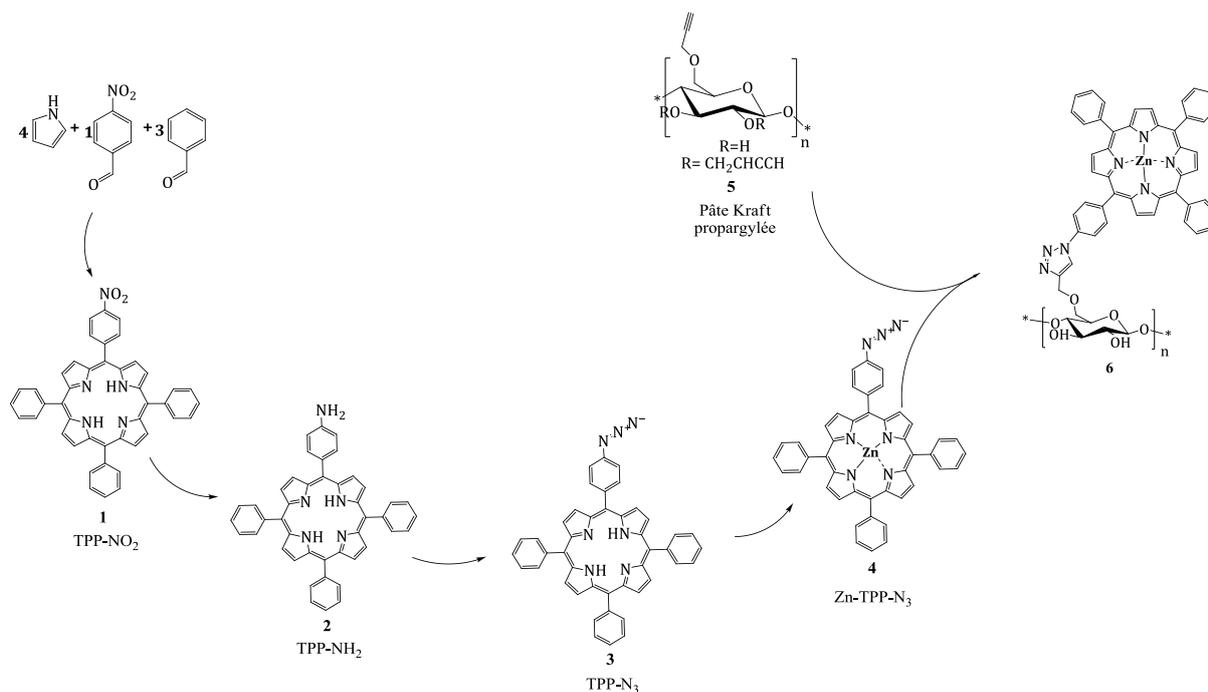


Schéma V:1 Stratégie de greffage de la porphyrine neutre sur les fibres lignocellulosiques

V.3.1.2 Synthèses

V.3.1.2.1 Synthèse de la 5-(4-nitrophényl)-10,15,20-triphénylporphyrine

La synthèse de la 5-(4-nitrophényl)-10,15,20-triphénylporphyrine est réalisée par condensation du pyrrole et du benzaldéhyde sur le 4-nitrobenzaldéhyde [127], dans le dichlorométhane et en présence de diiode, jouant le rôle de catalyseur. L'oxydation du porphyrinogène est ensuite réalisée sous irradiations microondes en présence de *para*-chloranil. (Figure V:14).

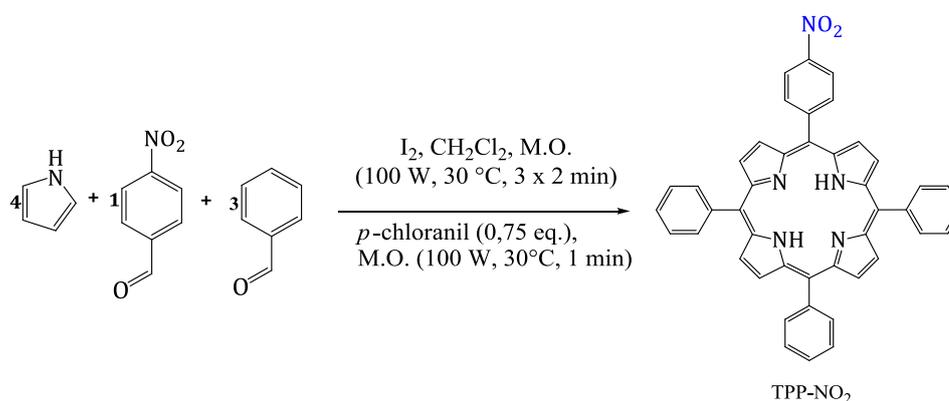


Figure V:14 Synthèse directe de la TPP-NO₂

Les composés nitrés obtenus sont séparés par chromatographie-éclair sur colonne de silice en utilisant un gradient de solvants dichlorométhane/éther de pétrole. La tétraphénylporphyrine est récupérée en premier lieu puis dans l'ordre les porphyrines mono, di et tri nitrées. La TPP-NO₂ a été obtenue sous la forme d'un solide violet avec un rendement de 22 %. Les rendements des co-produits isolés lors de la purification sont consignés dans le tableau ci-dessous (**Tableau V:1**) :

Tableau V:1 Rendements des produits obtenus après purification

TPP	TPP-NO ₂	TPP-(NO ₂) ₂	TPP-(NO ₂) ₃
25 %	22 %	18 %	4 %

Le spectre RMN ¹H présente trois familles de signaux. Les protons β-pyrroliques résonnent vers 8,89 ppm sous la forme d'un doublet et les NH pyrroliques à -2,78 ppm, fortement blindés. Pour les protons aryles, les couples H_{3,5} résonnent à 8,62 ppm, moins blindés que ceux H_{2,6} résonnant à 8,40 ppm subissant fortement l'effet attracteur du groupement *nitro*. Les protons phényles quant à eux présentent deux types de signaux avec les couples H_{2,6} et H_{3,4,5} résonnant respectivement à 8,21 ppm et 7,76 ppm.

L'analyse spectroscopique UV-Visible de la TPP-NO₂ dans le chloroforme, révèle différentes bandes caractéristiques correspondant à l'absorption du PS. En effet, une forte bande apparaît vers 424 nm (bande de Soret) et quatre autres bandes d'intensités plus faibles vers 518, 554, 594, 645 nm, correspondant aux bandes QIV, QIII, QII et QI (**Figure V:15**).



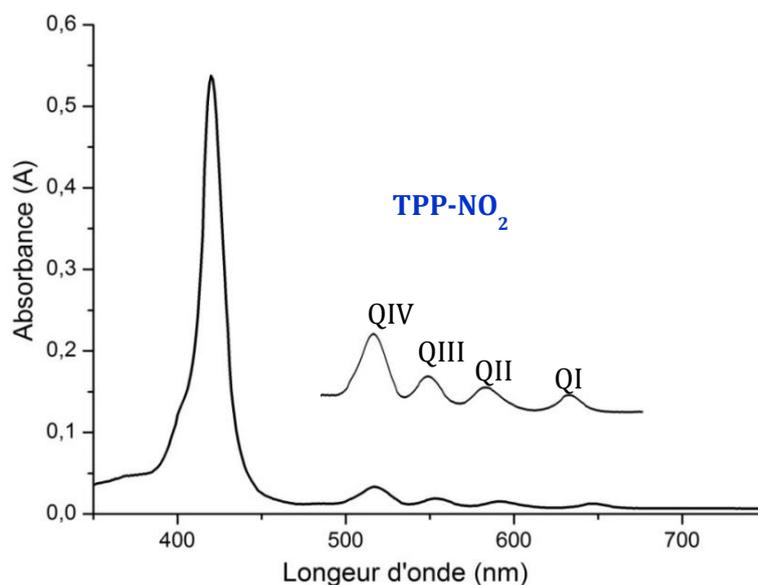


Figure V:15 Spectre UV-visible de la TPP-NO₂

V.3.1.2.2 Réduction de la 5-(4-nitrophényl)-10,15,20 triphénylporphyrine

La réduction de la TPP-NO₂ est effectuée dans un mélange acide chlorhydrique/acide acétique/chloroforme à reflux pendant 96 h (**Schéma V:2**) [128].

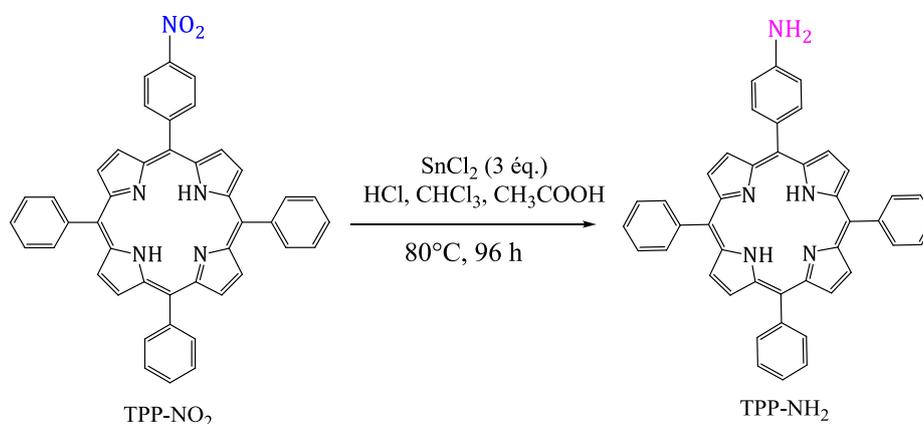


Schéma V:2 Synthèse de la TPP-NH₂

Après retour à température ambiante puis neutralisation avec une solution de soude et purification, la TPP-NH₂ est isolée avec un rendement de 92 %.

L'analyse par RMN ¹H confirme la structure du produit. Les protons β-pyrroliques sont de trois types et différent entre eux du fait d'un effet mésomère donneur provoqué par le groupement -NH₂. En effet, deux protons H_β, résonnant à 8,84 ppm sous la forme d'un

doublet apparaissent plus blindés que deux autres présents à 8,94 ppm avec une figure similaire. Par ailleurs, quatre autres protons apparaissent sous la forme d'un singulet élargi à 8,82 ppm, tandis que les protons NH pyrroliques situés dans le cône d'anisotropie, fortement blindés, résonnent à -2,75 ppm. Pour les protons aryles, les couples H_{3,5} résonnant à 7,04 ppm, sont plus blindés que ceux H_{2,6} résonnant à 7,98 ppm à cause de l'effet donneur de NH₂. Les protons phényles pour leur part présentent trois types de signaux avec les couples H_{2,6} et H_{3,5} résonnant respectivement à 8,22 ppm et 7,77 ppm et les protons de -NH₂, assez blindés à 3,90 ppm. On souligne ici un léger blindage sur ces positions, comparativement à celles de la TPP-NO₂.

L'analyse des spectres UV-visible mesurés dans le chloroforme révèle la présence d'une bande de Soret intense à 421 nm et les quatre bandes Q situés à 507, 521, 555 et 592 nm (**Figure V:16**). Les bandes sont déplacées vers de plus faibles longueurs d'ondes par rapport au composé précédent, il s'agit d'un effet hypsochrome.

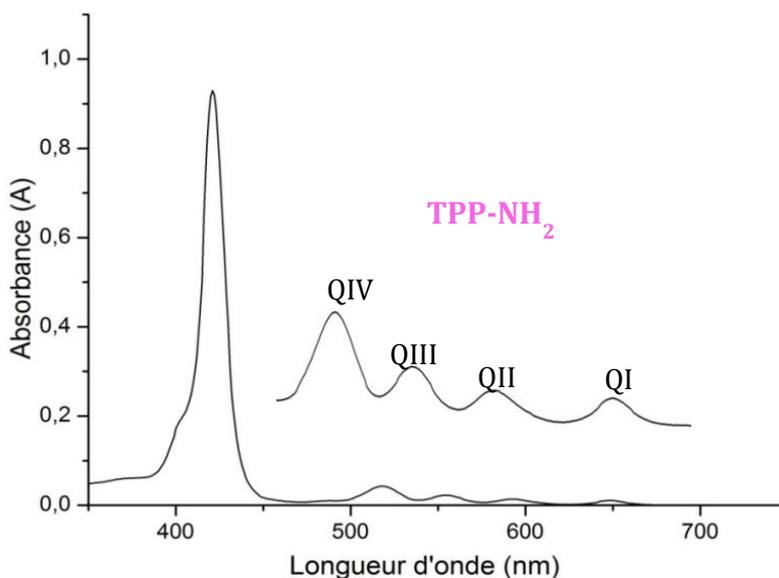


Figure V:16 Spectre UV-visible de la TPP-NH₂

V.3.1.2.3 Synthèse de la 5-(4-azidophényl)-10,15,20-triphénylporphyrine

La synthèse de la porphyrine azidée (TPP-N₃) suit le processus réactionnel de Sandmeyer décrit par Rocheford et Galoppini [129]. La TPP-NH₂ est préalablement solubilisée en présence d'acide chlorhydrique, puis mise à réagir à 0°C avec du nitrite de sodium afin de former un réactif intermédiaire, le sel de diazonium. L'ajout d'azoture de sodium au mélange par la suite, conduit par substitution nucléophile sur aromatique au produit azidé (**Schéma V:3**) qui, après traitement et purification, est isolé sous l'aspect d'un solide violet avec un rendement de 91 %.

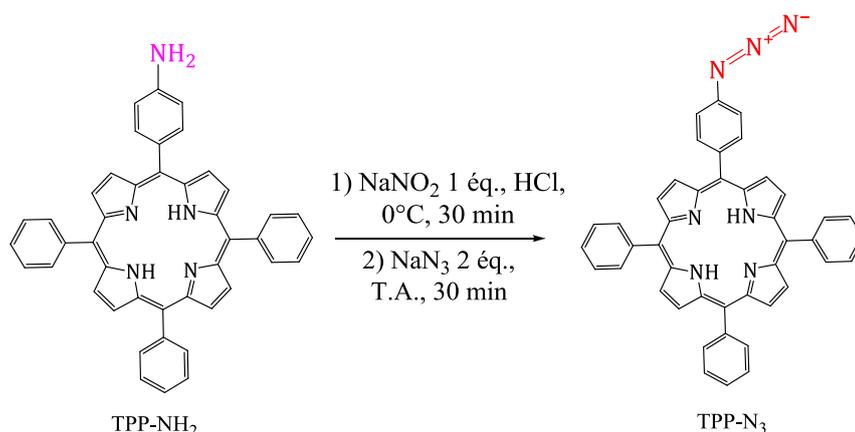


Schéma V:3 Synthèse de la TPP-N₃

L'analyse par spectroscopie infrarouge révèle la présence de deux bandes caractéristiques du groupement azoture à 2086 et 2122 cm⁻¹ (**Figure V:17**). L'analyse par RMN ¹H confirme la structure.

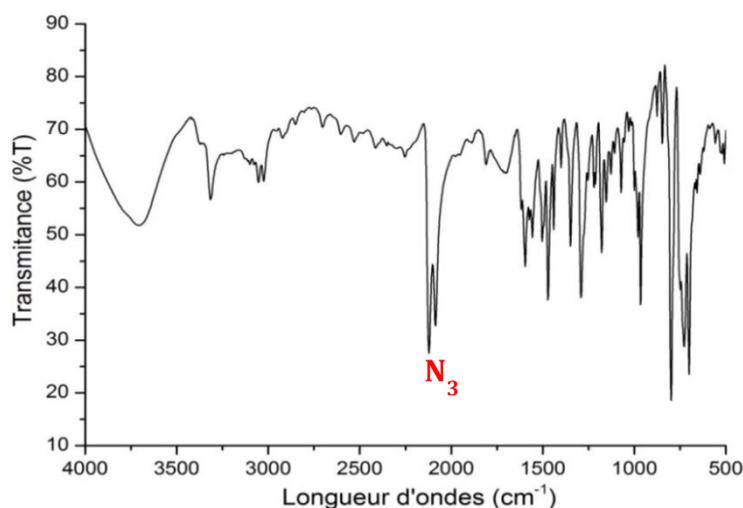


Figure V:17 Spectre de la porphyrine azidée

L'analyse du spectre UV-visible mesurés dans le chloroforme révèle la présence d'une bande de Soret intense à 421 nm et les quatre bandes Q situés à 450, 485, 517 et 553 nm (**Figure V:18**).

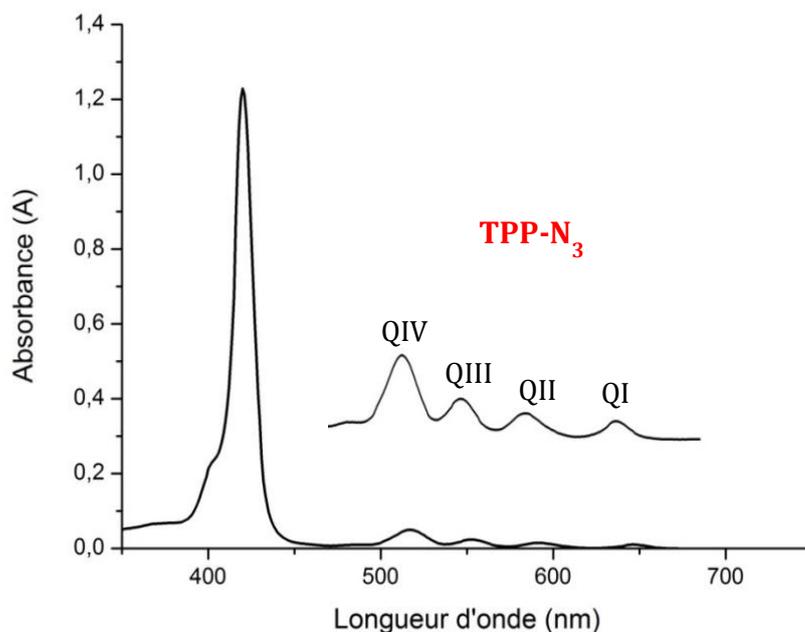
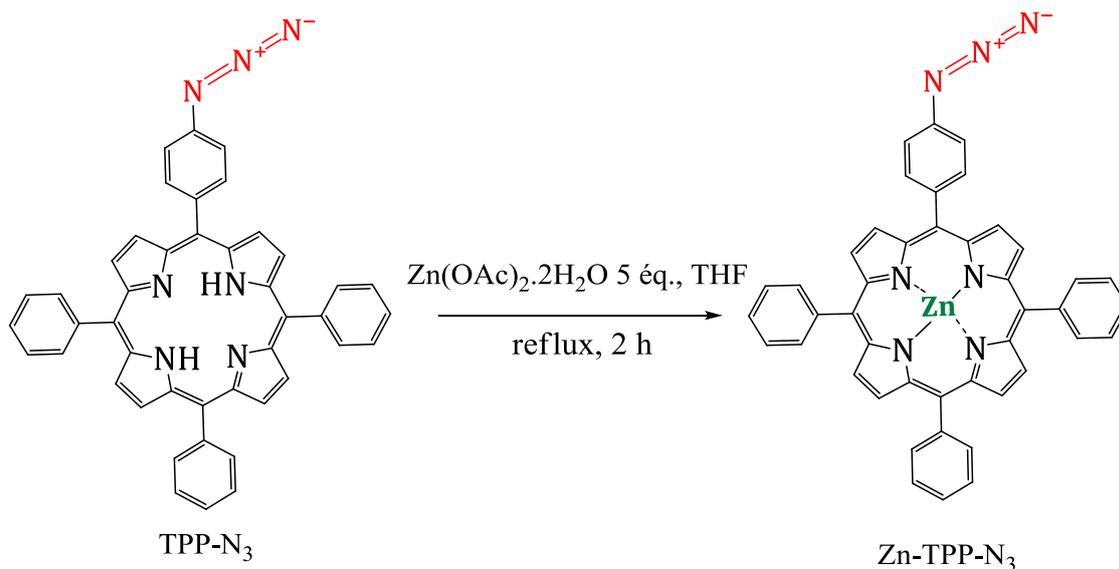


Figure V:18 Spectre UV-Visible de la TPP-N₃

V.3.1.2.4 Métallation de la 5-(4-azidophényl)-10,15,20-triphénylporphyrine au zinc

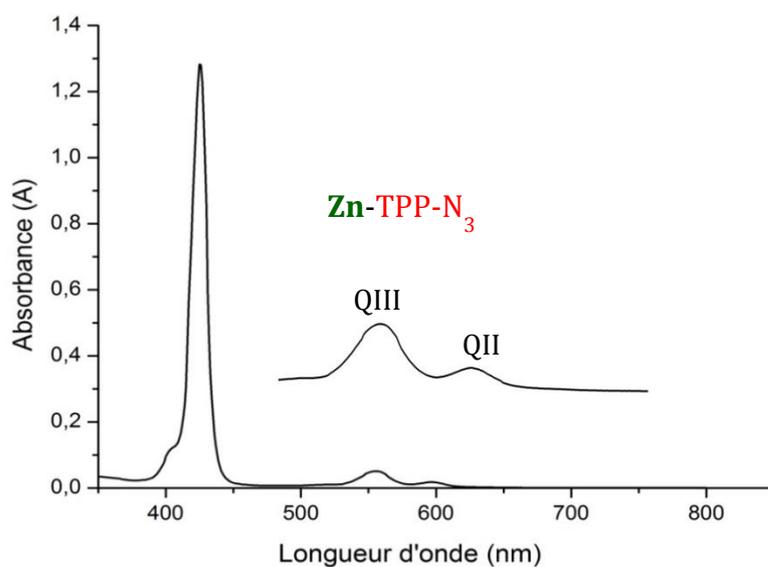
La réaction de cycloaddition sera réalisée en présence de sel de cuivre. Afin d'éviter la métallation de la TPP-N₃ par le cuivre, nous l'avons préalablement chélaté par le zinc avant la réaction de fixation sur la pâte Kraft. Cela permet d'éviter la présence d'un effet antibactérien secondaire qui pourrait être due au cuivre et l'inhibition du photosensibilisateur (**Schéma V:4**).



Sch\u00e9ma V:4 Formation de la Zn-TPP-N₃

La m\u00e9tallation est r\u00e9alis\u00e9e en traitant la porphyrine azid\u00e9e \u00e0 l'abri de la lumi\u00e8re dans le THF \u00e0 reflux avec un exc\u00e8s d'ac\u00e9tate de zinc. Apr\u00e8s traitement au chloroforme et \u00e0 l'eau, le produit est obtenu sous l'aspect d'un solide violet avec un rendement de 86 %.

La caract\u00e9risation par spectroscopie UV-Visible du produit dans le chloroforme met en \u00e9vidence la disparition des bandes QIV et QI, spectre caract\u00e9ristique des porphyrines m\u00e9tall\u00e9es (**Figure V:19**).



V.3.1.2.5 Préparation de la pâte Kraft propargylée

Nous avons réalisé la propargylation de la pâte Kraft dans le système aqueux, suivant les travaux réalisés au sein du laboratoire par Faugeras et coll. [97,130]. La réaction est réalisée dans le même système NaCl /H₂O décrit précédemment (**Schéma V:5**). Pour cela, les fibres lignocellulosiques sont dispersées comme précédemment dans une solution aqueuse de chlorure de sodium puis congelées. Après 24 h, l'ensemble est décongelé puis dilué. Par la suite, on additionne 5 équivalents de bromure de propargyle au milieu réactionnel.

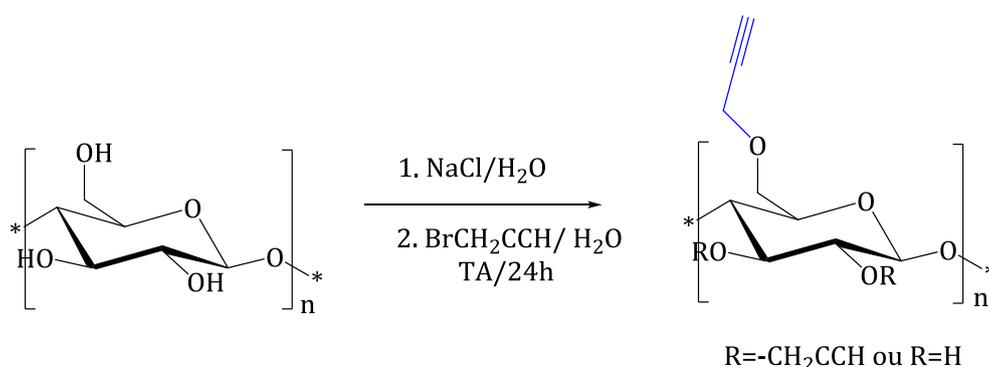


Schéma V:5 Propargylation de la pâte Kraft dans le système NaCl/H₂O

Après 24h de réaction sous agitation mécanique, le milieu réactionnel est filtré puis les fibres sont lavées à l'eau et à l'éthanol puis séchées à l'étuve à 60°C. Le produit est obtenu, sous la forme de fibres blanches, avec un rendement massique de 99 %.

L'analyse par spectroscopie infrarouge révèle la présence d'une bande à 2119 cm⁻¹ (**Figure V:20**), correspondant à la fréquence de vibration d'élongation de la triple liaison du propargyle.

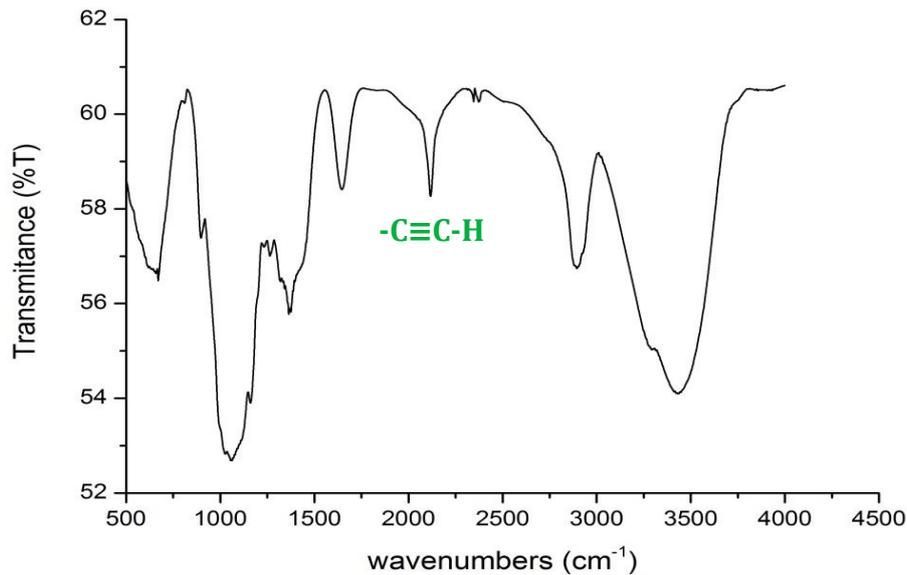


Figure V:20 Spectre IR de la pâte Kraft propargylée

Les fibres modifiées ont été analysées par spectrométrie XPS. L'analyse révèle la présence d'oxygène et de carbone à 531 eV (O_{1s}) et 285 eV (C_{1s}) respectivement, le groupement propargyle étant composé uniquement de carbone et d'hydrogène (**Figure V:21**).

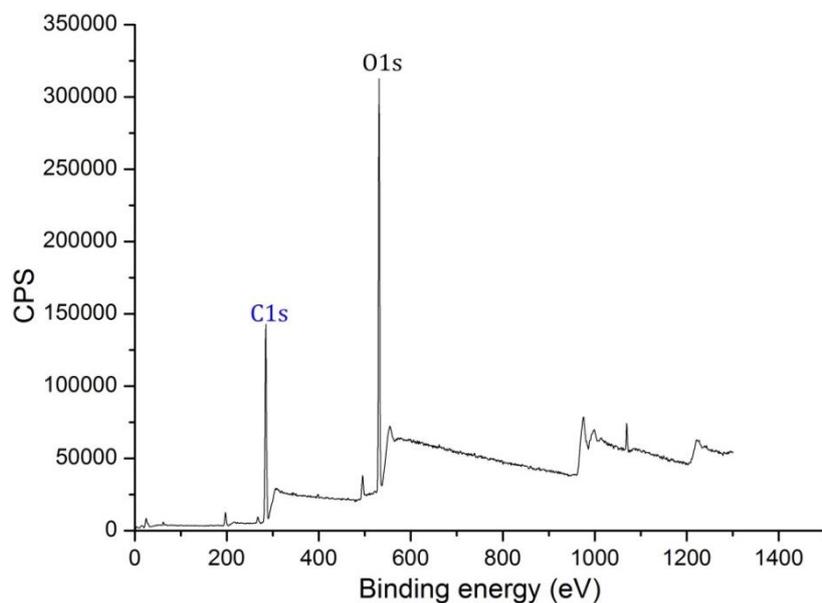


Figure V:21 Spectre XPS de la pâte Kraft propargylée

Nous pouvons observer à partir du rapport C/O dans le **Tableau V:2** que le pourcentage atomique de carbone présent sur la pâte Kraft propargylée est nettement supérieur à

celui de la pâte Kraft non greffée. Cette observation confirme le greffage des groupements propargyles sur les fibres.

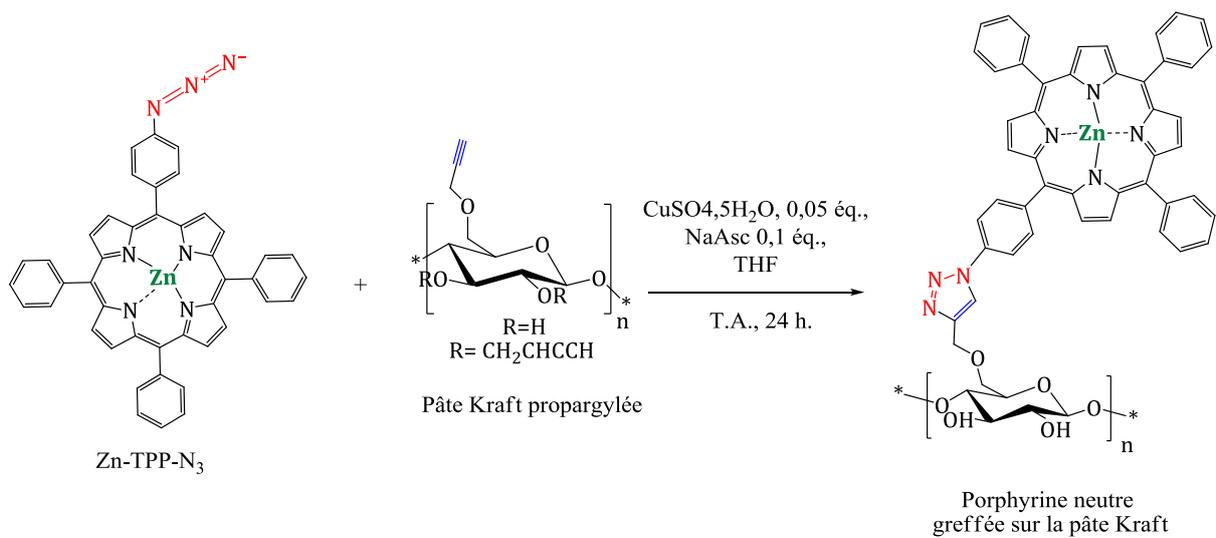
Tableau V:2 Pourcentages atomiques en C et en O avant et après modification chimique des fibres

Echantillons	C (%)	O (%)	C/O
Pâte Kraft	59,89	40,11	1,49
Pâte Kraft propargylée	65,44	34,56	1,89

Une des caractéristiques typiques des analyses XPS est la contamination superficielle des échantillons à l'air par le carbone. A noté que le carbone est souvent observé en XPS même sur des échantillons qui n'en contiennent pas. Il est pratiquement impossible d'éviter cette contamination. Ce qui conduit à l'observer toujours en excès par rapport au pourcentage réel. En absence d'autres atomes que l'oxygène et le carbone pouvant être pris comme référence, il convient d'estimer le pourcentage de carbone en excès (d'oxygène en défaut) à partir des analyse XPS de la pâte Kraft non modifiée et d'en tenir compte dans les calculs des DS. De plus dans notre cas la pâte Kraft est assimilée à de la cellulose bien qu'elle comporte 3,5 % de lignine. En tenant compte de l'analyse XPS de la pâte non modifiée, le DS calculé est de 0,5.

V.3.1.2.6 Réaction de cycloaddition entre la pâte Kraft propargylée et la porphyrine neutre.

A température ambiante, la pâte propargylée (DS= 0,5), le sulfate de cuivre et l'ascorbate de sodium sont solubilisés dans de l'eau, puis la TPP-N₃ préalablement solubilisée dans du THF est ajoutée au mélange. (**Schéma V:7**). Après 24 heures de réaction, la pâte est filtrée, puis plusieurs lavages sont effectués jusqu'à obtention d'un filtrat incolore.



Sch\u00e9ma V:6 Greffage de la TPP-N₃ sur la p\u00e2te propargyl\u00e9e

La p\u00e2te \u00e0 papier fonctionnalis\u00e9e est obtenue avec une coloration violette prononc\u00e9e avec un rendement massique de 105 % (**Figure V:22**).



Figure V:22 (a)-P\u00e2te propargyl\u00e9e et (b)- P\u00e2te apr\u00e8s greffage de la Porphyrine neutre

L'analyse par spectrom\u00e9trie XPS du mat\u00e9riau obtenu r\u00e9v\u00e8le la pr\u00e9sence de zinc, d'oxyg\u00e8ne, de carbone et d'azote, \u00e0 1020 (Zn_{2p}), 531,00 (O_{1s}), 285,00 (C_{1s}), 399 (N_{1s}) respectivement (**Figure V:23**).

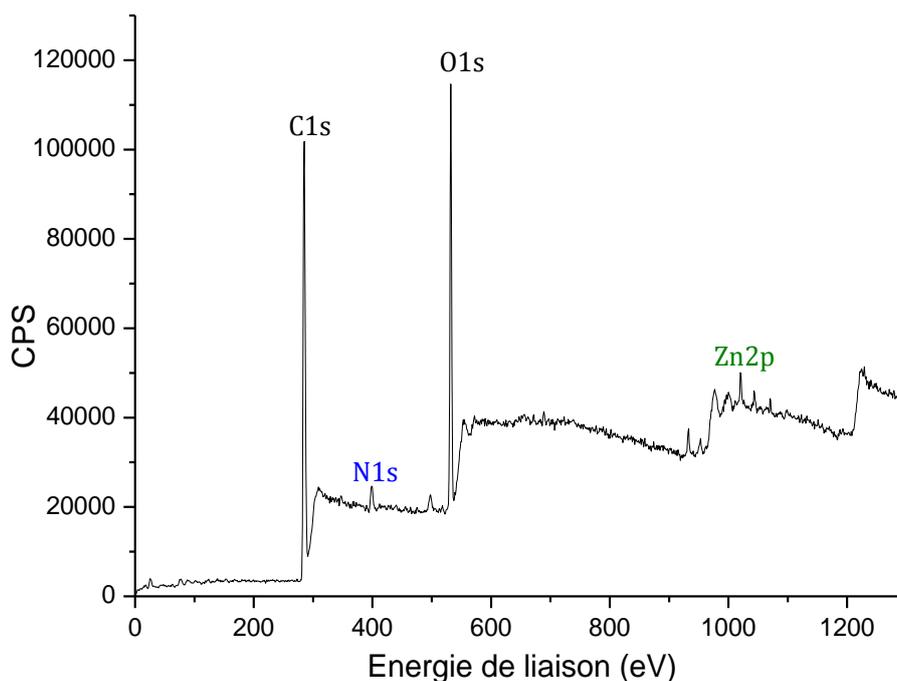


Figure V:23 Spectre XPS du matériau porphyrinique neutre

L'apparition des pics de pourcentage atomique correspondant au zinc et à l'azote sur le spectre confirme le greffage. Le taux de fixation de la porphyrine a été déterminé par analyse XPS en prenant comme base le zinc et l'on obtient un DS de l'ordre de 0,04, ce qui traduit un faible greffage du photosensibilisateur malgré une coloration prononcée (**Tableau V:3**).

Tableau V:3 Pourcentages atomiques des éléments constituant les matériaux lignocellulosiques avant et après réaction de couplage

Echantillon	C (%)	O (%)	N (%)	Zn (%)	DS XPS
Pâte Kraft prop.	65,44	34,56	-	-	0,5
Porph. Neutre greffée	75,69	21,09	2,53	0,17	0,04

Avant de procéder à l'évaluation biologique du matériau obtenu, nous avons préparé un deuxième support porphyrinique.

V.3.2 Elaboration de matériaux porphyriniques cationiques à partir de fibres lignocellulosiques

Comme décrit précédemment, les porphyrines cationiques sont connues pour avoir un effet antimicrobien très important comparé à celui généré par les porphyrines anioniques et neutres. A cet effet, nous avons choisi de greffer une porphyrine cationique sur les fibres de pâte Kraft et évaluer l'activité microbiologique du matériau obtenu.

V.3.2.1 Stratégie de synthèse

La stratégie mise en place pour la synthèse de porphyrines cationiques est décrite dans le **Schéma V:7**. Nous avons choisi comme substrat de départ la tétrapyriddyloporphyrine commerciale. Celle-ci a été au préalable propargylée, puis métallée par le zinc avant d'être greffée par réaction de « Click chemistry » sur les fibres de pâte Kraft azidées

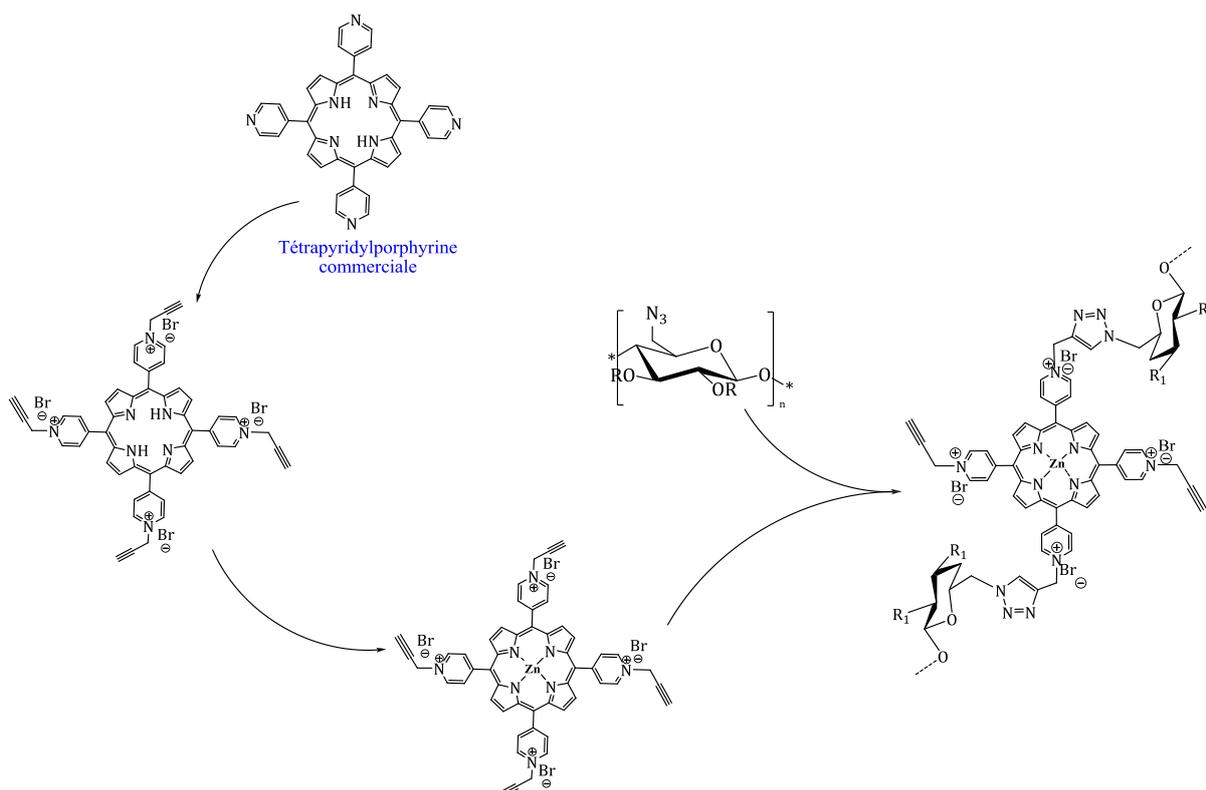


Schéma V:7 Synthèse du support porphyrinique cationique

V.3.2.2 Synthèse

V.3.2.3 Propargylation de la 5,10,15,20-Tetra(4-pyridyl)porphyrine (TPyP)

La propargylation de la tétrapyridylporphyrine (TPyP) est réalisée avec un large excès de bromure de propargyle dans le DMF et à température ambiante sous agitation magnétique (**Schéma V:8**).

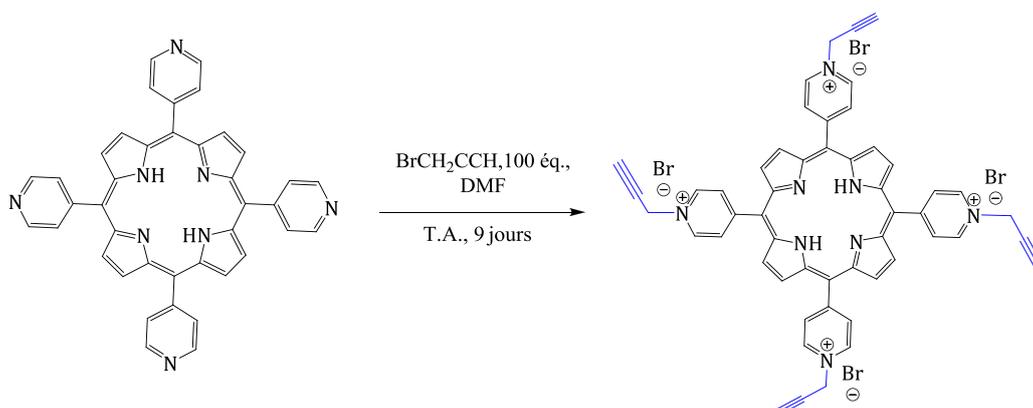


Schéma V:8 Propargylation de la TPyP

La réaction est suivie par CCM. Après 9 jours de réaction, on observe la disparition du produit de départ et des produits intermédiaires de mono, di et tri-propargylation. Le produit est précipité dans l'éther, filtré et les cristaux obtenus sont lavés avec le chloroforme. Le produit est obtenu avec un rendement quantitatif.

Le spectre IR du produit obtenu montre une bande à 2118 cm^{-1} dans la zone caractéristique d'élongation de la triple liaison.

L'analyse du spectre RMN ^1H réalisée dans le DMSO permet d'observer la fixation de 4 propargyles et confirme ainsi la structure du produit. En effet, l'étude du spectre permet de distinguer trois types de protons sur la molécule d'intérêt: les protons pyrroliques, pyridyles et propargyliques.

Les protons pyrroliques comprennent les β -pyrroliques qui résonnent vers 9,27 ppm sous la forme de singulets élargis et les NH pyrroliques, fortement blindés, qui résonnent en deux signaux sous la forme de singulets à -3,06 et -3,07 ppm. Pour les protons pyridyles, les couples $\text{H}_{3,5}$ résonnent à 9,65 ppm, moins blindés que ceux $\text{H}_{2,6}$ résonnant à 9,06 ppm subissant fortement l'effet attracteur du groupe propargyle. Les protons du groupement propargyle résonnent à 4,36 ppm sous la forme d'un triplet

élargi et un doublet à 6,09 ppm. L'intégration confirme la fixation de quatre groupements propargyles.

L'analyse spectroscopique UV-Visible de la TPPyP dans le méthanol, révèle différentes bandes caractéristiques correspondant à l'absorption du photosensibilisateur. En effet, une forte bande de Soret apparaît à 434 nm et quatre autres bandes Q (QIV, QIII, QII et QI) d'intensités plus faibles vers 521, 559, 596, 652 nm (**Figure V:24**).

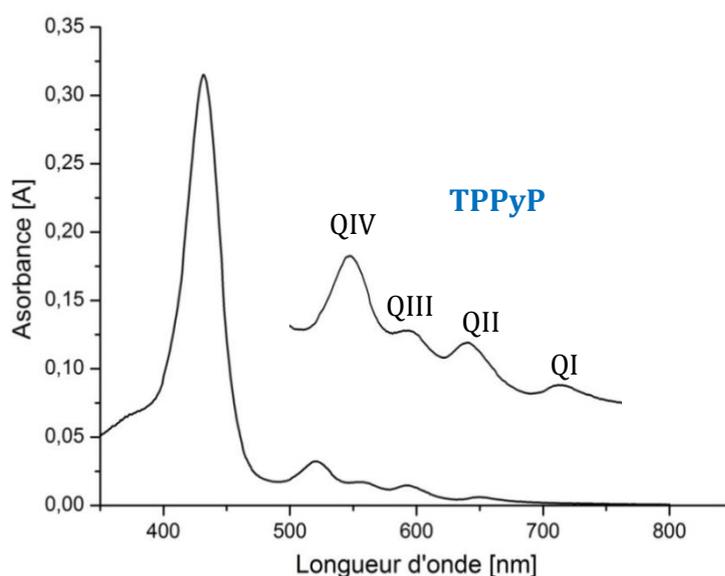


Figure V:24 Spectre UV-Visible de la tétrapropargylpyridylporphyrine (TPPyP)

V.3.2.4 Métallation de tétrapropargylpyridylporphyrine

La réaction de métallation est réalisée par ajout de dix équivalents d'acétate de zinc à la tétrapropargylpyridylporphyrine solubilisée dans le méthanol (**Schéma V:9**).

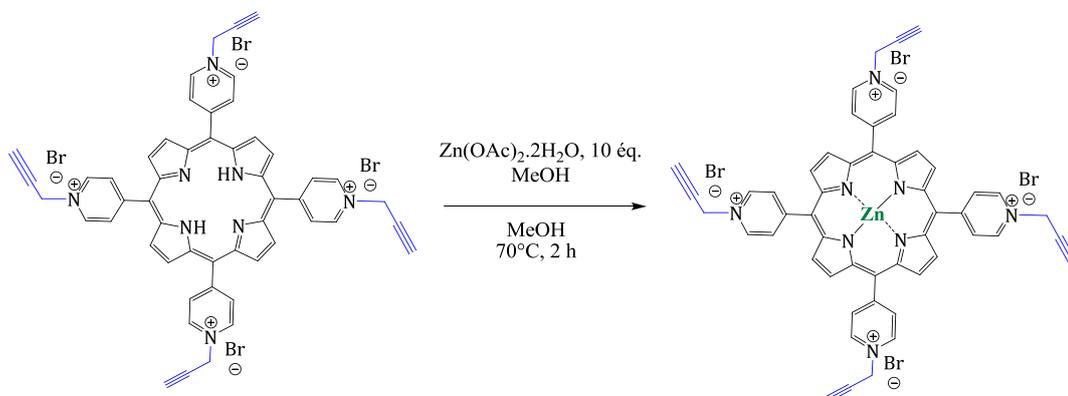


Schéma V:9 Métallation de la TPPyP

Après deux heures de réaction à reflux, le produit est récupéré par évaporation du solvant. Le produit obtenu n'est pas purifié, il est utilisé tel quel dans la réaction du greffage sur la pâte.

La caractérisation par spectroscopie UV-Visible du produit dans le méthanol met en évidence la présence d'une bande de Soret intense à 434 nm et la disparition des bandes QIV et QI (**Figure V:25**).

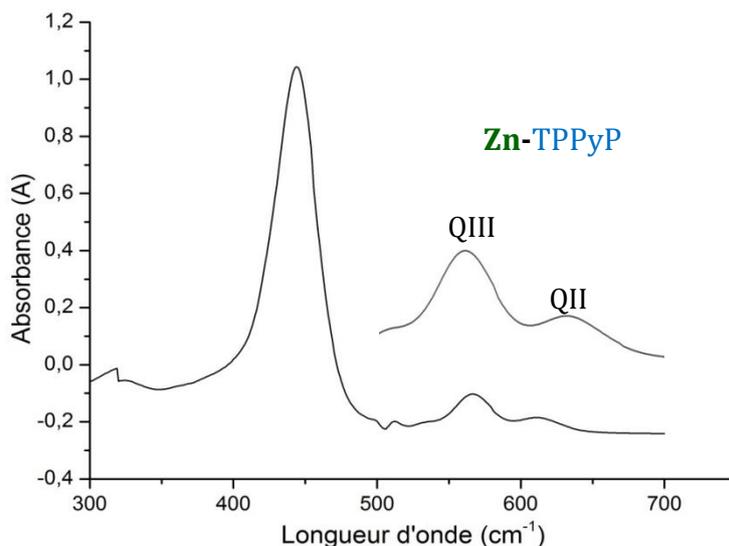


Figure V:25 Spectre UV-Visible de la tétrapropargylpyridylporphyrine métallée au zinc

V.3.2.5 Réaction de cycloaddition entre la porphyrine propargylée et la pâte azidée

La porphyrine propargylée et la pâte Kraft azidée (DS= 0,09) sont dispersés dans le DMSO. Des quantités catalytiques de sulfate de cuivre et d'ascorbate de sodium préalablement solubilisé dans de l'eau sont ajoutées au mélange (**Schéma V:10**). Après 48h de réaction, la pâte est filtrée, puis plusieurs lavages à l'eau et au méthanol sont effectués jusqu'à obtention d'un filtrat incolore.

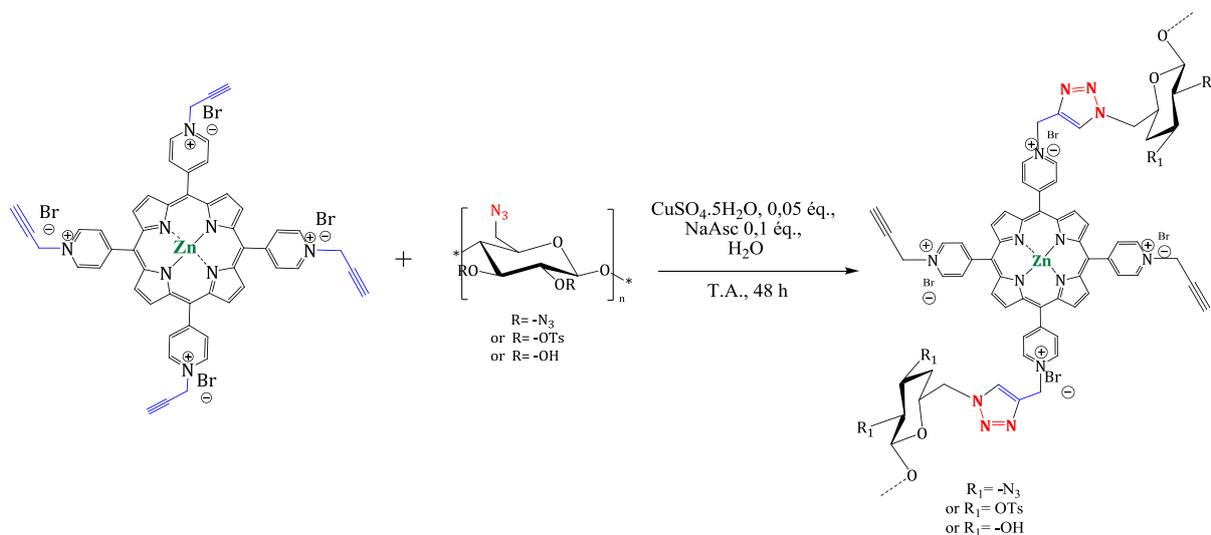


Schéma V:10 Réaction de greffage de la Zn-TPPyP sur la pâte Kraft

La pâte à papier réticulée est obtenue avec une coloration verte (**Figure V:26**), puis le gâteau obtenu est mis à sécher à 60 °C.



Figure V:26 Matériau porphyrinique cationiques

L'analyse par XPS du produit obtenu révèle la présence d'oxygène, de carbone, d'azote, de soufre et de zinc à 532 eV (O_{1s}), 285 eV (C_{1s}), 399 eV (N_{1s}), 168 eV (S_{2p}) et 1020 eV (Zn_{2p}) respectivement (**Figure V:27**).

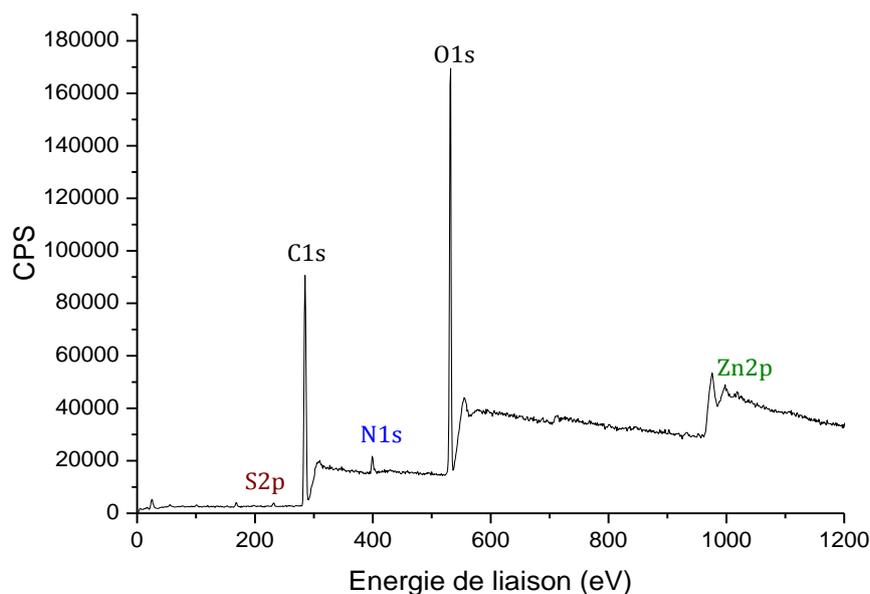


Figure V:27 Spectre XPS du matériau porphyrinique cationique

L'apparition du pic de pourcentage atomique correspondant à l'atome de zinc sur le spectre, confirme bien le greffage de la porphyrine métallée sur les fibres. Une augmentation du taux d'azote dans le matériau porphyrinique par rapport à la pâte azidée est d'ailleurs observée, et s'explique par l'apport important des atomes par la porphyrine (**Tableau V:4**). Le degré de substitution déterminé par spectrométrie XPS est de 0,06.

Tableau V:4 Pourcentages atomiques des matériaux lignocellulosiques avant et après réaction de couplage

Echantillon	C (%)	O (%)	N (%)	S (%)	Zn (%)	DS XPS
Pâte kraft azidée	61,5	35,85	1,93	0,72	-	0,09
Porph. cat. greffée	63,58	33,26	2,55	0,36	0,25	0,06

V.3.3 Evaluation de l'activité photobactéricide des matériaux porphyriniques

L'activité antimicrobienne des différents matériaux porphyriniques élaborés a été évaluée *in vitro* sur deux souches bactériennes, *S. aureus* CIP 7625 (bactérie Gram (+)) et *P. aeruginosa* CIP 76110 (bactérie Gram (-)). Au préalable, nous avons évalué l'aptitude des matériaux porphyriniques à produire de l'oxygène singulet. Quelques

informations sur l'importance de la source lumineuse utilisée puis les résultats de photoinactivation bactérienne seront exposés.

V.3.3.1 Tests de production d'oxygène singulet

Nous avons tout d'abord évalué l'aptitude des matériaux porphyriniques cationique et neutre à produire de l'oxygène singulet. Ce test consiste à contrôler par CCM la formation d'endoperoxydes d'ergostérol à partir d'ergostérol en présence de porphyrine, sous bullage d'air comprimé et sous irradiation lumineuse [131]. Pour cela, 10 g d'ergostérol sont solubilisés dans 3 mL de CHCl_3 dans un tube à hémolyse, puis 10 mg de pâte réticulée aux porphyrines sont ensuite rajoutés au mélange. Le milieu est placé sous irradiation lumineuse et sous bullage d'air (**Schéma V:11**).

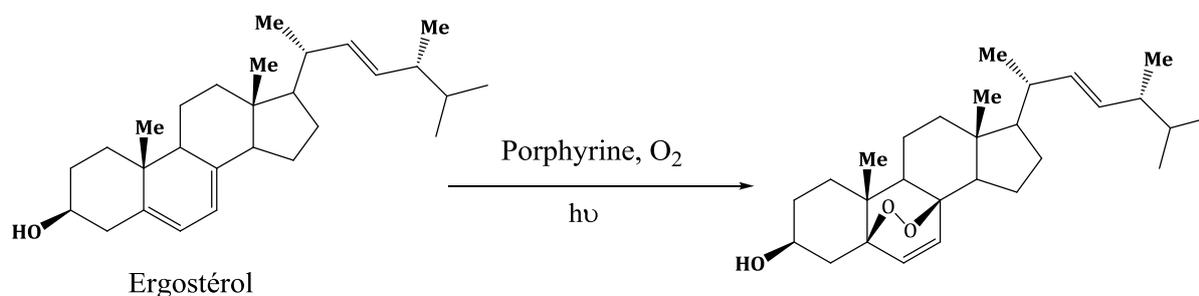


Schéma V:11 Photooxygénation de l'ergostérol

L'analyse par CCM a en effet montré la formation de nouveaux produits après illumination, ce qui montre la production d'endoperoxydes. Ce test met en évidence qualitativement, pour tous les matériaux porphyriniques élaborés, la production d'oxygène singulet.

V.3.3.2 Source lumineuse

Lors de ces tests microbiologiques, nous avons fait usage d'une source lumineuse de type LED ayant la caractéristique d'émettre de la lumière blanche (domaine du visible). Le spectre d'émission de la source lumineuse est présenté sur la **Figure V:28**.

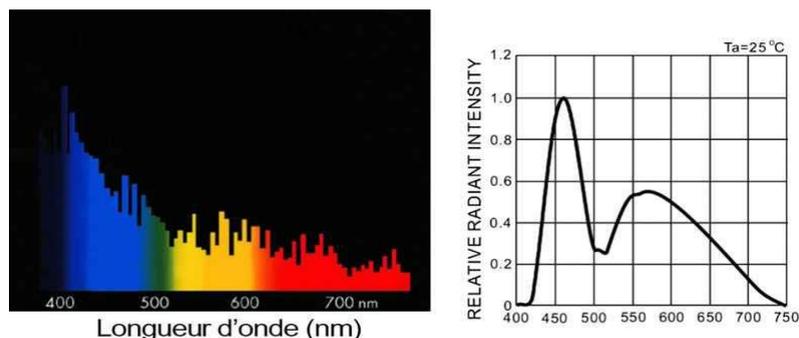


Figure V:28 Spectre d'émission de la source LED utilisée dans le dispositif PACT.

Ce type de matériel a été choisi au regard de l'allure de son spectre d'émission. En effet, il est superposable avec un spectre d'absorption classique des porphyrines utilisées. Une émission intense dans la zone 400-450nm et une émission moindre dans la zone 500-700nm vont permettre une excitation maximale, aux longueurs d'onde correspondantes à la bande de Soret et aux bandes Q du photosensibilisateur. L'intensité lumineuse fournie par une LED a été mesurée à l'aide d'un luxmètre (690 lux). Le flux lumineux correspondant est de $0,11 \text{ mW/cm}^2$ ($1 \text{ lux} = 1,61 \cdot 10^{-7} \text{ W/cm}^2$). La fluence, qui correspond à une dosimétrie est fonction du temps d'irradiation (ici 24 h ou $8,64 \cdot 10^4 \text{ s}$) et est égale à $9,5 \text{ J/cm}^2$. Les différentes caractéristiques lumineuses sont résumées au **Tableau V:5**.

Tableau V:5 Caractéristiques de l'irradiation lumineuse du dispositif PACT.

Intensité lumineuse	690 lux
Flux lumineux	0,11 mW/cm ²
Fluence ou Dosimétrie	9,5 J/cm ²

V.3.3.3 Traitement photodynamique des disques de pâte Kraft modifiés

V.3.3.3.1 Préparation des échantillons

Des feuilles ont été préparées au laboratoire à partir des matériaux porphyriniques cationique (PK-Pcat) et neutre (PK-PN). Celles-ci ont été découpées en disques de 8 mm de diamètre (**Figure V:29**), puis l'ensemble des disques est stérilisé par autoclavage à 121°C pendant 15 min.

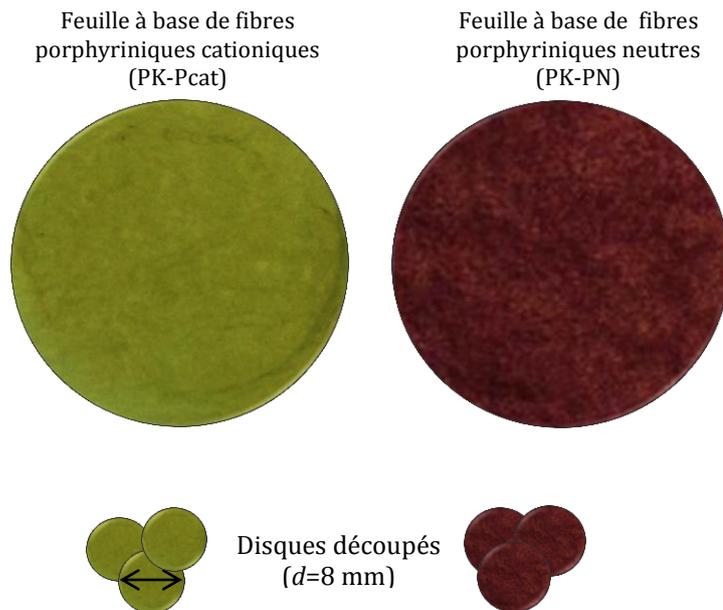


Figure V:29 Matériaux porphyriniques cationiques et neutres sous forme de feuilles et leur découpe sous forme de disques

En parallèle, nous avons choisi de vérifier l'activité microbologique des différents matériaux lignocellulosiques précurseurs ayant permis de concevoir les supports porphyriniques. Ils nous serviront de contrôles négatifs (**Figure 38**). Pour cela, dans le cas de la porphyrine neutre, nous avons testé les contrôles représentés dans le cercle

rouge (**Figure V:30**): la pâte Kraft (PK), la pâte Kraft propargylée (PK-PROP) et la pâte triazolylée (PK-TRIAZ). Pour la porphyrine cationiques, nous avons testé les contrôles présents dans le cercle vert : la pâte Kraft (PK), la pâte tosylée (PK-Tos), la pâte azidée (PK-N3) et la pâte triazolylée (PK-TRIAZ). Des feuilles ont également été préparé à partir de ces fibres.

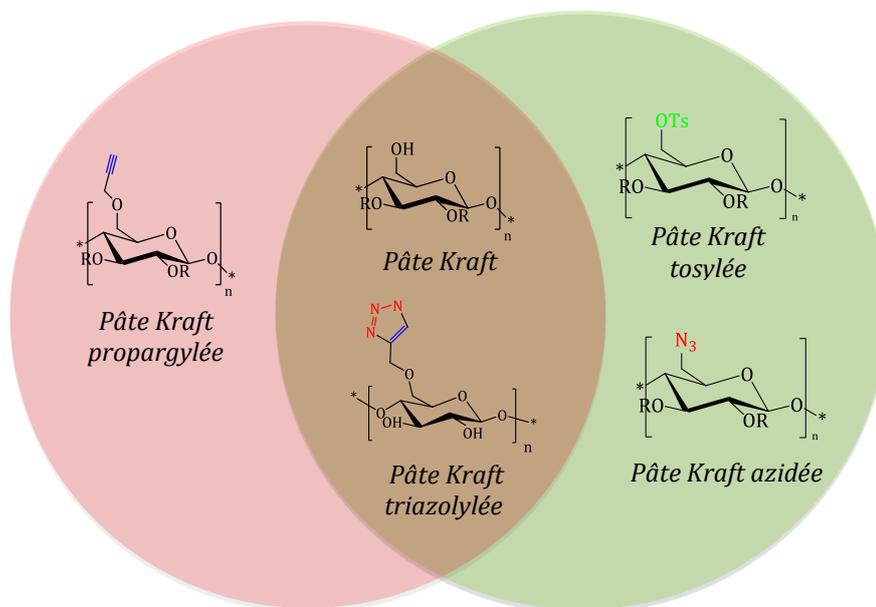


Figure V:30 Les différents contrôles négatifs utilisés pour les tests antimicrobiens

Le choix de tester la pâte triazolylée s'explique par le fait que nous souhaitons vérifier l'effet microbiologique du triazole formé lors du greffage des porphyrines sur les fibres lignocellulosiques. En effet, les dérivés 1,2,4-triazoles sont connus pour avoir un effet antimicrobien [132,133], nous avons ainsi voulu vérifier le cas des dérivés 1,2,3-triazoles greffés sur la pâte Kraft.

Pour cela nous avons utilisé une pâte triazolylée, disponible au laboratoire. Celle-ci a été synthétisée en dispersant de la pâte propargylée dans du toluène en présence de cinq équivalents d'azoture de triméthylsilyle (**Schéma V:12**) [134,135]. La réaction est laissée sous agitation magnétique pendant 24 h à 120 °C avant d'être filtré, et les fibres obtenues lavées dans du méthanol, de l'acétate d'éthyle et de l'eau distillée. Le gâteau obtenu sous forme de fibres blanches a été mis à sécher à l'étuve.

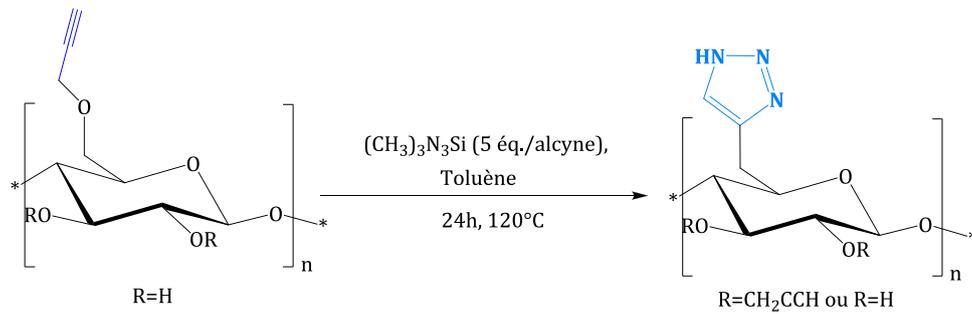


Schéma V:12 Préparation de la pâte Kraft triazolylée

V.3.3.3.2 Protocole de photoinactivation bactérienne

Afin d'évaluer de façon quantitative la photoinactivation des souches *S. aureus* et *P. aeruginosa*, nous avons comme dans le cas du triclosan supporté, utilisé une technique dérivant d'un protocole normé basé sur l'AATCC Test Method 100-2012. Un protocole a été adaptée à nos besoins afin d'inclure le paramètre "irradiation lumineuse". Les étapes indispensables sont la détermination de la concentration bactérienne en UFC/mL immédiatement après contact (t_0), puis après 24 heures d'incubation à 37°C sous irradiation lumineuse ou après 24 heures d'incubation à 37°C à l'obscurité. Le protocole est décrit comme suit (**Figure V:31**):

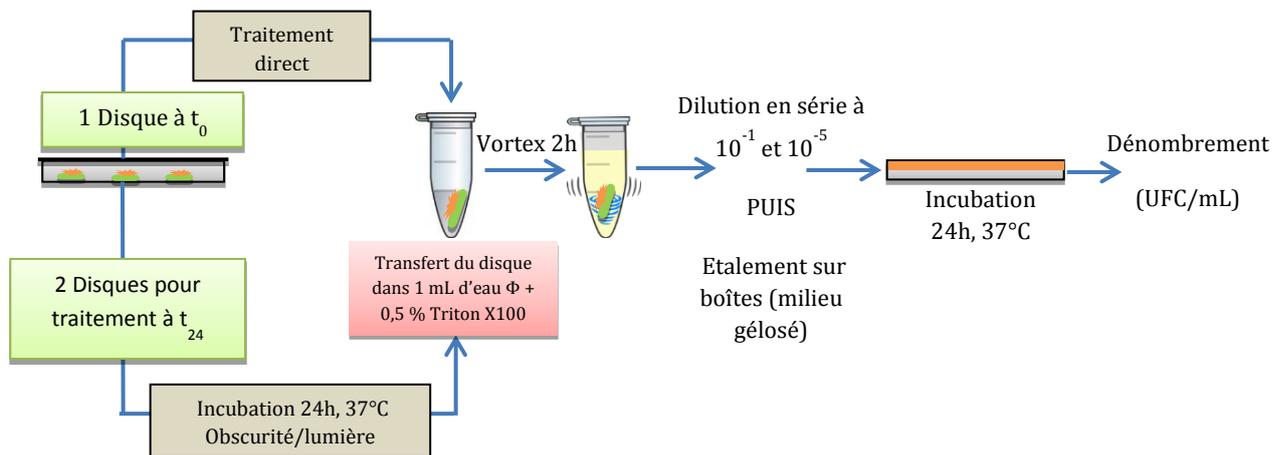


Figure V:31 Protocole utilisé pour la photoinactivation

Trois disques (diamètre = 8mm) ont été imprégnés de solution bactérienne en déposant 100 μL d'une suspension bactérienne (10^5 UFC/mL). Parmi ces disques : 1 disque pour le dénombrement à t_0 , 1 disque pour le dénombrement à t_{24} après irradiation lumineuse et 1 disque pour le dénombrement à t_{24} sans irradiation (obscurité). A l'issue de chaque condition d'exposition des bactéries avec les différents supports (témoins et porphyrines), les disques sont transférés dans un mélange de 1 mL d'une solution d'eau physiologique 0,9 % NaCl et 0,5 % Triton X-100 (v/v). On agite vigoureusement pendant 2h de façon à décrocher les bactéries résiduelles sur les disques puis les solutions diluées sont étalées sur gélose par un ensemenceur automatique de colonies SPIRAL® DS (Interscience). Après 24h d'incubation à 37°C, on effectue le dénombrement des colonies bactériennes.

Chacun de ces essais microbiologiques a été réalisé en triplicat et ce, pour tous les disques retenus précédemment.

V.3.3.4 Exploitation des résultats

V.3.3.4.1 Matériau porphyrinique neutre

Les résultats concernant l'évaluation photobactéricide des matériaux porphyriniques neutres sont présentés sur les **Figures V:32** et **V:33**. Les contrôles négatifs (pâte Kraft, pâte Kraft PROP, pâte Kraft TRIAZ) ne présentent aucune activité antimicrobienne envers *S. aureus*, avec ou irradiation lumineuse. Des résultats similaires sont obtenus avec *P. aeruginosa* hormis avec la pâte Kraft PROP après irradiation lumineuse, avec laquelle on observe une diminution de la concentration bactérienne d'environ 2 log par rapport à la condition sans irradiation.

Pour *S. aureus*, après irradiation, un effet photobactéricide est observé en présence du matériau PK-PN. En effet, après 24 heures d'incubation, aucune colonie bactérienne n'est dénombrée pour les disques porphyriniques irradiés. A l'obscurité, comme pour les supports témoin, on observe une croissance bactérienne de près de 4,5 log par rapport à t_0 . Cela implique que le matériau n'est pas toxique sur *S. aureus* sans irradiation.

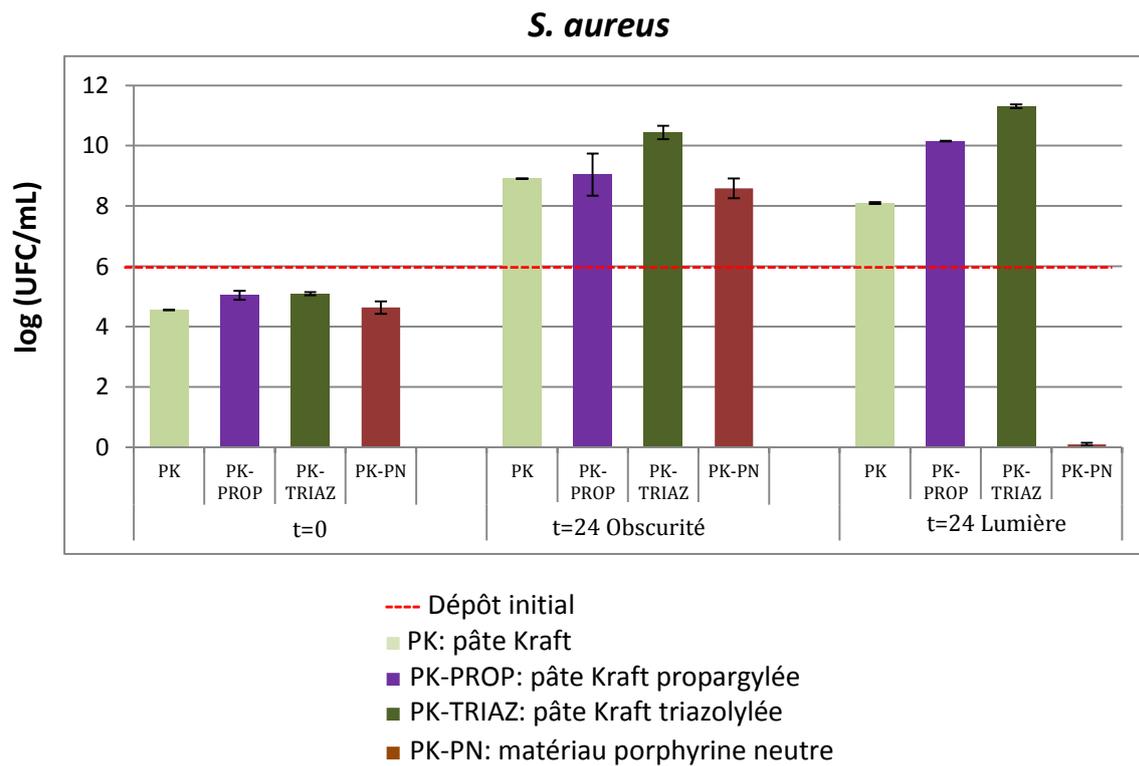
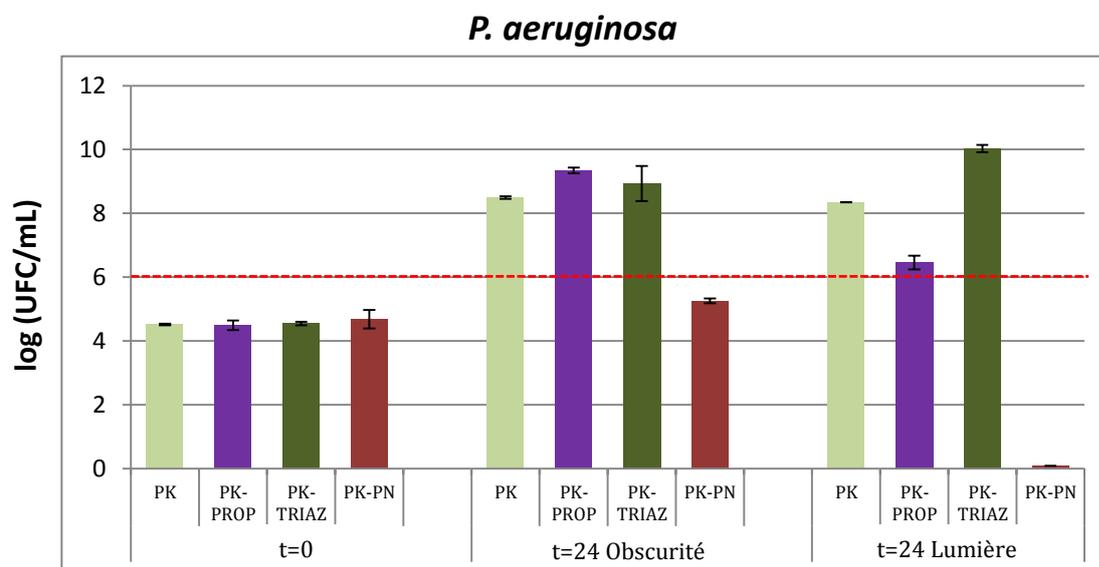


Figure V:32 Mesure de l'activité photobactéricide du matériau porphyrinique neutre (*S. aureus*)

Dans le cas de *P. aeruginosa*, on observe un effet photobactéricide du matériau PK-PN après une irradiation de 24 h.



- Dépôt initial
- PK: pâte Kraft
- PK-PROP: pâte Kraft propargylée
- PK-TRIAZ: pâte Kraft triazolylée
- PK-PN: matériau porphyrine neutre

Figure V:33 Mesure de l'activité photobactéricide du matériau porphyrinique neutre (*P. aeruginosa*)

Par contre, les résultats obtenus après 24 h d'incubation à l'obscurité mettent en évidence un effet bactériostatique du matériau PK-PN (**Figure V:33**). Ce phénomène pourrait s'expliquer par une interaction entre la porphyrine neutre et le polymère majoritaire de la paroi des bactéries Gram (-), le lipopolysaccharide (LPS).

V.3.3.4.2 Matériau porphyrinique cationique

Les résultats concernant l'évaluation photobactéricide des matériaux porphyriniques cationiques sont présentés sur les **Figures V:34** et **V:35**. Les différents contrôles négatifs ne présentent pas d'activité antibactérienne envers *S. aureus* et *P. aeruginosa*. En effet, avec l'ensemble des contrôles négatifs, à l'obscurité et à la lumière après 24h de contact, montrent en moyenne une croissance bactérienne égale à 4 log par rapport à la référence (t_0). Une croissance bactérienne de près de 6 log est d'ailleurs observée en présence de pâte Kraft TRIAZ, signifiant que le triazole ne possède pas d'activité antibactérienne vis-à-vis des deux souches bactériennes (**Figure V:34**).

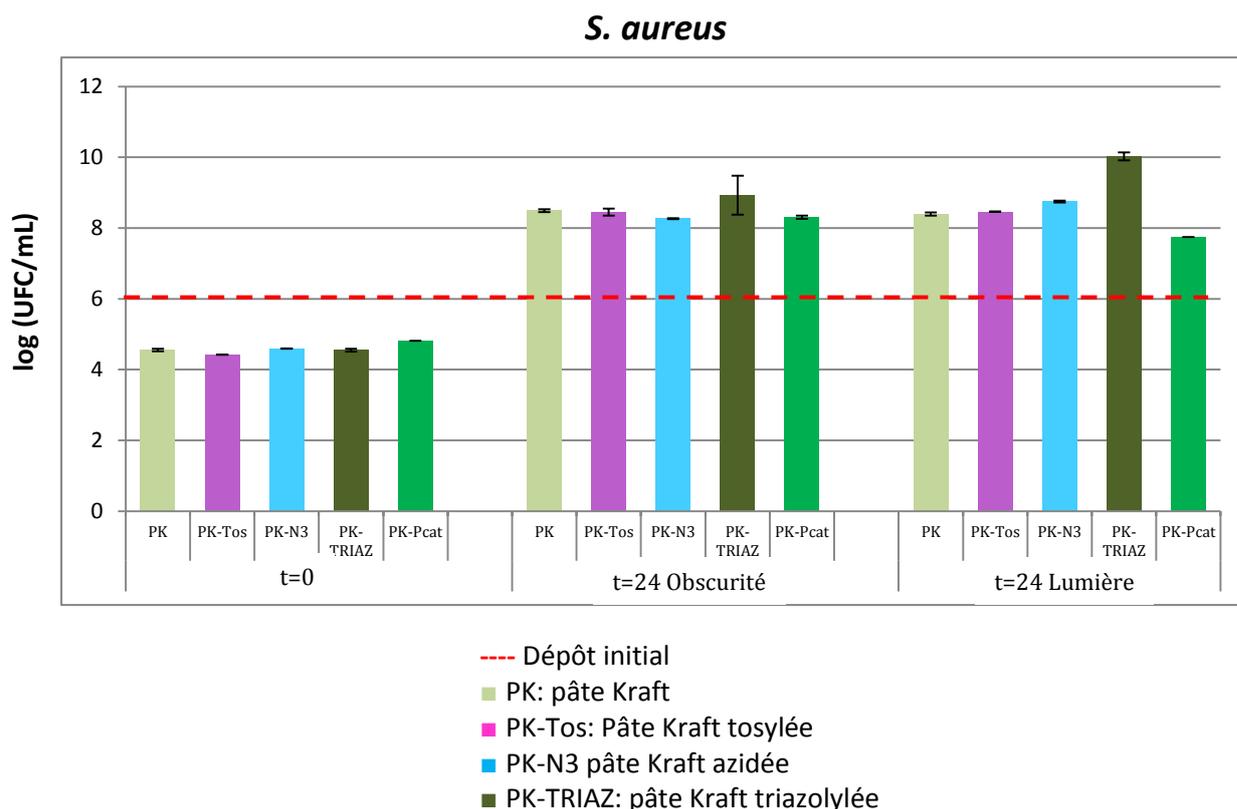


Figure V:34 Mesure de l'activité photobactéricide du matériau porphyrinique cationique (*S. aureus*)

Concernant l'exposition des bactéries aux disques porphyriniques cationiques, aucun effet antimicrobien notable n'est observé lors de la photoinactivation. En absence d'irradiation (t_0 et t_{24}), le dénombrement des bactéries est similaire qu'avec les contrôles négatifs. Après 24h de contact avec irradiation lumineuse, la concentration bactérienne est diminuée de 1 log par rapport à la condition PK-Pcat sans irradiation. Cela montre que notre support possède une activité photocytotoxique relativement faible.

En présence de *P. aeruginosa*, le matériau PK-Pcat n'a montré aucune activité photocytotoxique, car on observe à l'obscurité comme à la lumière, une croissance bactérienne proche de celle en présence des contrôles négatifs (Figure V:35).

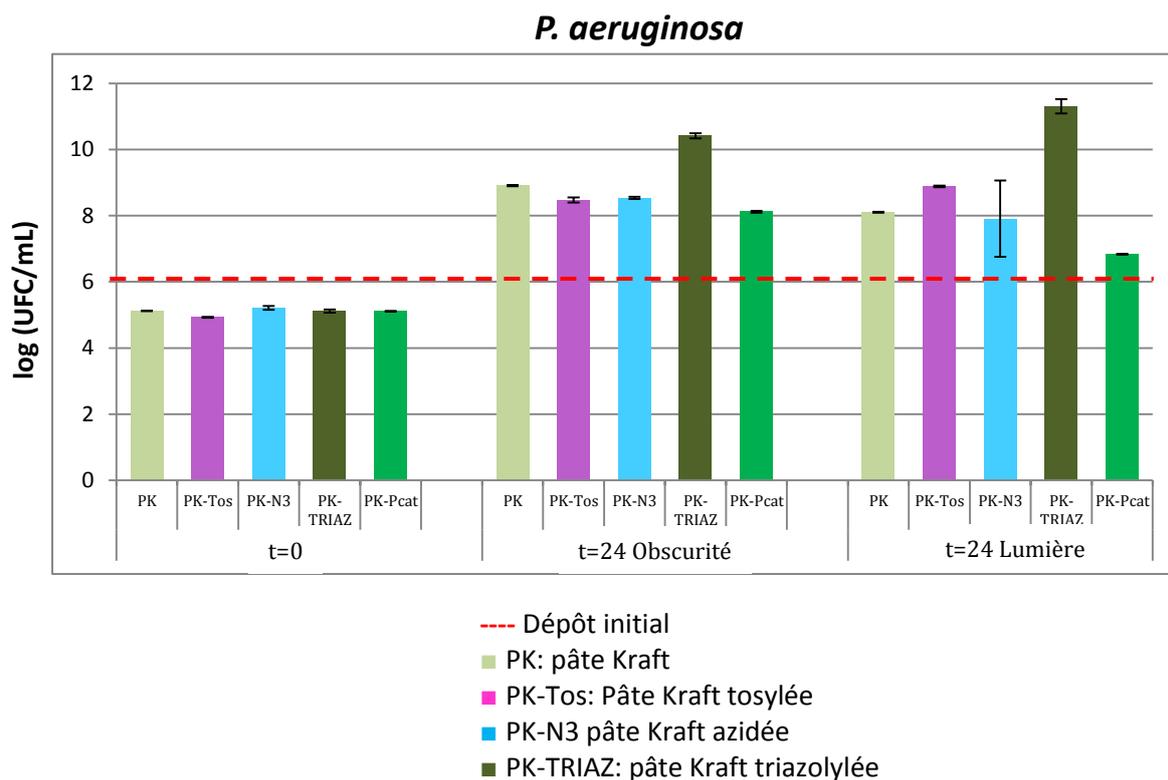


Figure V:35 Mesure de l'activité photobactéricide du matériau porphyrinique cationique (*P. aeruginosa*)

V.3.3.5 Explication mécanistique des résultats

D'un point de vue mécanistique, plusieurs hypothèses peuvent être avancées pour expliquer la photoinactivation mise en jeu lors de l'irradiation de porphyrines supportées. En raison de l'attachement covalent du photosensibilisateur, il ne peut y avoir d'internalisation des photosensibilisateurs.

Preuß et coll. [136] ont expliqué dans une étude récente que les bactéries peuvent être efficacement inactivées sans absorption intracellulaire du photosensibilisateur. L'effet photodynamique résulte de la génération d'oxygène singulet par la porphyrine à proximité de la paroi bactérienne. En raison de la courte durée de vie de cet oxygène qui ne peut pas atteindre l'espace intracellulaire, il est supposé qu'il affecte la structure de la paroi et interfère par conséquent avec la croissance de la bactérie ; ce qui induit un stress oxydatif. Il est admis qu'il est plus difficile d'inactiver des bactéries Gram (-) que des bactéries Gram (+) [136].

Dans notre cas, on a pu observer à la lumière une inactivation effective des deux souches en présence du matériau porphyrinique neutre, avec en plus une action bactériostatique à l'obscurité. La sensibilité à la lumière montre que l'irradiation joue un rôle prépondérant dans l'inactivation bactérienne. Elle fait intervenir des réactions photodynamiques de type II avec la production d'oxygène singulet capable de diffuser jusqu'à 0,65 nm dans l'air et d'interagir avec le peptidoglycane. Par contre, l'effet bactériostatique observé à l'obscurité résulte d'une action non-photodynamique du matériau sur la croissance de *P. aeruginosa*. Cela pourrait s'expliquer par le contact des molécules de PS avec les composants de la paroi cellulaire de la bactérie. En effet, Afonso et coll. ont expliqué ce phénomène par le fait que la porphyrine induit des changements conformationnels de la structure des protéines et des macromolécules constituant la paroi bactérienne en agissant sur leur sites spécifiques, d'où cette toxicité à l'obscurité [137].

Dans le cas du matériau porphyrinique cationique, nous n'observons pas une action photobactéricide à la lumière. Plusieurs travaux dont ceux de Malik et coll. [138] ont expliqué que les photosensibilisateurs cationiques sont très adaptés pour l'inactivation des bactéries notamment les Gram (-). Dans notre cas l'absence d'activité pourraient soit être due à une résistance exprimée par les bactéries, à une inaccessibilité des sites porphyriniques, ou à une faible production d'oxygène singulet par les photosensibilisateur.

Troisième Partie

Elaboration de matériaux antimicrobiens par greffage de petites molécules sur des fibres lignocellulosiques





VI. ELABORATION D'UN MATERIAU BIOACTIF PAR GREFFAGE D'AZIDOARYLES SUR DES FIBRES LIGNOCELLULOSIQUES - EVALUTION BIOLOGIQUE

VI.1 Les molécules antimicrobiennes à base du triazole ou de ses dérivés.

Actuellement, la recherche est axée sur l'introduction de nouveaux agents thérapeutiques. Les hétérocycles azotés constituent à cet effet, des substrats de base pour une grande variété de composés d'intérêt chimique, biologique, pharmacologique et industriel [139]. Ainsi, le triazole et ses dérivés sont considérés comme étant des constituants importants dans la conception et la synthèse de nouveaux composés bioactifs auxquelles sont associées de nombreuses activités biologiques [140].

VI.1.1 Importance pharmacologiques des composés à base de triazole

Les composés à base de triazoles sont largement connus pour leurs propriétés anti-inflammatoires [141], fongicides [142], antitumorales [143], anticonvulsives [144], antidépressives, antirétrovirales, antituberculeuses et bien d'autres (**Figure VI:1**)

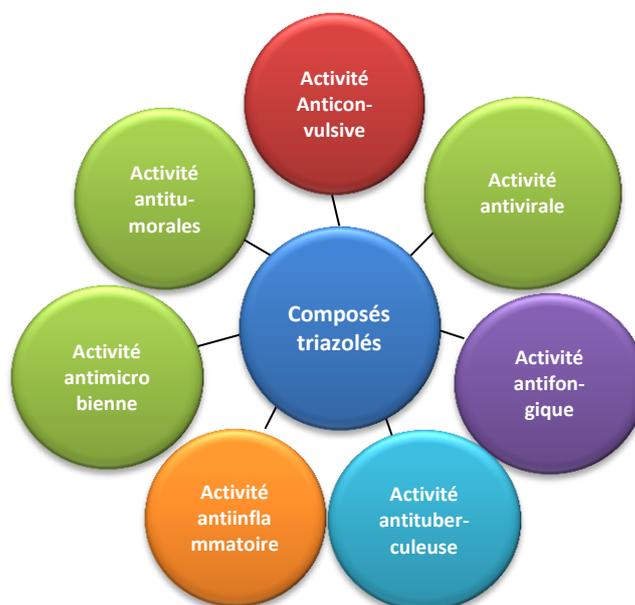


Figure VI:1 Propriétés pharmacologiques des composés à base de triazole

Ils possèdent également la propriété d'inhiber les β -lactamases [145], enzymes responsables de la résistance des bactéries vis-à-vis d'antibiotiques de la famille des

β -lactamines (pénicillines, cyclosporines). De plus, ils agissent en mimant l'acide para-aminobenzoïque (PABA) et inhibent ainsi la dihydroptéroate synthétase qui est une enzyme essentielle à la synthèse de l'acide folique [146]. Cela leur confère des propriétés antimicrobiennes intéressantes décrites dans de nombreux travaux de recherches.

VI.1.2 Mise au point bibliographique : Activité antimicrobienne de composés à base du 1,2,3-triazoles et de ses dérivés

La cycloaddition 1,3-dipolaire de Huisgen entre un azoture et un alcyne terminal est le procédé général adopté pour la synthèse de composé 1,2,3-triazoles [147].

En raison de leur fiabilité, spécificité et leur biocompatibilité, de nombreuses études ont mis en évidence l'utilisation de cette réaction dans l'élaboration de composés à base de triazole en vue d'une application antimicrobienne.

C'est ainsi que Zou et coll. [148] ont tenté d'améliorer le pouvoir antifongique d'un principe actif connu, le fluconazole, en synthétisant plusieurs dérivés de cette molécule par des réactions de « Click Chemistry ». (Schéma VI:1)

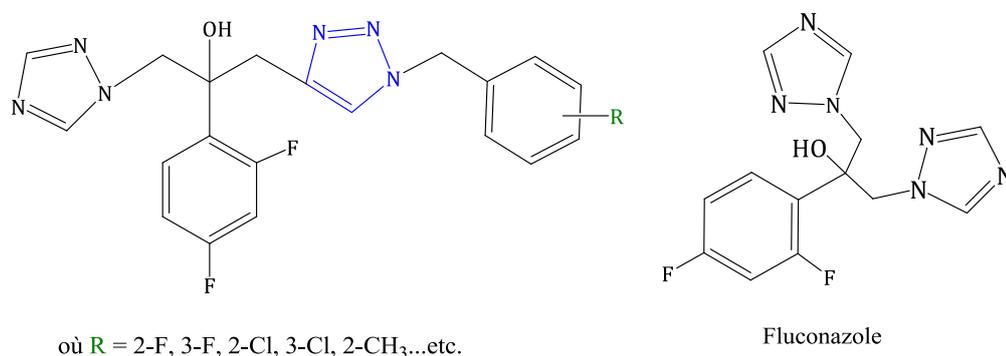


Schéma VI:1 Exemple de dérivés de fluconazole synthétisés [148]

Ces derniers ont travaillé à améliorer l'efficacité du fluconazole, antifongique à large spectre fréquemment utilisé en médecine.

Une fois le dérivé synthétisé, il a été testé sur plusieurs souches fongiques pathogènes communes. Le dérivé présente un effet antifongique supérieur au fluconazole. L'utilisation de ponts triazoles et de groupement phényle substitués permettrait d'augmenter l'activité antifongique de la molécule. [148]

Dans une autre approche, Petrova et coll. ont travaillé à la synthèse de nouveaux composés biologiquement actifs à base de saccharose [149] (Schéma VI:2).

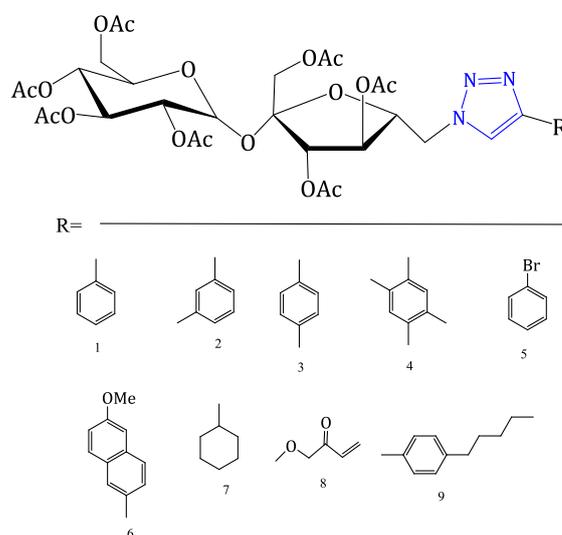
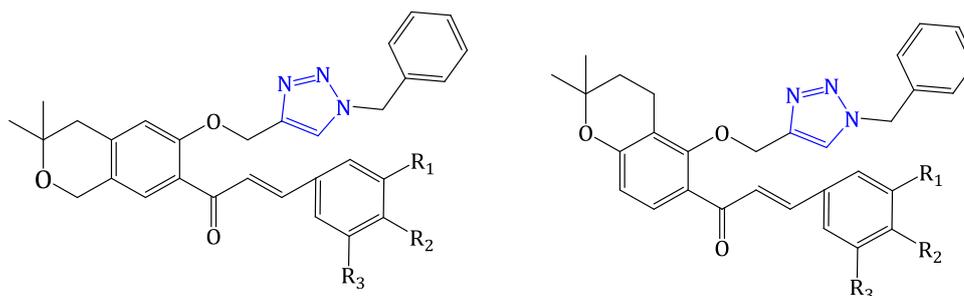


Schéma VI:2 Structure générale des composés à base de saccharose [149].

Ceux-ci ont mis au point une série de composés saccharidiques 1,2,3-triazolés et ont étudié leur potentiel antibactérien, fongicide et cytotoxique. La plupart des composés testés ont montré une bonne activité inhibitrice envers des pathogènes généralement impliqués dans la contamination en milieu clinique et agroalimentaire telles que *S. aureus*, *B. cereus* et *L. monocytogenes*. Les dérivés comprenant le substituant **9** se sont montrés très actifs avec des concentrations minimales inhibitrices (CMI) allant de 1.1 à 4.4 μM . La présence du substituant **5** a révélé par contre une activité fongicide du composé synthétisé avec une gamme de concentrations allant de 1.2 et 8.9 μM .

Ashok et coll. [150] ont synthétisé sous irradiation microondes des chalcones qu'ils ont par la suite propargylé avant de les coupler à l'azoture de benzyle dans le DMF (Schéma VI:3).



$R_{1,2,3} = \text{H, CH}_3, \text{OCH}_3, \text{N(CH}_3)_2, \text{Cl...etc.}$

Schéma VI:3 Chalcones propargylée couplées à l'azoture de benzyle [150]

L'évaluation microbiologique de ces composés a montré une activité inhibitrice de ces derniers contre des souches bactériennes Gram (+) telles que *S. aureus* ATCC-9144, *B. cereus* ATCC-11778 et deux souches Gram (-) comme *E. coli* ATCC-8739 et *P. vulgaris* ATCC-29213. L'absence de substituants sur les groupements phényles semble contribuer à éliminer toutes les bactéries, de même que la présence de groupements donneurs sur les positions R_1 et R_2 exaltent ce potentiel antimicrobien.

Prasad et coll. [151] ont quant à eux synthétisé une série de dérivés 1,2,3-triazoles en couplant par réaction de « Click Chemistry » des azotures d'aryles avec le phénylacétylène (Schéma VI:4).

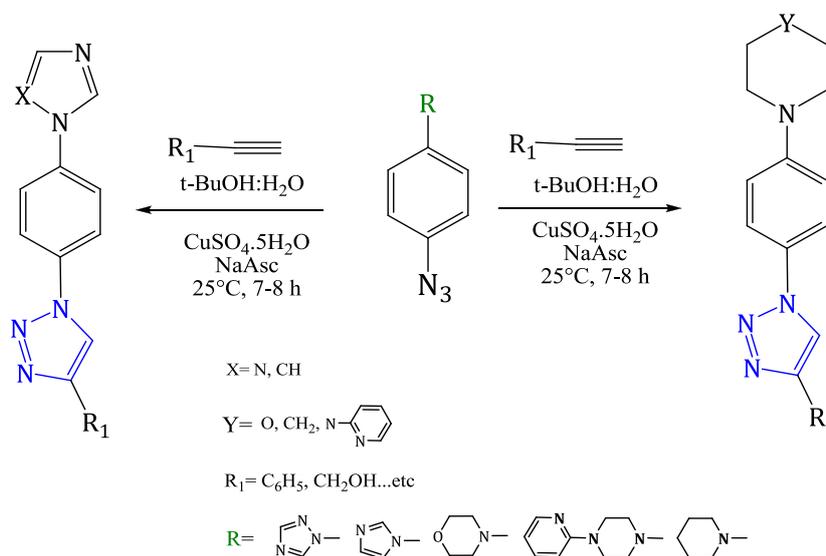


Schéma VI:4 Schéma général de greffages d'azoture d'aryles avec l'acétylène [151]

Une étude *in vitro* de l'activité microbiologique de ces composés a été effectuée sur *S. aureus*, *S. mutans*, *E. coli*, et *P. aeruginosa* puis comparée aux résultats obtenus avec un antibiotique classique, la streptomycine à 10 µg/mL. Les composés possèdent une activité bactéricide à des concentrations inférieures à 500 µg/mL de produit.

Jung et coll. [152] ont par ailleurs greffé par réaction de « Click Chemistry » le phénylacétylène et ses dérivés substitués sur un polymère plastique d'origine pétrochimique, le polyazoture de glycidyle (**Schéma VI:5**).

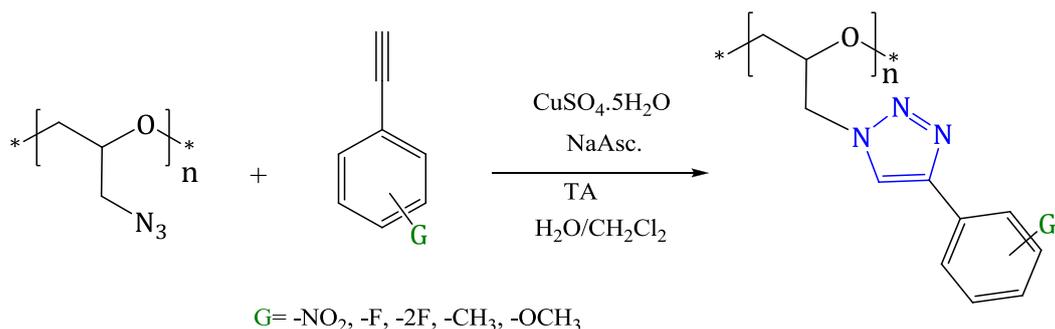


Schéma VI:5 Greffage du phénylacétylène sur le polyazoture de glycidyle [152]

Ces derniers ont étudié les propriétés des matériaux élaborés après fonctionnalisation du phénylacétylène par des groupements attracteurs et donneurs, car ces réactions sont fortement affectées par les effets électroniques. Les substrats contenant des groupes électroattracteurs réagissent lentement alors que ceux contenant des groupes électrodonneurs réagissent plus vite.

VI.2 Préparation de l'azidobenzène substitué et supporté par la pâte Kraft

Dans le but de concevoir de nouveaux matériaux antimicrobiens nous avons orienté notre travail vers le greffage de petites molécules azidoaryles sur des fibres lignocellulosiques de pâte à papier.

La stratégie mise en place pour le greffage de cette molécule est présentée sur le schéma ci-dessous (**Figure VI:2**).

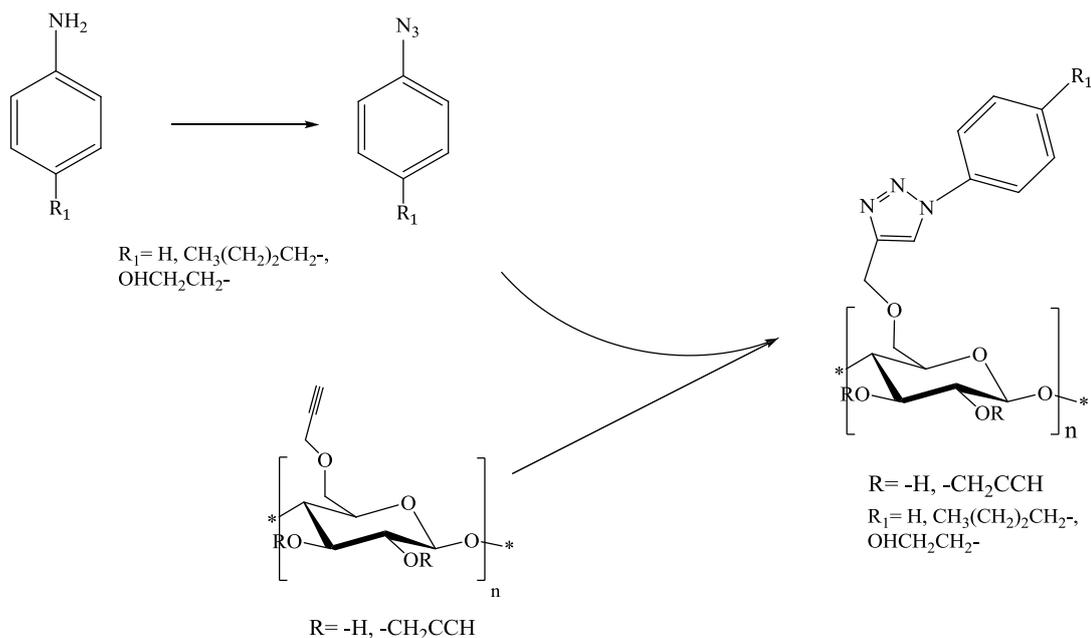


Figure VI:2 Stratégie de greffage de l'azidoaryle sur des fibres lignocellulosiques

Dans une première étape, on procède à la synthèse du dérivé azidé, puis ce synthon azidé est couplé à de la pâte Kraft propargylée comme précédemment, par réaction de cycloaddition (CuAAC).

En se basant sur les études de la littérature, nous avons choisi de greffer trois dérivés aromatiques azidés sur les fibres lignocellulosiques de pâte Kraft, l'azidobenzène, le butyl-azidobenzène et l'hydroxyéthyl-azidobenzène (**Figure VI:3**). L'utilisation d'un dérivé portant un groupement butyle donneur et un groupement hydroxyéthyle attracteur nous permettra de déterminer l'influence de ces effets sur l'activité biologique.

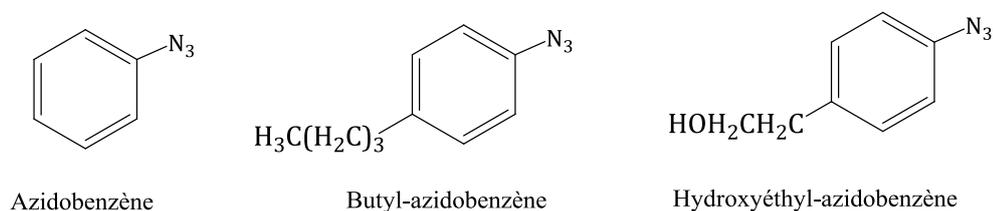


Figure VI:3 Dérivés azidoaryles choisis lors du greffage sur les fibres lignocellulosiques

VI.2.1 Synthèse des dérivés azidés

La réaction de formation des dérivés azidés commence par l'ajout de l'amine aromatique à une solution d'acide chlorhydrique à 37 % (**Schéma VI:7**). Le mélange est ensuite placé à 0°C en présence de nitrite de sodium préalablement solubilisé dans de l'eau. Après 30 min de réaction, on ajoute de l'azoture de sodium et le mélange est placé à température ambiante pendant 2h.

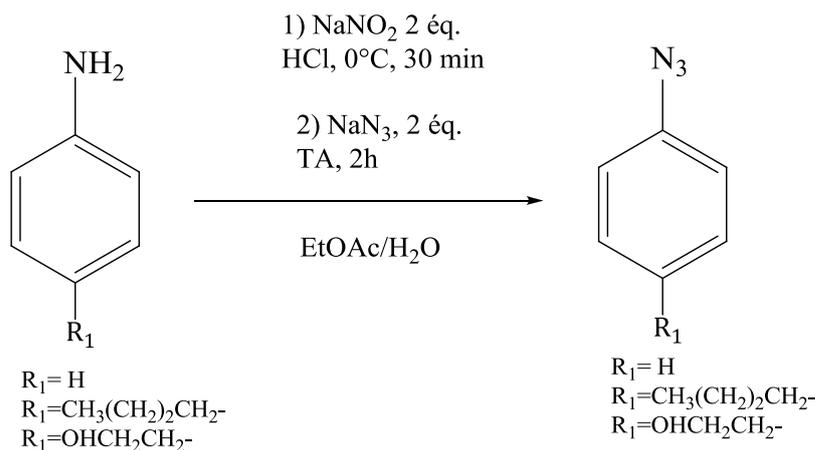


Schéma VI:6 Formation des dérivés azidés

Le produit obtenu est ensuite extrait par de l'acétate d'éthyle, puis la fraction organique lavée successivement avec une solution saturée de NaHCO_3 et de l'eau. Après séchage de la phase organique sur MgSO_4 et évaporation du solvant, on obtient une huile de couleur marron avec des rendements de 82 % pour l'azidobenzène et l'hydroxyéthyl-azidobenzène et de 98 % pour le butyl-azidobenzène.

L'analyse infrarouge des produits obtenus révèle la présence de deux bandes d'intensité forte dans la zone caractéristique d'élongation du groupement azido vers 2126 cm^{-1} et 2100 cm^{-1} .

Les spectres RMN ^1H dans CDCl_3 montre la disparition des protons issus du groupe amino ($-\text{NH}_2$). Les différents déplacements et la forme des signaux des protons sont décrits dans la partie expérimentale.

VI.2.2 Réaction de couplage entre la pâte propargylée et l'azidoaryle

Après la synthèse des dérivés azidés, nous avons procédé à leur fixation sur des fibres de pâte Kraft propargylées par réaction de CuAAC. Pour cela, on dissout le dérivé

azidé dans du THF et on y ajoute en quantités catalytiques, du sulfate de cuivre pentahydraté et l'ascorbate de sodium; chacun ayant préalablement été solubilisé dans de l'eau. La pâte Kraft propargylée (DS=0,5) est par la suite additionnée, et le mélange est laissé sous agitation magnétique à température ambiante. (**Schéma VI:7**)

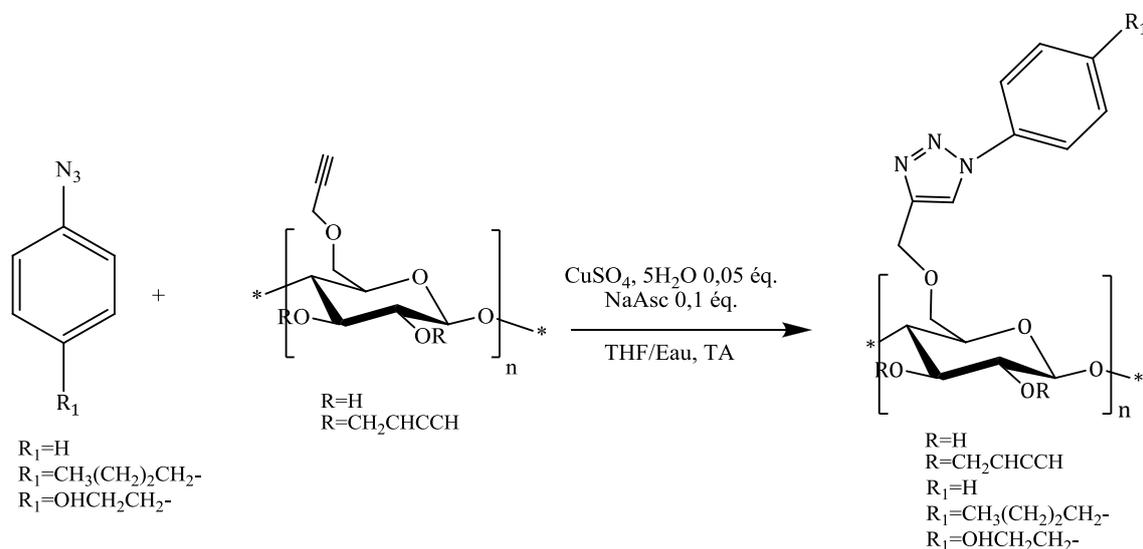


Schéma VI:7: Couplage de l'azidoaryle avec la pâte Kraft propargylée

Après 3 jours de réaction, le mélange est filtré et la pâte obtenue est lavée plusieurs fois au THF et à l'eau puis le gâteau obtenu est mis à sécher à l'étuve. Les fibres sont obtenues avec des rendements massiques de l'ordre de 100 %. L'analyse des matériaux obtenus est en cours.

VI.2.3 Evaluation de l'activité microbologique

VI.2.3.1 Protocole et résultats des tests microbiologiques

L'activité antimicrobienne des matériaux «pâte Kraft-azidobenzène» (PK-Azb), «pâte Kraft-Butylazidobenzène» (PK-Bazb) et «pâte Kraft-Hydroxyéthylazidobenzène» (PK-Hazb) a été évaluée comme précédemment suivant la méthodologie basée sur la norme AATCC100. Cela implique un dénombrement des bactéries à t_0 suivi d'un dénombrement à t_{24} , afin d'évaluer l'activité antibactérienne après 24 h de contact (voir **Figure IV:11**). Au cours de ces tests, nous avons utilisé comme contrôles la pâte Kraft (PK) et la pâte Kraft propargylée (PK-PROP).

Les tests ont été réalisés sur deux souches bactériennes, *E. coli* CIP 54.8T et *S. aureus* CIP 7625.

Dans le cas d'*E. coli*, les contrôles testés ne présentent pas d'activité antibactérienne comme attendu. De même, on n'observe aucun effet concernant les matériaux PK-Azb, PK-Bazb et PK-Hazb vis-à-vis des bactéries (**Figure VI:4**).

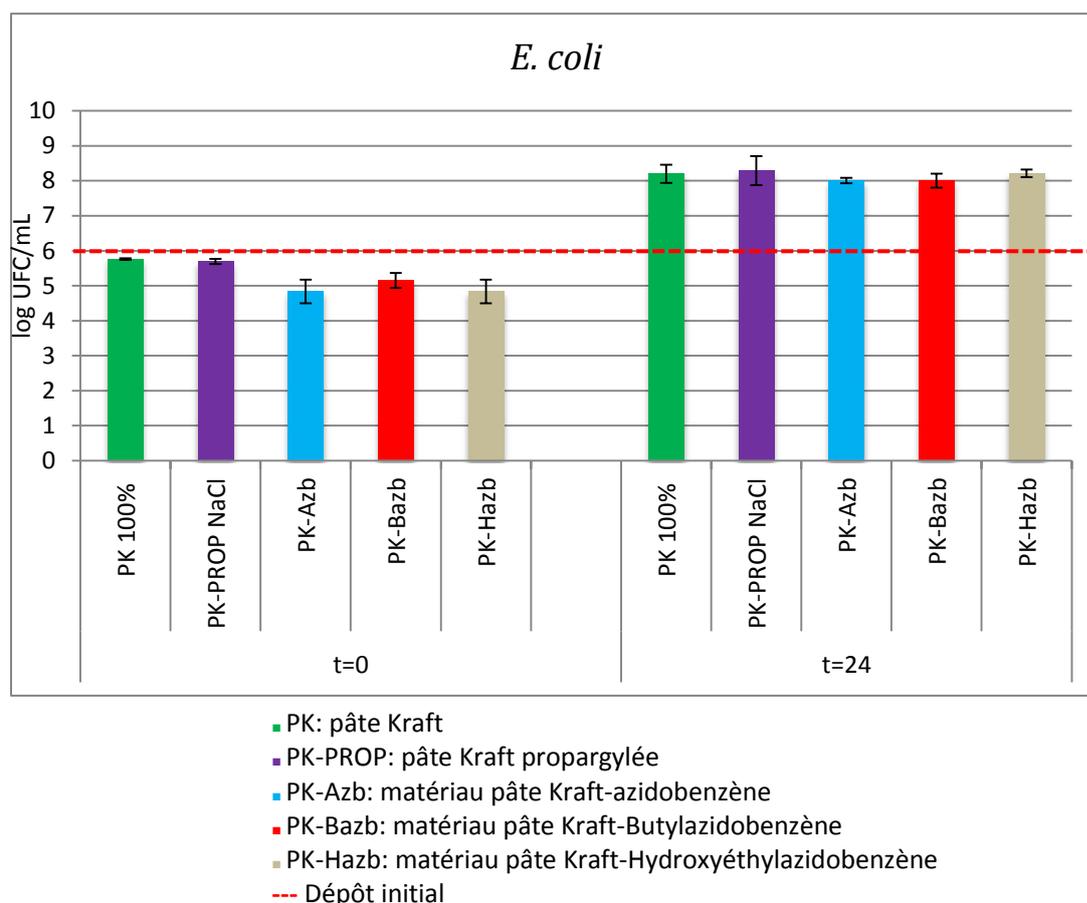


Figure VI:4 Résultats des tests antimicrobiens des matériaux «pâte Kraft-azidoaryles» sur *E. coli* CIP 54.8T

Comme pour *E. coli*, les contrôles PK et PK-PROP ne présentent également aucun effet sur la croissance bactérienne de *S. aureus*. De même, PK-Azb et PK-Bazb ne présentent pas d'activité. Par contre en présence du matériau PK-Hazb, on observe au bout de 24h d'incubation, un ralentissement de cette croissance (**Figure VI:5**) ; celle-ci est en-dessous du dépôt initial de la suspension bactérienne. Le matériau PK-Hazb présente donc une légère activité bactéricide vis-à-vis de *S. aureus*

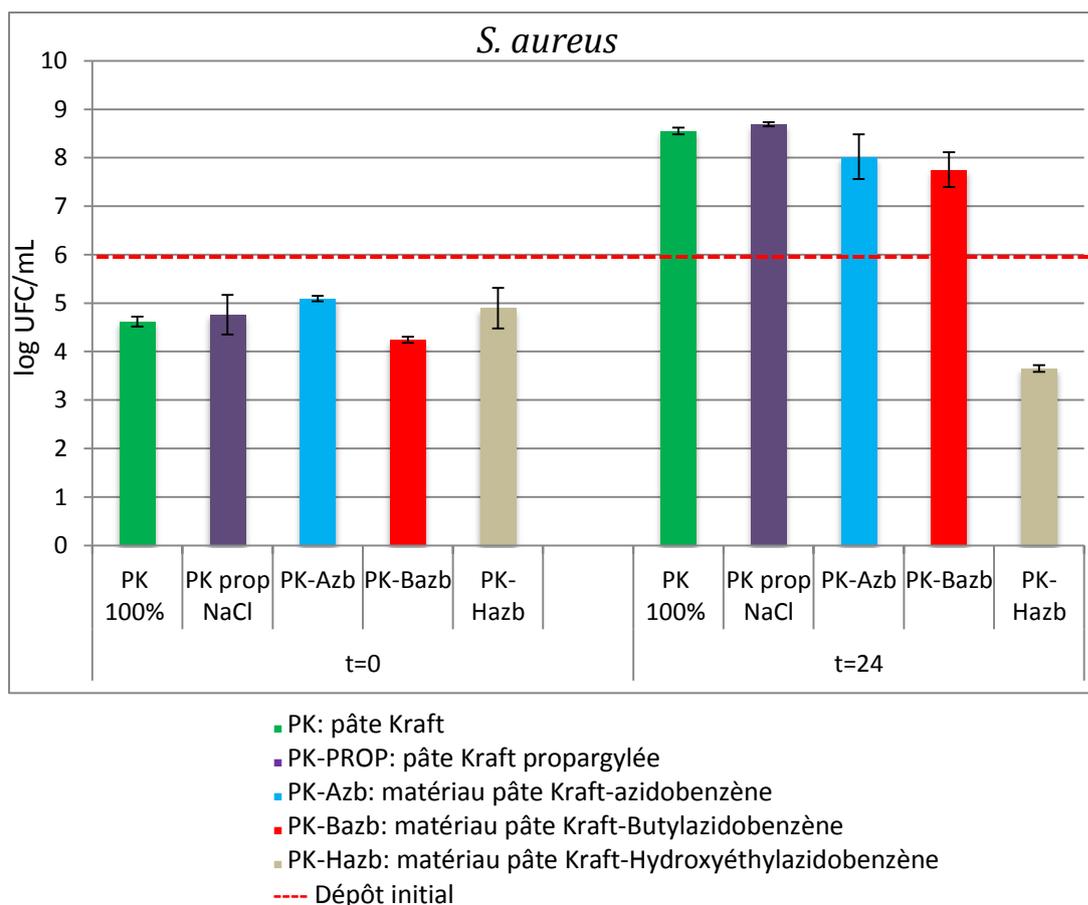


Figure VI:5 Résultats des tests antimicrobiens des matériaux «pâte Kraft-azidoaryles» sur *S. aureus*
CIP 7625

VI.2.3.2 Exploitation des résultats

Nous avons comparé lors de cette étude l'activité de matériaux lignocellulosiques greffés à des azidoaryles soit non substitués (PK-Azb), soit substitués par des groupements donneur (PK-Bazb) ou attracteur (PK-Hazb). L'étude a montré que seul le matériau PK-Hazb présentait une activité bactéricide.

En effet cette activité pourrait s'expliquer par une oxydation des bactéries due à la présence du groupement alcool. Berrah et coll. [153] avaient déjà fait cette observation avec l'action du phényléthanol provoquant une inhibition sélective de la synthèse de l'ADN bactérien.

Price [154] en a décrit les propriétés germicides en mettant en évidence une modification par l'alcool du comportement des protéines et lipides dont la mobilité est

affectée au niveau de la membrane bactérienne. Cela change la perméabilité de cette dernière à tel point qu'à hautes concentrations elle est détruite. Ce mode d'action pourrait ainsi expliquer l'activité de de l'hydroxyéthyl-azidobenzène greffé sur la pâte.

Au regard du nombre important de molécules aromatiques susceptibles d'être greffées et de la variabilité des substituants tant donneurs qu'attracteurs, ces résultats préliminaires sur le greffage d'azidoaryles ont montré qu'il est possible d'ouvrir un champ d'étude intéressant. Cela pourrait constituer un levier majeur dans l'élaboration de matériaux antimicrobiens.



CONCLUSION GENERALE ET PERSPECTIVES

Au cours de ce travail, nous nous sommes intéressés à l'élaboration de matériaux bioactifs obtenus par greffage covalent de molécules antimicrobiennes sur des fibres lignocellulosiques de la pâte à papier ; dans le but développer de nouvelles voies de valorisation de la biomasse et d'aller vers la conception d'un papier antimicrobien. Nous avons choisi la cycloaddition 1,3-dipolaire de Huisgen catalysée par le cuivre pour réaliser ce greffage.

Dans une première approche nous avons réalisé le greffage d'une molécule antimicrobienne commerciale, le triclosan, sur des fibres de pâte Kraft. Pour ce faire, nous avons au préalable propargylé le triclosan, puis d'un autre côté nous avons azidé les fibres lignocellulosiques avant de réaliser le couplage de ces deux produits par réaction de cycloaddition. Cette première approche est réalisée afin de vérifier si une fois greffée de manière covalente sur support cellulosique, une molécule biologiquement active conserve son efficacité. Les résultats des tests microbiologiques ont révélé une activité biocide du matériau « triclosan-pâte Kraft », avec une inhibition totale de la croissance bactérienne d'*E. coli*, *S. aureus* et *B. cereus*.

A la suite de ces premiers résultats biologiques satisfaisants, nous avons choisi d'orienter cette étude sur le greffage de molécules largement étudiées au sein de notre laboratoire, les porphyrines, en vue d'élaborer des surfaces photobactéricides. Nous en avons greffé deux types, une porphyrine neutre, puis une porphyrine cationique ; ces derniers étant largement connus pour avoir une activité supérieure à celle des porphyrines neutres.

La stratégie mise en œuvre pour le greffage de la porphyrine neutre commence par la synthèse de la 5-(4-nitrophényl)-10,15,20-triphénylporphyrine, suivie de la réduction de son groupement nitro pour donner une fonction amine. Après une transformation en sels de diazonium, nous avons procédé in situ à la fixation du groupement azoture par substitution nucléophile. Afin d'éviter la métallation de la porphyrine azidée par le cuivre lors du couplage, nous l'avons préalablement chélatée par le zinc avant la réaction de fixation sur la pâte. Par ailleurs, le groupement propargyle est fixé en milieu aqueux sur de la pâte kraft avant de procéder au couplage de la porphyrine azidé et de la pâte propargylée par réaction de cycloaddition.

Concernant les porphyrines cationiques, la stratégie adoptée commence d'une part, par la propargylation d'une porphyrine commerciale, la tétrapyridylporphyrine en utilisant un excès de bromure de propargyle. Celle-ci est métallée pour les mêmes raisons que la précédente puis on réalise le couplage de la porphyrine et de la pâte Kraft azidée par réaction de cycloaddition. Les précurseurs porphyriniques ont été caractérisés par les méthodes classiques de spectroscopie (RMN ^1H , UV-Visible, Masse). Les surfaces élaborées ont quant à elles été caractérisées par différentes méthodes spectroscopiques et physico-chimiques (ATR-FTIR, XPS). L'évaluation microbiologique des deux matériaux porphyriniques élaborés a été effectuée sur deux souches bactériennes : *S. aureus* et *P. aeruginosa*. Le matériau porphyrinique cationique (PK-Pcat) n'a montré aucune activité photocytotoxique envers les deux souches. A l'opposée, le matériau porphyrinique neutre (PK-PN) a montré d'une part, en présence de lumière une action photobactéricide sur les deux souches, et d'autre part à l'obscurité une action bactériostatique sur *P. aeruginosa*.

Dans une troisième partie, nous avons travaillé au greffage d'azidoaryles sur des fibres propargylées afin d'évaluer l'activité des matériaux ainsi formés. Seul le matériau «pâte Kraft-Hydroxyéthylazidobenzène» (PK-Hazb) montré un effet bactéricide sur *S. aureus*. Cela pourrait ouvrir un champ encore plus large sur le greffage de diverses molécules aromatiques avec des substituants variés.

Au regard de ces résultats encourageants, nous envisageons de greffer d'autres petites molécules aromatiques en jouant la variabilité de leurs substituants. Nous souhaitons dans des conditions proches du milieu environnemental, mettre en place des tests susceptibles de nous renseigner sur la durée d'activité biologique et d'utilisation des matériaux ainsi formés. Une étude de l'effet combinée des fibres modifiées actives est également envisageable, afin d'obtenir des matériaux à large spectre d'activité. Enfin, une étude des propriétés mécaniques de ces derniers, notamment leur résistance, pourrait être utile dans l'orientation des applications industrielles auxquelles ils pourraient aboutir, à savoir la conception de films alimentaires actifs ou de filtre à air, à eau ou une utilisation pour l'élaboration de papier journal ou des billets de banques... etc.

PARTIE EXPERIMENTALE

VI.1 Matériels

VI.1.1 Réactifs et solvant

Les réactifs et solvants utilisés au cours de ce travail, ainsi que leur origine et leur traitement éventuel, sont présentés dans le tableau ci-dessous.

Tableau : solvants et réactifs utilisés au cours du stage

Réactifs et Solvants	Pureté (%)	Origines
Acide acétique	99-100	VWR
Aniline	99	Alfa Aesar
Acide chlorhydrique à 37 %	-	Carlo Erba
Acide trifluoroacétique		ACROS
Acétate de zinc	100	ACROS
Ascorbate de sodium	98	Sigma
Azoture de sodium	99,5	ACROS
Benzaldéhyde	99	Aldrich
Bromure de propargyle (80 % dans le toluène)	-	Alfa Aesar
Carbonate de potassium	99	Alfa Aesar
Chlorure d'étain (II)	98	ACROS
Chlorure de sodium	99,8	Sigma-Aldrich
Chloroforme	99,99	SDS
Dichlorométhane	99,99	SDS
Diméthylformamide	99,8	ACROS
Diméthylsulfoxyde	99,9	Sigma-Aldrich
Diiodure	99,8	Aldrich
Ethanol absolu	99,9	Carlo Erba
Ether de pétrole	-	Carlo Erba
Hydroxyde d'ammonium	28-30	Alfa Aesar

Hydroxyde de sodium	Extra-pure	Alfa Aesar
Nitrite de sodium	98,5	Sigma-Aldrich
Méthanol	99,6	VWR
<i>Para</i> -chloranil	97	Alfa Aesar
<i>Para</i> -nitrobenzaldéhyde		Aldrich
Pyrrole	99	ACROS
Pâte Kraft		
Sulfate de cuivre, pentahydraté		Sigma
Tétrahydrofurane	99	VWR
Triclosan (5-chloro-2-(2,4-dichlorophénoxy)phénol)	99	Alfa Aesar
Tétrapyridylporphyrine	97	Frontier Scientific
Triéthylamine	99	Alfa Aesar
Triméthylsilyle	-	Sigma-Aldrich

VI.1.2 Chromatographie

VI.1.2.1 Chromatographie sur couche mince (CCM)

Des plaques de silice Kieselgel 60F254 de 0,2 mm d'épaisseur (provenance : Merck) ont été employées pour la chromatographie sur couche mince en phase normale. La révélation des plaques se fait par observation directe pour les composés colorés mais aussi sous une lampe UV (254 nm) pour les composés aromatiques.

VI.1.2.2 Chromatographie préparative sur plaques de silice

Les plaques de silice sont préparées par dépôt d'une couche uniforme de silice de 2 mm d'épaisseur (Kieselgel 60F254 Merck) sur des plaques de verre (20 cm x 20 cm) que l'on active, à 80°C pendant au moins 4 h.

VI.1.2.3 Chromatographie sur colonne

Pour les séparations par chromatographie sur colonne de gel de silice, nous avons utilisé de la silice 60 ACC, 0,020-0,045 mm provenant de SDS. Dans tous les cas, les colonnes

sont équilibrées dans l'éther de pétrole. L'éluion est accélérée par une légère surpression d'air comprimé. L'éluant est ensuite fractionné afin de récupérer le produit pur désiré.

VI.1.3 Analyses

VI.1.3.1 Spectroscopie infra-rouge

Les spectres IR sont réalisés sur un appareil Perkin Elmer 1310 sur des échantillons conditionnés en pastilles de KBr. Les nombres d'ondes sont exprimés en cm^{-1} .

VI.1.3.1.1 Spectroscopie UltraViolet-Visible

Les spectres sont réalisés sur un spectrophotomètre UV-Visible à double faisceau Perkin Elmer Lambda 25 piloté par le logiciel UVWinlab. Pour des concentrations inférieures à 10^{-5} et 10^{-6} mol.L^{-1} , nous avons utilisé une cuve de 5 cm de trajet optique. Les longueurs d'onde correspondant aux absorbances maximales λ_{max} sont exprimées en nanomètre (nm) et les coefficients d'absorption en $\text{L.mol}^{-1}.\text{cm}^{-1}$.

VI.1.3.1.2 Spectroscopie de RMN

Les spectres de RMN sont réalisés sur un appareil Bruker DPX-400 avec une fréquence de 400,13 MHz pour le proton (^1H) et de 100 MHz pour le carbone (^{13}C). Les déplacements chimiques δ sont exprimés en ppm par rapport au tétraméthylsilane (TMS). Les constantes de couplage J sont quant à elles données en Hertz (Hz). Les abréviations retenues sont : s (singulet), $s_{\text{él}}$ (singulet élargi), d (doublet), dd (double doublet), t (triplet), q (quadruplet), st (sextuplet).

VI.1.3.1.3 Spectrométrie photoélectronique X (XPS)

La spectrométrie photoélectronique X est une technique d'analyse de surface qui fournit des informations sur la composition élémentaire d'une pastille homogène de l'échantillon à analyser et ce sur une profondeur de quelques nanomètres. Un spectromètre Kratos Axis Ultra a été utilisé pour évaluer la concentration atomique présente sur la surface fonctionnalisée à partir de l'intégrale de chaque pic élémentaire. Trois mesures sont réalisées pour chaque échantillon en trois points différents.

Exemple de calcul du degré de substitution (DS) lors de la fixation de la porphyrine sur la pâte kraft à partir des données XPS :

Dans une unité anhydroglucose (UAG) il y a 5 atomes d'oxygènes et 6 atomes de carbone.

Donc le % d'UAG est égal au % d'atomes d'oxygène divisé par 5 ou au % d'atomes de carbone divisé par 6.

Dans notre cas seul le nombre d'oxygène ne varie pas entre le produit initial et le produit final. Nous utilisons donc le pourcentage d'oxygène pour le calcul : $\% \text{ Oxygène} / 5 = \% \text{ d'UAG}$.

Pour chaque porphyrine azidée fixée sur la pâte Kraft, il y a un atome de zinc et 7 atomes d'azote fixés. Donc le nombre de porphyrine fixée est égale au nombre d'atome de zinc ou alors au nombre d'atome d'azote divisé par 7.

Le taux de fixation noté DS est donc égale au % d'atome de zinc divisé par le % d'UAG.

$\% \text{ Oxygène} = 20,51$ donc $\% \text{ UAG} = 20,51/5 = 4,10$

$\% \text{ de Zn} = 0,17$

Degré de substitution (DS) = $0,17/4,10 = 0,04$

VI.1.3.2 Appareillage d'activation micro-ondes

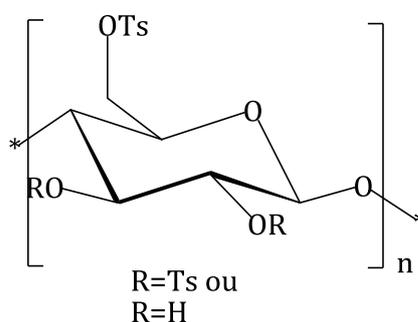
Les irradiations micro-ondes sont réalisées dans un four micro-ondes (Milestones, modèle : MicroSynth). La durée et la puissance sont ajustées par l'intermédiaire d'un logiciel de contrôle. La température est évaluée à l'aide d'une sonde.

VI.2 SYNTHESSES

VI.2.1 Préparation de la dispersion de la pâte Kraft dans le système NaCl/H₂O

10 g de pâte Kraft (0,062 mol d'unité anhydroglucose) sont dispersés dans 270 mL d'eau distillée contenant 36,25 g (0,620 mol) de chlorure de sodium dissout. Après agitation mécanique pour disperser la pâte, l'ensemble est placé au congélateur pendant 24h. Après décongélation à température ambiante, on ajoute 270 mL d'eau distillée au mélange, formant ainsi une dispersion de pâte Kraft dans une solution de NaCl à 5 %.

VI.2.2 Préparation de la pâte Kraft tosylée



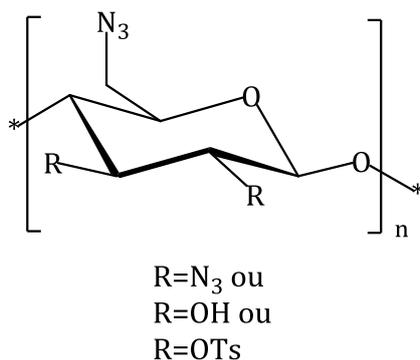
51,45 mL de triéthylamine (0,370 mol) puis 69,9 g (0,367 mol) de chlorure de tosyloxy sont additionnés à une dispersion saline de 10 g de pâte Kraft (0,062 mol d'unité anhydroglucose). Après 24h sous agitation mécanique, à température ambiante, les fibres sont filtrées sur Büchner et des lavages de la pâte sont réalisés successivement dans de l'eau chaude puis 250 mL d'éthanol froid et enfin 250 mL d'éthanol chaud. Le produit obtenu, sous la forme de fibres blanches, est mis à sécher à l'étuve à 60°C.

Masse : 11,27 g; **Rendement massique**: 113 % ; **DS** : 0,28

IR (cm⁻¹): 3445 (OH), 1362 (SO₂), 1169 (SO₂)

XPS (eV): 531,00 (O_{1s}, 35,60 %), 285,00 (C_{1s}, 61,51 %), 168,00 (S_{2p}, 2,02 %).

VI.2.3 Préparation de la pâte Kraft azidée



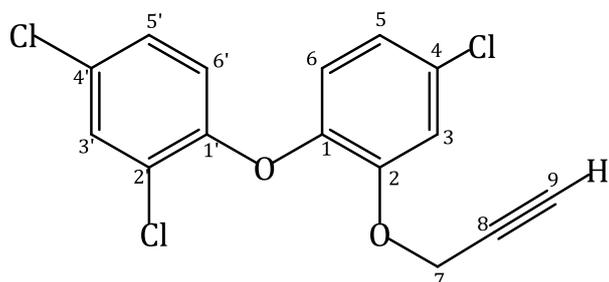
Dans un ballon de 1L, on disperse 8 g (0,0336 mol d'unité anhydroglucose) de pâte tosylée (D.S. 0,3) dans 320 mL de DMF puis on ajoute 10,91 g (0,168 mol) d'azoture de sodium. On place le milieu réactionnel sous agitation magnétique, dans un bain d'huile à 75 °C. Après 24 h, une dilution est effectuée avec 400 mL d'eau distillée puis le mélange est filtré sur Büchner. Des lavages de la pâte sont réalisés successivement avec deux fois 500 mL d'éthanol froid puis deux fois 500 mL d'éthanol chaud. Le produit obtenu, sous la forme de fibres blanches, est mis à sécher à l'étuve à 60°C.

Masse : 6,77 g ; **Rendement massique** : 85 %, **DS** = 0,09

IR (cm⁻¹): 3400 (OH), 2111 (N₃), 1430 (SO₂), 1360 (SO₂)

XPS (eV) : 531,00 (O_{1s}, 35,85 %), 399,00 (N_{1s}, 1,93 %), 285,00 (C_{1s}, 61,5 %), 169,00 (S_{2p}, 0,72 %).

VI.2.5 Propargylation du triclosan



Dans un bicol, 1g (3.44 mmol) de triclosan sont dissout dans 100 mL de DMF puis 4,75g (34,4 mmol) de K_2CO_3 sont additionnés au milieu réactionnel. On laisse le mélange sous agitation à température ambiante puis on ajoute 600 μ L (70,06 mmol) de bromure de propargyle à 80 % dans le toluène. La réaction est activée par irradiations microonde (2 x 5 min, 200 W, 60°C). Après constatation par CCM de la disparition totale du produit de départ, le mélange réactionnel est filtré puis le solvant est évaporé. Après une extraction avec 50 mL du CH_2Cl_2 , la phase organique obtenue est lavée à l'eau, séchée sur $MgSO_4$, filtrée puis le solvant évaporé. Le produit est purifié par recristallisation dans le méthanol. Le composé est obtenu sous l'aspect des cristaux blancs.

Masse : 850mg ; **Rendement** : 85 %

T_f = 70 °C

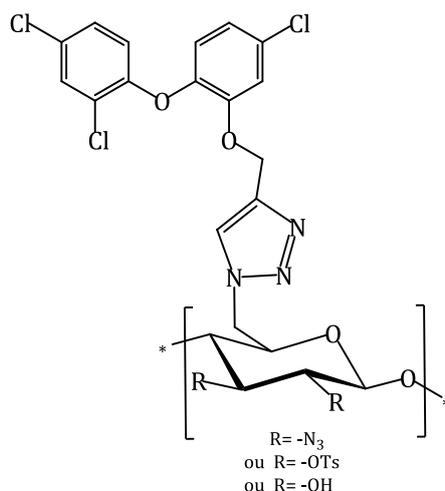
R_f = 0.6 ($CHCl_3/EP$, 6/4 V/V)

IR (cm^{-1}): 3081 (C-H_{arom.}), 3293 (C-H_{alcyne}), 755 (C-Cl), 1020 (C-O), 2131 (C \equiv C)

RMN 1H (DMSO) : δ ppm = 4,89 (d, J=2,3 Hz, 2H, **H7**) ; 3,6 (t, J=2,3 Hz, 1H, **H9**) ; 7,71(d, J=2,56Hz, H3') ; 7,36(d, J=1,44Hz, H3) ; 7,32(dd, J=8,8Hz et J=2,56 Hz, H5') ; 7,09(dd, J=1,8Hz et J=8,8Hz , H5) ; 7,06(d, J=8,8Hz, H6) ; 6,78(d, J= 8,8Hz , H6').

RMN ^{13}C (DMSO) : δ ppm = 142,6 (C-1) ; 149,1 (C-2) 115,5 (C-3) ; 128,5 (C-4) ; 121,8 (C-5) ; 118,6 (C-6) ; 56 (C-7) ; 79 (C-8) ; 78 (C-9) ; 151,6 (C-1') ; 123,5 (C-2') ; 129,8 (C-3') ; 129,5 (C-4') ; 127,2 (C-5') ; 122,1 (C-6')

VI.2.6 Réaction de couplage entre la pâte azidée et le triclosan propargylé



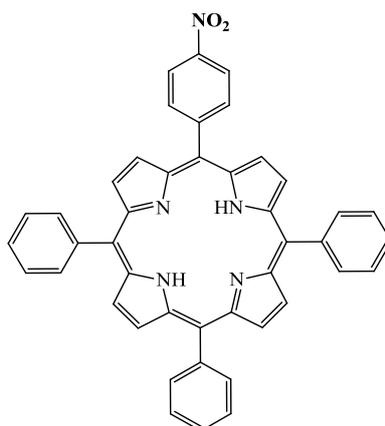
Dans un ballon de 50 mL, 150 mg (0,460 mmol) de triclosan propargylé sont dissous dans 10 mL de DMSO puis on ajoute 24 mg (0,152 mmol) de CuSO₄ et 60 mg (0,305 mmol) d'ascorbate de sodium chacun dissout préalablement dans 7,5 mL d'eau, ensuite on ajoute 500 mg de la pâte azidée (D.S. 0,09 ; 3,05 mmol) et on laisse le milieu sous agitation à température ambiante pendant 3 jours.

La pâte obtenue est lavée plusieurs fois avec de l'éthanol froid, de l'éthanol chaud et au chloroforme et enfin séchée à l'étuve (60 °C). Le gâteau obtenu a une forte coloration jaune.

Masse: 585 mg ; **Rendement massique:** 117 % ; **DS**= 0,05

XPS (eV) : 531,00 (O_{1s}, 36,71 %), 399,00 (N_{1s}, 1,01 %), 285,00 (C_{1s}, 56,06 %), 199(Cl_{2p}, 1,03 %), 165,00 (S_{2p}, 0,99 %).

VI.2.7 5-(4-nitrophényl)-10, 15, 20- triphénylporphyrine : TPP-NO₂



Dans un bicol de 250 mL, on dissout 378 mg (2,5 mmol) de para-nitrobenzaldéhyde dans 100 mL de dichlorométhane en présence de 760 μ L (7,5 mmol) de benzaldéhyde, sous agitation magnétique. Par la suite, 268 mg (1,1 mmol) de diiode sont additionnés au mélange puis 700 μ L (10 mmol) de pyrrole sont introduits avant d'activer la réaction par irradiations micro-ondes (3 x 2 min, 100 W, 30 °C). Après chaque activation, on réalise une CCM afin de constater la disparition des aldéhydes de départ. Ensuite, on ajoute 1,84 g de *p*-chloranil au milieu réactionnel puis on active la réaction une minute (100 W, 30 °C). On évapore à sec le mélange réactionnel puis le produit brut est déposé sur 60 g de florisol. Le mélange est purifié par chromatographie sur colonne de silice et le produit est obtenu, sous l'aspect d'un solide violet, avec un rendement de 22 % (363 mg).

$R_f = 0,65$ (CHCl₃/EP ; 7/3 ; V/V)

IR (cm⁻¹) : 3315 (N-H), 1345 (C-N), 1516,14 et 1345,57 (NO₂)

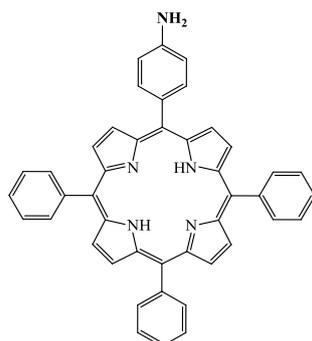
RMN ¹H (CDCl₃, δ ppm) : 8,89 (d, J=4,7 Hz, H $_{\beta}$ -pyrroliques) ; 8,86 (s, 4H, H $_{\beta}$ -pyrroliques), 8,73 (d, J=4,7 Hz, 2H, H $_{\beta}$ -pyrroliques) ; 8,62 (d, J=8,5 Hz, 2H, H_{3,5}-aryle) ; 8,40 (d, J=8,5 Hz, 2H, H_{2,6}-aryle), 8,21 (d, J=7,4 Hz, 6H, H_{2,6}-phényle) ; 7,76 (m, 9H, H_{3,4,5}-phényle) ; -2,78 (s, 2H, NH_{int})

RMN ¹³C (CDCl₃, δ ppm): 169,15 (C₄-aryle), 162,51(C₄-phényle), 149,92 (C $_{\alpha}$ -pyrroliques), 147,72 (2,6-aryles), 141,90 (C₁-aryles), 147,71 (C₁-phényles), 135,13 (C_{2,6}-phényle), 134,5 (C $_{\beta}$ -pyrroliques), 127,89 (C_{3,5}-phényles), 126,76 (C₅-mésos), 121,85 (C₁₀-mésos), 121,07 (C₁₅-mésos), 120,67 (C₂₀-mésos), 116,61 (C_{3,5}-aryles)

UV -Visible (CHCl₃), λ_{max} en nm : 424 (Soret), 518, 554, 594, 645

SM (MALDI): m/z =660,13 [M+H]⁺

VI.2.8 5-(4-aminophényl)-10, 15, 20 triphénylporphyrine : TPP-NH₂



Dans un bicol de 250 mL, 170 mg (0,258 mmol) de TPP-NO₂ et 174 mg (0,772 mmol) de chlorure d'étain (II) sont dissous dans 42,5 mL de chloroforme et 42,5 mL d'acide chlorhydrique à 37 %. Le milieu réactionnel est homogénéisé en présence de 42,5 mL d'acide acétique. La réaction est laissée sous agitation magnétique, dans un bain d'huile à reflux et à l'abri de la lumière. Après 96 h de réaction, le milieu est ramené à température ambiante. Puis on procède au traitement de ce milieu avec une solution de NaOH à 2 mol.L⁻¹ jusqu'à pH=8. Ensuite, on fait une extraction au chloroforme (3 x 100 mL) et la phase organique est lavée avec de l'eau distillée (2 x 100 mL). On sèche la phase organique sur MgSO₄, on filtre puis on évapore à sec le solvant. Le composé est obtenu sous l'aspect d'un solide violet avec un rendement de 92 %.

$R_f = 0,32$ (CHCl₃/EP; 7/3; V/V)

IR (cm⁻¹) 3310 (N-H_{pyrrole}), 1349 (C-N), 3382 (N-H_{aryle})

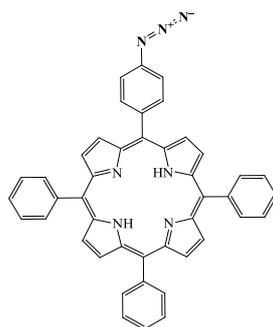
RMN ¹H (CDCl₃, δ ppm) : 8,94 (d, J=4,7 Hz, 2H, H_{β-pyrroliques}) ; 8,84 (d, 2H, H_{β-pyrroliques}) ; 8,82 (sél., 4H, H_{β-pyrroliques}) ; 8,22 (d, J=7,4 Hz, 6H, H_{2,6-phényle}) ; 7,77 (m, 9H, H_{3,4,5-phényle}) ; 7,98(d, J=8,6 Hz, 2H, H_{2,6-aryle}) ; 7,04 (d, 2H, J=8,6 Hz, H_{3,5-aryle}) ; 3,90 (s, 2H, NH₂), -2,75 (s, 2H, NH_{int})

RMN ¹³C (CDCl₃, δ ppm): 149.25 (C_{4-aryle}), 147.72 (C_{4-phényles}), 146.04, 142.29, 141.92, 135.70 (C_{3,8-β-pyrroliques}), 134.56 (C_{12,13,17,18-β-pyrroliques}), 132.41, 131.17, 130.88, 127.89, 126.74, 121.85, 120.85, 119.96, 116.61, 113.45, 142,11 (C_{1-aryles}), 141,91 (C_{1-phényles}), 139,86 (C_{α-pyrroliques}), 138,96 (C_{2,6-aryles}) , 135,7 (2,8-β-pyrroliques), 131,3 (C_{2,8-β-pyrroliques}), 126,70 (C₃), 121,1 (C_{5-méso}), 120,68 (C_{10-méso}), 120,33 (C_{15-méso}), 120,26 (C_{20-méso}), 117,4 (C_{3,5-aryles}), 116,6 (C_{3,5-phényles})

$UV-Visible$ (CHCl₃), λ_{max} en nm : 421 (Soret) ; 507 ; 521 ; 555 ; 592

SM (MALDI): m/z = 629,27 [M+H]⁺.

VI.2.9 5-(4-azidophényl)-10, 15, 20 triphénylporphyrine : TPP-N₃



Dans un ballon rodé de 25 mL, placé à 0°C, 130 mg (0,207 mmol) de TPP-NH₂ sont dissous dans 4,4 mL d'acide chlorhydrique à 37 %. Puis 14 mg (0,207 mmol) de nitrite de sodium, préalablement dissous dans 6,6 mL d'eau distillée, sont additionnés goutte à goutte. Le mélange est laissé sous agitation magnétique pendant trente minutes. Après retour à température ambiante, on ajoute goutte à goutte 27 mg (0,414 mmol) d'azoture de sodium, préalablement dissous dans 6,6 mL d'eau distillée. Après 30 min de réaction, une solution de NH₄OH à 20 % est introduite de façon à amener le pH du milieu à 8. On extrait le produit avec du dichlorométhane (2 x 12 mL) et la phase organique est lavée à l'eau distillée (2 x 12 mL). On sèche la phase organique sur MgSO₄, on filtre puis on évapore à sec le solvant. On obtient 140 mg de produit sous l'aspect d'un solide violet avec un rendement de 91 %.

R_f = 0,67 (CHCl₃/EP; 7/3; V/V)

IR (cm⁻¹): 3323 (N-H_{pyrrole}), 1213 (C-N), 3030-3080 (C-H_{arom.}). 2122 et 2086 (deux bandes, N=N)

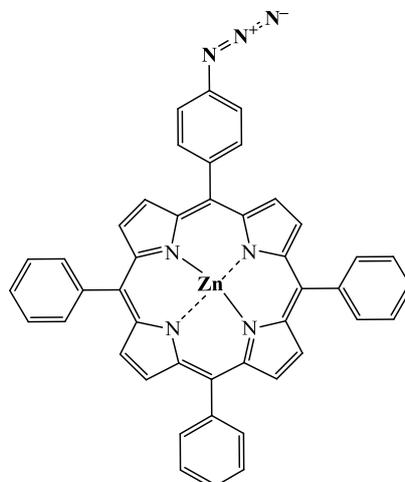
RMN ¹H (CDCl₃, δ ppm) : 8,94 (m, 2H, H_{β-pyrroliques}) ; 8,84 (m, 6H, H_{β-pyrroliques}) ; 8,21 (m, 8H, H_{3,5-phényle}, H_{2,6-aryle}) ; 7,76 (m, 9H, H_{2,4,6-phényle}) ; 7,42 (d, J=8,2 Hz, 2H, H_{3,5-aryle}) ; -2,78 (s, 2H, NH_{int})

RMN ¹³C (CDCl₃, δ ppm) : 149,2 (C_{4-aryle}), 147,7 (C_{4-phényles}), 142,11 (C_{1-aryles}), 141,91 (C_{1-phényles}), 139,86 (C_{α-pyrroliques}), 138,96 (C_{2,6-aryles}) , 135,7 (2,8-β-pyrroliques), 135,13 (C_{3,8-β-pyrroliques}), 134,5 (C_{12,13,17,18-β-pyrroliques}), 131,3 (C_{2,8-β-pyrroliques}), 126,70 (C₃), 121,1 (C_{5-méso}), 120,68 (C_{10-méso}), 120,33 (C_{15-méso}), 120,26 (C_{20-méso}), 117,4 (C_{3,5-aryles}), 116,6 (C_{3,5-phényles})

UV-Visible (CHCl₃), λ_{max} en nm : 420 (Soret), 517, 553, 592, 648

SM (MALDI): m/z = 655,97 [M+H]⁺

VI.2.10 Métallation de la 5-(4-azidophényl)-10, 15, 20 triphénylporphyrine : Zn-TPP-N₃



Dans un ballon de 100 mL, 200 mg (0,305 mmol) de TPP-N₃ sont dissous dans 49 mL de tétrahydrofurane auxquels on ajoute 280 mg (1,276 mmol) d'acétate de zinc. La réaction est laissée sous agitation magnétique, à reflux et à l'abri de la lumière pendant deux heures. On évapore le THF puis le produit est repris dans 40 mL de chloroforme puis lavé avec 2 x 36 mL d'eau distillée. On sèche sur MgSO₄ la phase organique, on filtre puis on évapore à sec le solvant. Le produit est obtenu sous l'aspect d'un solide violet avec un rendement de 86 %. Le produit n'est pas purifié, il sera utilisé sous sa forme brute lors de sa fixation sur la pâte Kraft propargylée.

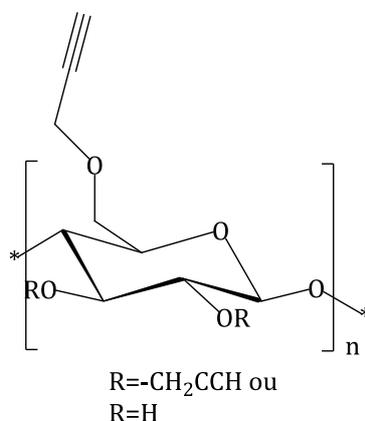
R_f = 0,75 (CHCl₃/EP; 7/3 ; V/V)

IR (cm⁻¹) 2119,26 et 2083,87 cm⁻¹ (deux bandes, élongation, N=N de l'azoture)

UV-Visible (CHCl₃), λ_{max} en nm : 426 (Soret), 559, 598

SM (MALDI): m/z = 720,16 [M+H]⁺.

VI.2.11 Préparation de la Pâte Kraft propargylée



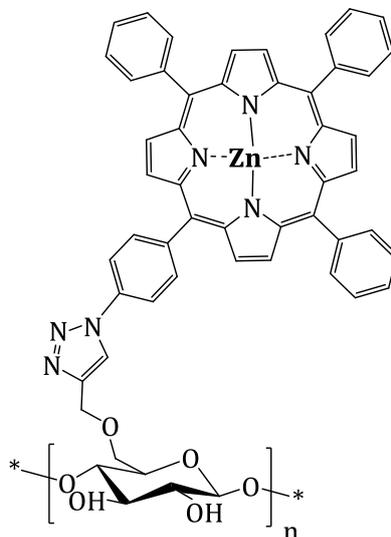
70 mL (0,621 mol, 5 éq.) de bromure de propargyle sont ajoutés à la dispersion de 10 g de pâte Kraft (0,062 mol d'unité anhydroglucose) préparée précédemment dans le système NaCl/H₂O. La réaction est placée sous agitation mécanique, à température ambiante. Après 24h, le mélange réactionnel est filtré sur Büchner et lavé avec 500 mL d'eau chaude et 500 mL d'éthanol chaud. Le produit obtenu, sous la forme de fibres blanches, est mis à sécher à l'étuve à 60°C.

Masse : 9,88 g; **Rendement massique** : 98,8 %, **DS**= 0,5

IR (cm⁻¹): 3460 (OH), 3291 (OH), 2119 (C≡C)

XPS (eV): 531, 00 (O_{1s}, 34,56 %), 285, 00 (C_{1s}, 65,44 %);

VI.2.12 Greffage par réaction de “Click chemistry” de la porphyrine azidée sur la pâte Kraft propargylée



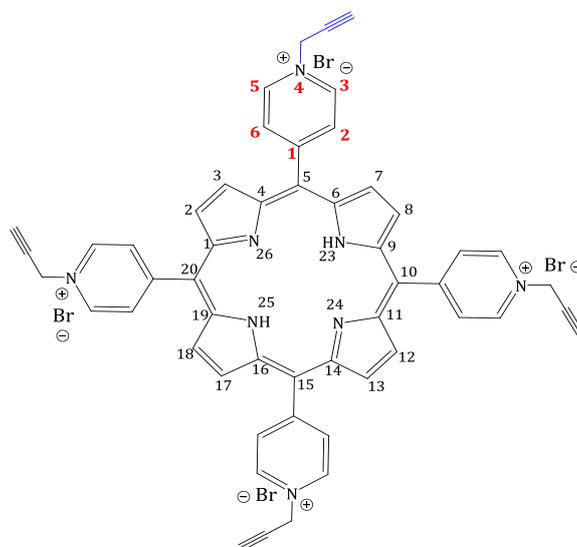
Dans un ballon de 50 mL, à 500 mg de fibres propargylées (D.S. 0,5 ; 0,1 mmol) sont ajoutés successivement 46 mg (0,185 mmol) de CuSO₄·5H₂O, puis 73 mg (0,370 mmol) d'ascorbate de sodium, chacun ayant été préalablement dissout dans 10 mL d'eau. Et enfin, 50 mg de Zn-TPP-N₃ préalablement dissout dans 5 mL de THF sont introduits. Après 24 heures à l'abri de la lumière, à température ambiante, le milieu réactionnel est filtré, puis les fibres sont lavées avec de l'eau et du chloroforme jusqu'à obtention d'un filtrat incolore. Enfin les fibres violettes sont séchées, le rendement massique est de 105 %.

Masse : 526 mg ; **Rendement massique** : 105 %, **DS** = 0,04

IR (cm⁻¹): 3438 (OH), 2119 (C≡C)

XPS (eV): 1020,00 (Zn_{2p}, 0,170 %), 531,00 (O_{1s}, 21,09 %), 399,00 (N_{1s}, 2,53 %), 285,00 (C_{1s}, 75,69 %).

VI.2.13 Propargylation de la 5,10,15,20-tetra(4-pyridyl)porphyrine (TPyP)



Dans un ballon, 50 mg (0.081 mmol) de tétrapyridylporphyrine (TPyP) sont dissous dans 5 mL de DMF puis, 7,6 mL de bromure de propargyle (8,1 mmol) sont ajoutés. La réaction est laissée sous agitation à température ambiante et suivi par ccm. Après 9 jours le produit est précipité dans l'éther, filtré et lavé avec du chloroforme. Le composé est obtenu sous l'aspect d'un solide violet avec un rendement quantitatif.

$R_f = 0,1$ (ButOH /CH₃COOH/H₂O; 2/1/1; V/V/V)

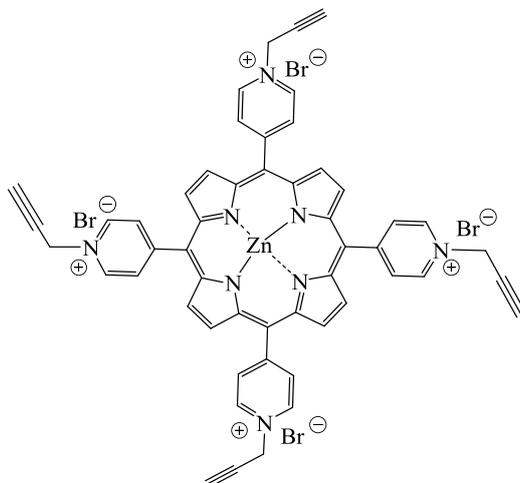
IR (cm⁻¹): 3324 (N-H_{pyrrole}), 2118 (C≡C)

RMN ¹H (DMSO, δ ppm) : 6,09 (s.él, 8H, CH₂ propargyle) ; 4,36 (t, 4H, CH propargyle) ; 9,65 (d, J=6,1Hz, 8H, H-3 et H-5) ; 9,09 (d, J=6,1Hz, 8H, H2 et H6) ; 9,27 (s.él, 8H, H pyrrole) ; - 3,06 (s, NH) ; -3,07(s, NH).

UV-Visible (CHCl₃), λ_{max} en nm : 434 (Soret), 521, 559, 596, 652

SM (MALDI): m/z = 1094,53 [M+H]⁺.

VI.2.14 Métallation de la tétrapropargylpyridylporphyrine



Dans un ballon de 100 mL, 80 mg (0.073 mmol) de tétrapropargylpyridylporphyrine (TPPyP) sont dissous dans 20 mL de MeOH puis on ajoute 160 mg (0,73 mmol) d'acétate de zinc hydraté ($\text{Zn}(\text{CH}_3\text{COO})_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$). Le mélange réactionnel est chauffé à reflux sous agitation et à l'abri de la lumière pendant deux heures. Le solvant est évaporé et les cristaux lavés. Le produit est utilisé tel quel sans purification pour la réaction suivante. Le composé est obtenu sous l'aspect d'un solide de coloration verdâtre avec un rendement de 95% (76 mg)

Masse= 76 mg ; Rendement : 95 %

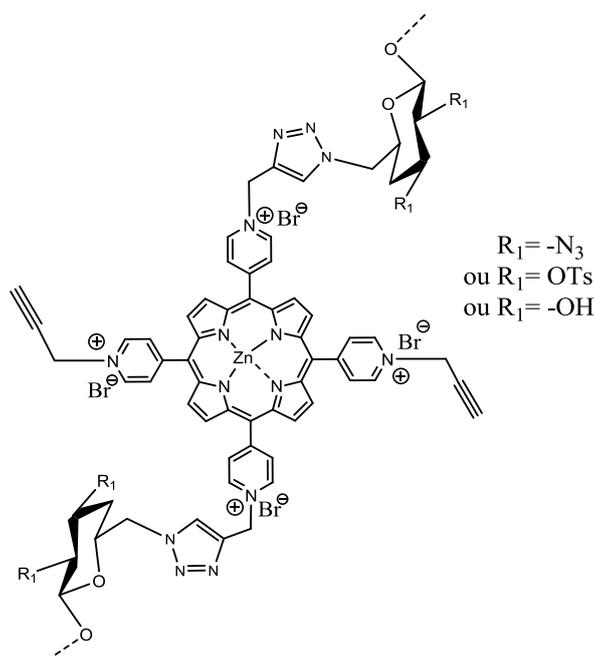
$R_f = 0,1$ (ButOH / $\text{CH}_3\text{COOH}/\text{H}_2\text{O}$; 2/1/1; V/V/V)

IR (cm⁻¹): 2118 (C≡C)

UV-Visible (CHCl_3), λ_{max} en nm : 434 (Soret), 559, 596

SM (MALDI): m/z = 1157,90 [M+H]⁺.

VI.2.15 Réaction de couplage entre la porphyrine Zn-TPPyP et la pâte azidée



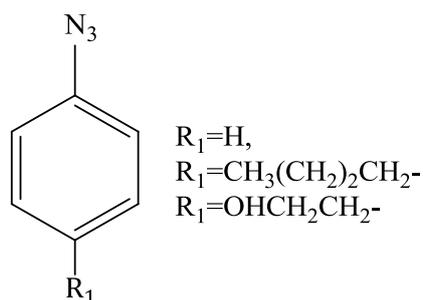
Dans un ballon, 80 mg (0.069 mmol) de tétrapropargylpyridylporphyrine métallée (Zn-TPPyP) sont dissous dans 10 mL de DMSO puis on ajoute 24 mg (0,153 mmol) de sulfate de cuivre ($CuSO_4, 5H_2O$) et 60 mg (0,305 mmol) d'ascorbate de sodium chacun dissout préalablement dans 5 mL d'eau. On ajoute alors 500 mg de pâte azidée (D.S. 0,09 ; 3,05 mmol) et on laisse la réaction à température ambiante, sous agitation et à l'abri de la lumière. Après 48h, le mélange réactionnel est filtré sur fritté et la pâte porphyrinique lavée plusieurs fois au méthanol jusqu'à obtention d'un filtrat incolore. La pâte obtenue a une coloration verte.

Masse= 525 mg ; Rendement massique : 105 %, **DS**= 0,06

IR (cm⁻¹): 2118 (C≡C)

XPS (eV) : 1020,00 (Zn_{2p}, 0,250 %), 532,00 (O_{1s}, 33,26 %), 399,00 (N_{1s}, 2,55 %), 285,00 (C_{1s}, 63,58 %), 168,00 (S_{2p}, 0,36 %).

VI.2.16 Synthèse des dérivés azidoaryles



Dans un bicol, une solution d'aminoaryle (1 éq.) est dissoute dans un mélange de solution d'acétate d'éthyle et d'eau. Ensuite on additionne un volume d'une solution d'HCl à 37 %. On place le mélange à 0°C et on ajoute, goutte à goutte du nitrite de sodium, (2 éq.) dissout dans de l'eau distillée. Au bout de 30 min, on rajoute également goutte à goutte de l'azoture de sodium (2 éq.) préalablement solubilisés dans de l'eau distillée. La réaction se poursuit pendant 2h, puis le produit est extrait par 2 x 100 mL d'acétate d'éthyle. La phase organique est lavée avec 100 mL d'une solution saturée de NaHCO₃, puis avec 100 mL d'eau. La phase organique est séchée sur MgSO₄, puis on filtre et on évapore le solvant. On obtient une huile de couleur marron que l'on conserve à congélation.

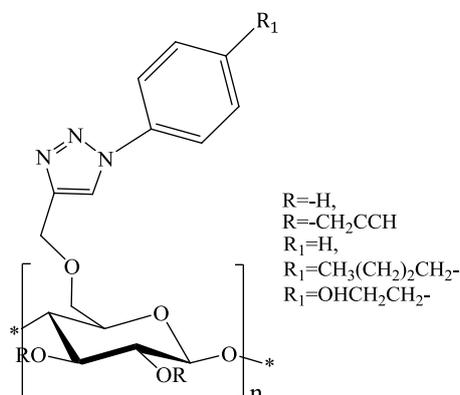
Produits	Aminoaryles	NaNO ₂	NaN ₃	HCl à 37 %	Acétate d'éthyle/H ₂ O	Rdts
Azb	4,01 mL (44 mmol)	6,07 g (88 mmol)	5,72 g (88 mmol)	24 mL	80 mL/10 mL	82 %
Hazb	2,05 mL (22 mmol)	3,03 g (44 mmol)	2,86 g (44 mmol)	12 mL	40 mL/5 mL	82 %
Bazb	6,57 mL (44 mmol)	6,07 g (88 mmol)	5,72 g (88 mmol)	24 mL	80 mL/10 mL	98 %

Azidobenzène (Azb): Rdt: 93 %; $R_f = 0,74$ (CHCl₃/EP; 7/3; V/V); **IR** (cm⁻¹): Deux bandes à 2129,67 et 2095,80 (N=N); **RMN ¹H** (CDCl₃): δppm = 7,35 (t, J=8,40 Hz, 2H); 7,14 (t, J=8,40 Hz, 2H); 7,04 (d, J=8,52 Hz, 1H)

Hydroxyéthylazidobenzène (Hazb) : *Rdt*: 95 %; *IR* (cm^{-1}): Une bande intense à 2112,21 (N=N) ; *RMN ^1H* (CDCl_3) : δppm = 7,15 (d, $J=8,40$ Hz, 2H) ; 6,98 (d, $J=8,40$ Hz, 2H) ; 3,84 (t, $J=6,48$ Hz, 2H) ; 2,84 (t, $J=6,48$ Hz, 2H) ; 2,04 (s, 1H)

Butylazidobenzène (Bazb) : *Rdt*: 98 %; *IR* (cm^{-1}): Une bande intense à 2108,87 (N=N) ; *RMN ^1H* (CDCl_3) : δppm = 7,16 (d, $J=8,40$ Hz, $2\text{H}_{3,5}$) ; 6,98 (d, $J=8,40$ Hz, $2\text{H}_{2,6}$) ; 2,58 (t, $J=7,76$ Hz, 2H) ; 1,57 (q, $J=7,32$ Hz, $J=7,76$ Hz, 2H) ; 1,34 (st, $J=7,4$, $J=7,76$, et $J=7,32$ Hz, 2H), 0,92 (t, $J=7,32$ Hz, 3H)

VI.2.17 Réaction de couplage entre la pâte propargylée et les dérivés azidoaryles



Dans un ballon de 100 mL, on introduit dans un ballon, le dérivé azidoaryle (2 éq. /UAG) en présence de THF. Puis on additionne au mélange du $CuSO_4 \cdot 5H_2O$ (0,05 éq.); et de l'ascorbate de sodium (0,1 éq), chacun préalablement dissous dans de l'eau distillée. On ajoute ensuite de la pâte propargylée (DS=0,5, 1 éq.) et on place la réaction sous agitation magnétique, à température ambiante, pendant 3 jours. On filtre le produit et les fibres obtenues sont lavées avec du THF, jusqu'à filtrat incolore avant d'être mise à l'étuve à 60°C.

Produits	Azoture d'aryles	$CuSO_4 \cdot 5 H_2O$	NaAsc.	PK-PROP	THF/ H_2O	Rdts
PK-Azb	1,35 g (10,4 mmol)	65 mg (0,26 mmol)	103 mg (0,5 mmol)	1 g (5,2 mmol)	40 mL/10 mL	108 %
PK-Hazb	3,93 g (20,8 mmol)	130 mg (0,52 mmol)	207 mg (1 mmol)	2 g (10,4 mmol)	80 mL/10 mL	100 %
PK-Bazb	1,7 g (10,4 mmol)	65 mg (0,26 mmol)	103 mg (0,5 mmol)	1 g (5,2 mmol)	40 mL/10 mL	101 %

Analyses : Les analyses concernant les matériaux PK-Azb, PK-Hazb et PK-Bazb sont en cours.

VI.2.18 Souches bactériennes

Souches bactériennes. 3 souches bactériennes utilisées pour les essais *in vitro* proviennent de la collection de l'Institut Pasteur (Paris) : *Escherichia coli* (*E. coli*, CIP 54.8T), *Staphylococcus aureus* (*S.aureus*, CIP7625), et *Pseudomonas aeruginosa* (*P. aeruginosa*, CIP76110). Une quatrième souche bactérienne, *Bacillus cereus* (*B.cereus* CH) provient de la société Anyang Yuanshou® (Chine).

Les deux souches bactériennes *E. coli* et *P. aeruginosa* possèdent une structure de paroi caractéristique des bactéries Gram (-). Les deux souches bactériennes *S.aureus* et *B.cereus* possèdent une structure de paroi caractéristique des bactéries Gram (+). Ces quatre souches constituent de bons modèles d'étude *in vitro* pour évaluer l'activité biologique de nouveaux agents antibactériens supportés ou non.

E. coli possède l'avantage d'être une bactérie ubiquitaire, présent dans de nombreux environnements. *P. aeruginosa* et *S. aureus* présentent l'avantage de pouvoir former un biofilm et sont régulièrement impliqués dans les infections chroniques. *B. cereus* a la capacité de former des spores correspondant à un état physiologique qui permet à cette souche d'être résistante à différents traitements chimiques ou thermiques.

Conditions de croissance bactérienne: Les différentes souches bactériennes sont cultivées dans un milieu nutritif non-sélectif (bouillon de soja, Tryptic Soy TS, Difco) durant une nuit à 37 °C en condition aérobie. Le milieu TS est constitué de 17 g/L d'une digestion pancréatique de caséine, 3 g/L d'une digestion papainique de farine de soja, 2,5 g/L de dextrose, 5 g/L de chlorure de sodium et 2,5 g/L de phosphate dipotassique. Le pH du milieu est fixé à $7,3 \pm 0,2$. Avant utilisation, le milieu est autoclavé pendant 15 minutes à 120 °C.

Le milieu TS est utilisé sous forme de bouillon (culture en milieu liquide) ou de milieu gélosé par addition d'agar à 17 g/L. Les cultures liquides sont préparées à partir d'inoculum à raison de 1 % (v/v) de préculture puis incubées à 37 °C sous agitation orbitale à 100 tours par min.

VI.2.19 Détermination de la concentration d'une suspension bactérienne

Principe :

Lors des expériences de mise en contact des bactéries avec les différents supports, une quantité précise de bactéries (UFC) doit être déposée sur les supports testés au temps t_0 . Afin de pouvoir réaliser ce dépôt de bactéries, il est nécessaire d'avoir une méthode simple grâce à une mesure de DO à 600nm et l'exploitation de la loi de Beer-Lambert pour estimer la concentration en UFC/mL d'une suspension bactérienne. Une expérience en deux étapes est réalisée pour déterminer la valeur ϵ de chaque souche bactérienne.

Les résultats obtenus de ϵ sont valables pour une souche bactérienne donnée et un milieu de culture donné. Il faut recommencer les manipulations dès que l'un des deux paramètres change.

Cette expérience est réalisée en deux étapes :

Etape 1 : *Détermination de la concentration bactérienne de la suspension initiale*

On réalise des dilutions de la suspension bactérienne utilisée avec le milieu de culture choisi, puis on effectue des ensemencements. Après 24h d'incubation à 37°C, on procède à un dénombrement en considérant qu'une colonie provient d'une bactérie (= UFC, Unité Formant Colonies).

Pour déterminer la concentration bactérienne C de la suspension, on réalise le calcul suivant :

$$X(\text{UFC/ml}) = \frac{\text{Nombre de colonies comptées (en UFC)}}{\text{Volume de suspensionensemencé (en ml)}} \times \text{facteur de dilution}$$

Etape 2 : *Corrélation entre DO_{600nm} et dilution*

On réalise des dilutions dans le milieu de culture choisi de la suspension bactérienne initiale et on lit la DO à 600nm de chacune des préparations (le milieu de culture sans bactéries servira de référence). On trace ensuite la courbe $DO_{600nm} = f(\text{dilutions})$. On considère alors que la partie linéaire de la courbe suit la loi de Beer-Lambert ($DO = \epsilon \times l$

x C). Connaissant la concentration C de la suspension initiale (déterminée à l'étape 1), en prenant une valeur de DO sur la partie linéaire de la courbe, on peut déterminer ε :

$$\varepsilon = DO / l \times C$$

avec DO sans unité, l en cm et C en UFC/mL

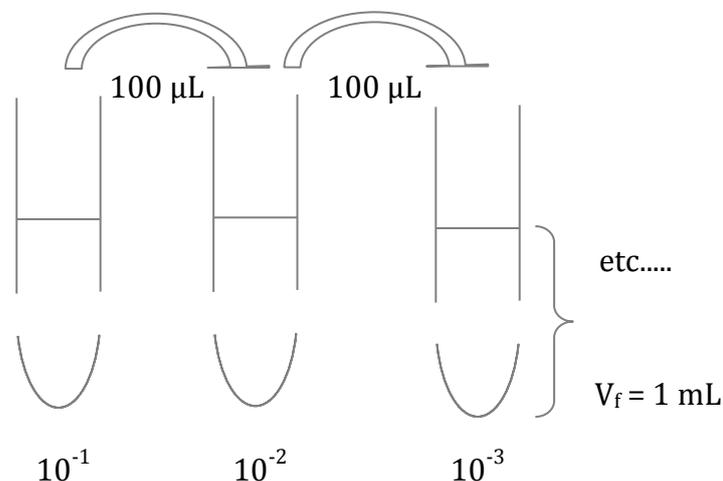
Connaissant ε , on pourra alors déterminer C directement par une lecture de DO (à condition que la DO en question se situe dans la zone linéaire de la courbe, dans le cas contraire, il faudra procéder à une dilution et en tenir compte dans le calcul.

Protocole :

Les expériences ont été réalisées sur chaque souche. Les cultures liquides sont préparées à partir d'inoculum à raison de 1 % (v/v) de préculture puis incubées à 37 °C sous agitation orbitale à 100 tours par min pendant une nuit.

Etape 1 :

Les dilutions sont réalisées en cascade, de 10^{-1} à 10^{-6} , dans de l'eau physiologique stérile pour un volume final de 1 mL.



Les préparations sont homogénéisées et les ensemencements sont effectués à l'aide d'un enseigneur automatique de boîtes de Petri Spiral DS® (Interscience) sur du milieu de culture gélosé Tryptic Soy Agar (Tryptic Soy à 30 g/L, Becton, Dickinson, Agar à 17g/L), puis mis à incuber 24h à 37°C. Deux ensemencements sont réalisés par dilution. Le



dénombrement des colonies après incubation est réalisé grâce à une grille de comptage (Interscience).

Etape 2 :

Les dilutions sont réalisées dans du milieu de culture liquide Tryptic Soy stérile.

Dilutions	1/30 ^e	1/20 ^e	1/15 ^e	1/10 ^e	2/10 ^e	3/10 ^e	4/10 ^e	5/10 ^e	6/10 ^e	8/10 ^e	non-dilué
Volume milieu (µL)	1450	950	1400	900	800	700	600	500	400	200	0
Volume suspension (µL)	50	50	100	100	200	300	400	500	600	800	1000
Volume total (mL)	1,5	1	1,5	1	1	1	1	1	1	1	1

Les préparations sont homogénéisées avant la lecture de DO_{600nm} , qui est faite grâce à un spectrophotomètre UV/Visible (Kontron).

VI.2.1 Evaluation biologique des supports non-photosensibles (Triclosan et Azidoaryles)

L'évaluation de l'activité antibactérienne de ces 2 types de matériau a été réalisée selon une méthode basée sur la norme AATCC Test Method 100 – 2012 « Assessment of Antibacterial Finishes on Textile Materials ». C'est une méthode quantitative normalisée pour les textiles qui se déroule en deux étapes : (i) un dénombrement des bactéries à t_0 suivi (ii) d'un dénombrement à t_{24} , qui permet de tester l'activité antibactérienne après 24 h de contact.

Les tests microbiologiques ont été réalisés sur quatre souches bactériennes: deux souches bactériennes Gram(+), *B. cereus* CH et *S. aureus* CIP 7625, et deux souches

bactériennes Gram (-), *E. coli* CIP 54.8T et *P. aeruginosa* CIP 76110 pour le matériau pâte Kraft Triclosan.

Pour les matériaux dérivés des matériaux pâte Kraft Azidoaryles, les tests biologiques ont été réalisés sur les souches *S. aureus* CIP 7625 et *E. coli* CIP 54.8T.

A partir d'une culture bactérienne en phase exponentielle de croissance, une suspension bactérienne à une concentration déterminée (10^5 UFC/mL) est préparée dans un milieu nutritif Trypticase soja (TS). 100 μ L de cette suspension à 10^5 UFC/mL ont été déposés sur trois disques du même échantillon (1 disque pour le dénombrement à t_0 et 2 disques restants pour le dénombrement à t_{24}).

Directement après le dépôt de la suspension bactérienne, un disque est récupéré et transféré dans 1mL d'eau physiologique 0,9 % NaCl + 0,5% Triton X-100 puis agité vigoureusement pendant deux heures afin de décrocher toutes les bactéries des différents matériaux. Ensuite, des dilutions en série au 10ème sont effectuées et ensemencées sur des milieux gélosés (TS + 17 g/L Agar). Après 24h d'incubation à 37°C, les colonies bactériennes sont dénombrées, ce qui correspond à t_0 .

Les deux disques restants sont laissés à 37°C. Après 24 heures de contact avec le matériau, ces derniers sont traités de la même façon que le premier disque (t_0), afin de dénombrer les bactéries, ce qui correspond à t_{24} .

VI.2.2 Photoinactivation bactérienne

Les deux souches bactériennes utilisées pour les essais *in vitro* sont : *Staphylococcus aureus* (CIP7625) et *Pseudomonas aeruginosa* (CIP76110).

Conditions de croissance bactérienne. Les souches de *S. aureus* et de *P. aeruginosa* sont cultivées dans le milieu nutritif TS durant une nuit à 37°C en condition aérobie.

Source lumineuse. Le dispositif d'éclairage utilisé est un système conçu par la société DIOPTIK® (Limoges, France). La source lumineuse (lumière blanche visible, 400-800 nm) de type LED (Light-Emitting Diode) est un modèle Luxéon® Star white Lambertian LXHL-MW1D 5500K (45 lm, 3,42 V, 350 mA). Le système d'éclairage, équipé de six LEDs incorporées dans un support et maintenues à une hauteur de 10 cm des échantillons, est

placé à l'intérieur d'une étuve ventilée et thermostatée à 37 °C permettant une croissance bactérienne optimale. La photographie du dispositif PACT est illustrée ci-dessous (**Figure VI:6**).



Figure VI:6 Dispositif de PACT

Exposition lumineuse. Les matériaux sont irradiés durant 24 heures en conditions aérobies avec une fluence (ou dosimétrie) égale à $9,5 \text{ J/cm}^2$.

Traitement photodynamique des matériaux. Les disques porphyriniques et de matériaux précurseurs non greffés ($d=8 \text{ mm}$) stériles (autoclavés 15 minutes à 120 °C) sont imprégnés respectivement avec $50 \text{ }\mu\text{L}$ d'un inoculum bactérien de densité cellulaire égale à 10^5 Unité Formant Colonie par mL (UFC/mL). Afin de déterminer le nombre d'UFC initialement déposé sur le disque ($t=0$), les échantillons sont transférés dans 1 mL de solution d'eau physiologique à $0,5 \text{ \%}$ (v/v) Triton X-100. Après 2 heures d'agitation à température ambiante, des dilutions en séries sont préparées. $100 \text{ }\mu\text{L}$ de chaque dilution sont étalés sur milieu TS gélosé par un ensemenceur automatique SPIRAL® DS plater (Interscience). Après incubation de 24 heures à 37 °C , les cellules bactériennes viables sont dénombrées et les résultats sont exprimés en nombre d'UFC/mL. Les essais contrôles à l'obscurité des disques porphyriniques et des fibres Kraft précurseurs ont également été effectués dans les mêmes conditions expérimentales.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- [1] J.C. Desenclos, H. De Valk, Emergent infectious diseases: importance for public health, epidemiology, promoting factors, and prevention, *Med. Mal. Infect.* 35 (2005) 49–61. doi:10.1016/j.medmal.2004.09.005.
- [2] L. Hall-Stoodley, J.W. Costerton, P. Stoodley, Bacterial biofilms: from the natural environment to infectious diseases., *Nat. Rev. Microbiol.* 2 (2004) 95–108. doi:10.1038/nrmicro821.
- [3] RAISIN (Réseau d’alerte d’investigation et de surveillance des infections nosocomiales), Enquête nationale de prévalence des infections nosocomiales et des traitements anti-infectieux en établissements de santé, France, mai-juin 2012, (2012) 186. <http://www.invs.sante.fr/Publications-et-outils/Rapports-et-syntheses/Maladies-infectieuses/2013/Enquete-nationale-de-prevalence-des-infections-nosocomiales-et-des-traitements-anti-infectieux-en-etablissements-de-sante-France-mai-juin-2012>.
- [4] Ministère de la Santé Publique, Les infections nosocomiales, *Médecine & Droit.* 2005 (2005) 15–22. doi:10.1016/j.meddro.2005.03.003.
- [5] C.J. Donskey, Does improving surface cleaning and disinfection reduce health care-associated infections?, *Am. J. Infect. Control.* 41 (2013) S12–S19. doi:10.1016/j.ajic.2012.12.010.
- [6] B.R. Coad, S.E. Kidd, D.H. Ellis, H.J. Griesser, Biomaterials surfaces capable of resisting fungal attachment and biofilm formation, *Biotechnol. Adv.* 32 (2014) 296–307. doi:10.1016/j.biotechadv.2013.10.015.
- [7] C.M. Cassidy, R.F. Donnelly, J.S. Elborn, N.D. Magee, M.M. Tunney, Photodynamic Antimicrobial Chemotherapy (PACT) in combination with antibiotics for treatment of *Burkholderia cepacia* complex infection, *J. Photochem. Photobiol. B Biol.* 106 (2012) 95–100. doi:10.1016/j.jphotobiol.2011.10.010.
- [8] F. Squinazi, Spectrométrie de masse Analyses en microbiologie - Principe Environnement Par : Analyses en microbiologie Environnement microbien (air , surfaces , eau), (2014).
- [9] L. Hall-Stoodley, P. Stoodley, Biofilm formation and dispersal and the transmission of human pathogens, *Trends Microbiol.* 13 (2005) 7–10. doi:10.1016/j.tim.2004.11.004.
- [10] J.W. Costerton, P.S. Stewart, E.P. Greenberg, Bacterial biofilms: a common cause of persistent infections., *Science.* 284 (1999) 1318–1322. doi:10.1126/science.284.5418.1318.
- [11] R.M. Donlan, Biofilms: Microbial life on surfaces, *Emerg. Infect. Dis.* 8 (2002) 881–890. doi:10.3201/eid0809.020063.
- [12] W.M. Dunne, W.M. Dunne, Bacterial Adhesion: Seen Any Good Bio lms Lately?, *Society.* 15 (2002) 155–166. doi:10.1128/CMR.15.2.155.
- [13] F. SQUINAZI, Analyses en microbiologie-Environnement microbien (air, surfaces,eau), *Tech. L’ingénieur-Qualité Sécurité Au Lab.* 3355 (2006) 1–5.



<http://www.techniques-ingenieur.fr/base-documentaire/mesures-analyses-th1/securite-au-laboratoire-42378210/analyses-en-microbiologie-p3355/>.

- [14] R.F. Mueller, W.G. Characklis, W.L. Jones, J.T. Sears, Characterization of initial events in bacterial surface colonization by two *Pseudomonas* species using image analysis., *Biotechnol. Bioeng.* 39 (1992) 1161–1170. doi:10.1002/bit.260391113.
- [15] O. Habimana, a. J.C. Semião, E. Casey, The role of cell-surface interactions in bacterial initial adhesion and consequent biofilm formation on nanofiltration/reverse osmosis membranes, *J. Memb. Sci.* 454 (2014) 82–96. doi:10.1016/j.memsci.2013.11.043.
- [16] M. Schembri, K. Kjaergaard, P. Klemm, Global gene expression in *Escherichia coli* biofilms., *Mol. Microbiol.* 48 (2003) 253–267. doi:10.1046/j.1365-2958.2003.03432.x.
- [17] C. Beloin, J. Valle, P. Latour-Lambert, Global impact of mature biofilm lifestyle on *Escherichia coli* K-12 gene expression, *Mol. Microbiol.* 51 (2004) 659–674. doi:10.1046/j.1365-2958.2003.03865.x.
- [18] S.M. Hunt, M. a. Hamilton, J.T. Sears, G. Harkin, J. Reno, A computer investigation of chemically mediated detachment in bacterial biofilms, *Microbiology.* 149 (2003) 1155–1163. doi:10.1099/mic.0.26134-0.
- [19] J. Wiley, *Wiley, Bacterial Adhesion: Molecular and Ecological Diversity*, Madilyn Fl, 1996.
[https://books.google.fr/books?id=bYmsjh4ppZYC&lpg=PA1&ots=_LyvvtKEqX&dq=adversity of surfaces and adhesion strategies&lr&hl=fr&pg=PA1#v=onepage&q&f=false](https://books.google.fr/books?id=bYmsjh4ppZYC&lpg=PA1&ots=_LyvvtKEqX&dq=adversity+of+surfaces+and+adhesion+strategies&lr&hl=fr&pg=PA1#v=onepage&q&f=false).
- [20] M.C. van Loosdrecht, J. Lyklema, W. Norde, G. Schraa, J. Zehnder, The role of bacterial cell wall hydrophobicity in adhesion, *Appl. Environ. Microbiol.* 53 (1987) 1893–1897. doi:0099-2240/87/081893-05\$02.00/0.
- [21] J.H. Pringle, M. Fletcher, Influence of substratum wettability on attachment of freshwater bacteria to solid surfaces, *Appl. Environ. Microbiol.* 45 (1983) 811–817.
- [22] M. Rosenberg, E. a. Bayer, J. Delarea, E. Rosenberg, Role of thin fimbriae in adherence and growth of *Acinetobacter calcoaceticus* RAG-1 on hexadecane, *Appl. Environ. Microbiol.* 44 (1982) 929–937.
- [23] G. Long, P. Zhu, Y. Shen, M. Tong, Influence of extracellular polymeric substances (EPS) on deposition kinetics of bacteria, *Environ. Sci. Technol.* 43 (2009) 2308–2314. doi:10.1021/es802464v.
- [24] A.W. Qurashi, A.N. Sabri, Bacterial exopolysaccharide and biofilm formation stimulate chickpea growth and soil aggregation under salt stress, *Brazilian J. Microbiol.* 43 (2012) 1183–1191. doi:10.1590/S1517-83822012000300046.
- [25] A. Subramani, E.M. V Hoek, Direct observation of initial microbial deposition onto reverse osmosis and nanofiltration membranes, *J. Memb. Sci.* 319 (2008) 111–125. doi:10.1016/j.memsci.2008.03.025.
- [26] B.E. Ramey, M. Koutsoudis, S.B. Von Bodman, C. Fuqua, Biofilm formation in plant-



- microbe associations, *Curr. Opin. Microbiol.* 7 (2004) 602–609. doi:10.1016/j.mib.2004.10.014.
- [27] T.J. Marrie, J. Nelligan, J.W. Costerton, A scanning and transmission electron microscopic study of an infected endocardial pacemaker lead., *Circulation.* 66 (1982) 1339–1341. doi:10.1161/01.CIR.66.6.1339.
- [28] J. Lam, R. Chan, K. Lam, J.W. Costerton, Production of mucoid microcolonies by *Pseudomonas aeruginosa* cystic fibrosis., *Infect. Immun.* 28 (1980) 546–556.
- [29] D. Lebeaux, J.-M. Ghigo, C. Beloin, Tolérance des biofilms aux antibiotiques : comprendre pour mieux traiter, *J. Des Anti-Infectieux.* 16 (2014) 112–121. doi:10.1016/j.antinf.2014.04.001.
- [30] P.S. Stewart, Guest commentaries diffusion in biofilms why is diffusion an important process, *Society.* 185 (2003) 1485–1491. doi:10.1128/JB.185.5.1485.
- [31] W.W. Nichols, S.M. Dorrington, M.P.E. Slack, H.L. Walmsley, Inhibition of tobramycin diffusion by binding to alginate, *Antimicrob. Agents Chemother.* 32 (1988) 518–523. doi:10.1128/AAC.32.4.518.
- [32] G. James, Biofilms , the Customized Microniche, *J. Bacteriol.* 176 (1994) 2137–2142.
- [33] E. Tuomanen, R. Cozens, W. Tosch, O. Zak, Tomasz, The rate of killing of *Escherichia coli* by beta-lactam antibiotics is strictly proportional to the rate of bacterial growth., *J. Gen. Microbiol.* 132 (1986) 1297–1304. doi:10.1099/00221287-132-5-1297.
- [34] P. Baudoux, N. Bles, S. Lemaire, M.P. Mingeot-Leclercq, P.M. Tulkens, F. Van Bambeke, Combined effect of pH and concentration on the activities of gentamicin and oxacillin against *Staphylococcus aureus* in pharmacodynamic models of extracellular and intracellular infections, *J. Antimicrob. Chemother.* 59 (2007) 246–253. doi:10.1093/jac/dkl489.
- [35] I. Sadovskaya, E. Vinogradov, J. Li, A. Hachani, K. Kowalska, A. Filloux, High-level antibiotic resistance in *Pseudomonas aeruginosa* biofilm: The *ndvB* gene is involved in the production of highly glycerol-phosphorylated $\beta(1\rightarrow3)$ -glucans, which bind aminoglycosides, *Glycobiology.* 20 (2010) 895–904. doi:10.1093/glycob/cwq047.
- [36] A.L. Spoering, K. Lewis, Biofilms and planktonic cells of *Pseudomonas aeruginosa* have similar resistance to killing by antimicrobials, *J. Bacteriol.* 183 (2001) 6746–6751. doi:10.1128/JB.183.23.6746-6751.2001.
- [37] K. Lewis, Multidrug tolerance of biofilms and persister cells, *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 322 (2008) 107–131. doi:10.1007/978-3-540-75418-3_6.
- [38] K. Bazaka, M. V. Jacob, R.J. Crawford, E.P. Ivanova, Efficient surface modification of biomaterial to prevent biofilm formation and the attachment of microorganisms., *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 95 (2012) 299–311. doi:10.1007/s00253-012-4144-7.
- [39] C.R. Arciola, D. Campoccia, P. Speziale, L. Montanaro, J.W. Costerton, Biofilm formation in *Staphylococcus* implant infections. A review of molecular



- mechanisms and implications for biofilm-resistant materials, *Biomaterials*. 33 (2012) 5967–5982. doi:10.1016/j.biomaterials.2012.05.031.
- [40] D. Campoccia, L. Montanaro, C.R. Arciola, A review of the biomaterials technologies for infection-resistant surfaces, *Biomaterials*. 34 (2013) 8533–8554. doi:10.1016/j.biomaterials.2013.07.089.
- [41] A. Foka, M.G. Katsikogianni, E.D. Anastassiou, I. Spiliopoulou, Y.F. Missirlis, The combined effect of surface chemistry and flow conditions on *Staphylococcus epidermidis* adhesion and *ica* operon expression, *Eur. Cells Mater*. 24 (2012) 386–402.
- [42] O. Gordon, T.V. Slenters, P.S. Brunetto, A.E. Villaruz, D.E. Sturdevant, M. Otto, et al., Silver coordination polymers for prevention of implant infection: Thiol interaction, impact on respiratory chain enzymes, and hydroxyl radical induction, *Antimicrob. Agents Chemother*. 54 (2010) 4208–4218. doi:10.1128/AAC.01830-09.
- [43] M.J. Hajipour, K.M. Fromm, A. Akbar Ashkarran, Antibacterial properties of nanoparticles, *Trends Biotechnol*. 30 (2012) 499–511. doi:10.1016/j.tibtech.2012.06.004.
- [44] C.R. Arciola, L. Montanaro, J.W. Costerton, New trends in diagnosis and control strategies for implant infections, *Int. J. Artif. Organs*. 34 (2011) 727–736. doi:10.5301/IJA0.2011.8784.
- [45] B. Hu, X. Chen, Y. Zuo, Z. Liu, X. Xing, Dual action bactericides: Quaternary ammonium/N-halamine-functionalized cellulose fiber, *J. Appl. Polym. Sci*. 131 (2014) 1–7. doi:10.1002/app.40070.
- [46] E. Poverenov, M. Shemesh, A. Gulino, D.A. Cristaldi, V. Zakin, T. Yefremov, Durable contact active antimicrobial materials formed by a one-step covalent modification of polyvinyl alcohol, cellulose and glass surfaces, *Colloids Surfaces B Biointerfaces*. 112 (2013) 356–361. doi:10.1016/j.colsurfb.2013.07.032.
- [47] Y. Liu, X. Cui, C. Hao, F. Tao, J. Li, Modified gelatin with quaternary ammonium salts containing epoxide groups, 25 (2014) 1193–1197.
- [48] Y. Liu, K. Ma, R. Li, X. Ren, T.S. Huang, Antibacterial cotton treated with N-halamine and quaternary ammonium salt, *Cellulose*. 20 (2013) 3123–3130. doi:10.1007/s10570-013-0056-7.
- [49] Y. Liu, X. Ren, T.S. Huang, Antimicrobial cotton containing N-halamine and quaternary ammonium groups by grafting copolymerization, *Appl. Surf. Sci*. 296 (2014) 231–236. doi:10.1016/j.apsusc.2014.01.106.
- [50] M. Davidovich-Pinhas, Y. Danin-Poleg, Y. Kashi, H. Bianco-Peled, Modified chitosan: A step toward improving the properties of antibacterial food packages, *Food Packag. Shelf Life*. 1 (2014) 160–169. doi:10.1016/j.fpsl.2014.01.007.
- [51] M. Periolatto, F. Ferrero, C. Vineis, A. Varesano, Antibacterial water filtration by cationized or chitosan coated cotton gauze, *Chem. Eng. Trans*. 38 (2014) 235–240. doi:10.3303/CET1438040.
- [52] A. Cooper, R. Oldinski, H. Ma, J.D. Bryers, M. Zhang, Chitosan-based nanofibrous

- membranes for antibacterial filter applications, *Carbohydr. Polym.* 92 (2013) 254–259. doi:10.1016/j.carbpol.2012.08.114.
- [53] V. Speranza, A. Sorrentino, F. De Santis, R. Pantani, Characterization of the polycaprolactone melt crystallization: Complementary optical microscopy, DSC, and AFM studies, *Sci. World J.* 2014 (2014). doi:10.1155/2014/720157.
- [54] P. Gilbert, L.E. Moore, Cationic antiseptics: Diversity of action under a common epithet, *J. Appl. Microbiol.* 99 (2005) 703–715. doi:10.1111/j.1365-2672.2005.02664.x.
- [55] A. Kawabata, J.A. Taylor, The effect of reactive dyes upon the uptake and antibacterial efficacy of poly(hexamethylene biguanide) on cotton. Part 3: Reduction in the antibacterial efficacy of poly(hexamethylene biguanide) on cotton, dyed with bis(monochlorotriazinyl) reactive dyes, *Carbohydr. Polym.* 67 (2007) 375–389. doi:10.1016/j.carbpol.2006.06.022.
- [56] R.S. Blackburn, A. Harvey, L.L. Kettle, A.P. Manian, J.D. Payne, S.J. Russell, Sorption of chlorhexidine on cellulose: Mechanism of binding and molecular recognition, *J. Phys. Chem. B.* 111 (2007) 8775–8784. doi:10.1021/jp070856r.
- [57] S. Li, D. Wei, Y. Guan, A. Zheng, Preparation and characterization of a permanently antimicrobial polymeric material by covalent bonding, *Eur. Polym. J.* 51 (2014) 120–129. doi:10.1016/j.eurpolymj.2013.12.004.
- [58] T. Liu, X. Song, Z. Guo, Y. Dong, N. Guo, X. Chang, Prolonged antibacterial effect of silver nanocomposites with different structures, *Colloids Surfaces B Biointerfaces.* 116 (2014) 793–796. doi:10.1016/j.colsurfb.2014.01.010.
- [59] K.I. Dhanalekshmi, K.S. Meena, Comparison of antibacterial activities of Ag/TiO₂ and Ag/SiO₂ core-shell nanoparticles, *Spectrochim. Acta - Part A Mol. Biomol. Spectrosc.* 128 (2014) 887–890. doi:10.1016/j.saa.2014.02.063.
- [60] P. Petkova, A. Francesko, M.M. Fernandes, E. Mendoza, I. Perelshtein, A. Gedanken, Sonochemical coating of textiles with hybrid ZnO/chitosan antimicrobial nanoparticles, *ACS Appl. Mater. Interfaces.* 6 (2014) 1164–1172. doi:10.1021/am404852d.
- [61] G.C. Tron, T. Pirali, R.A. Billington, P.L. Canonico, G. Sorba, A.A. Genazzani, Click Chemistry Reactions in Medicinal Chemistry: Applications of the 1,3-dipolar Cycloaddition Between Azides and Alkynes, *Med. Res. Rev.* 28 (2008) 278–308. doi:10.1002/med.
- [62] P. Faugeras, Valorisation des fibres lignocellulosiques de la pâte à papier, Université de Limoges, 2012. <http://epublications.unilim.fr/theses/2012/faugeras-pierre-antoine/faugeras-pierre-antoine.pdf>.
- [63] C. Daneault, CHM6001 - Chimie du bois et des dérivés cellulosiques, in: n.d.
- [64] N. a. Ibrahim, B.M. Eid, T.M.A. Elmaaty, E.A. El-Aziz, A smart approach to add antibacterial functionality to cellulosic pigment prints, *Carbohydr. Polym.* 94 (2013) 612–618. doi:10.1016/j.carbpol.2013.01.040.
- [65] N.A. Ibrahim, B.M. Eid, H.M. Khalil, Cellulosic/wool pigment prints with

- remarkable antibacterial functionalities, *Carbohydr. Polym.* 115 (2015) 559–567. doi:10.1016/j.carbpol.2014.09.013.
- [66] R. Li, M. He, T. Li, L. Zhang, Preparation and properties of cellulose/silver nanocomposite fibers, *Carbohydr. Polym.* 115 (2015) 269–275. doi:10.1016/j.carbpol.2014.08.046.
- [67] T.A. Dankovich, J.A. Smith, Incorporation of copper nanoparticles into paper for point-of-use water purification, *Water Res.* 63 (2014) 245–251. doi:10.1016/j.watres.2014.06.022.
- [68] O. Kukharenko, J.-F. Bardeau, I. Zaets, L. Ovcharenko, O. Tarasyuk, S. Porhyn, Promising low cost antimicrobial composite material based on bacterial cellulose and polyhexamethylene guanidine hydrochloride, *Eur. Polym. J.* 60 (2014) 247–254. doi:10.1016/j.eurpolymj.2014.09.014.
- [69] S. Kamel, Rapid synthesis of antimicrobial paper under microwave irradiation, *Carbohydr. Polym.* 90 (2012) 1538–1542. doi:10.1016/j.carbpol.2012.07.027.
- [70] L.M. McMurry, M. Oethinger, S.B. Levy, Triclosan targets lipid synthesis., *Nature.* 394 (1998) 531–532. doi:10.1038/28970.
- [71] L. Samsøepetersen, M. Winther-nielsen, T. Madsen, Fate and Effects of Triclosan, Environ. Proj. No. 861. Danish Environ. Prot. Agency, Copenhagen. (2003).
- [72] C.W. Levy, A. Roujeinikova, S. Sedelnikova, P.J. Baker, A.R. Stuitje, A.R. Slabas, Molecular basis of triclosan activity., *Nature.* 398 (1999) 383–384. doi:10.1038/18803.
- [73] J. Regös, O. Zak, R. Solf, W.A. Vischer, E.G. Weirich, Antimicrobial spectrum of triclosan, a broad-spectrum antimicrobial agent for topical application. II. Comparison with some other antimicrobial agents., *Dermatologica.* 158 (1979) 72–79. doi:10.1159/000250746.
- [74] A. Skaare, V. Kjaerheim, P. Barkvoll, G. Rølla, Skin reactions and irritation potential of four commercial toothpastes., *Acta Odontol. Scand.* 55 (1997) 133–6. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9176662>.
- [75] M. Mustafa, M. Bakhiet, B. Wondimu, T. Modeer, Effect of triclosan on interferon-gamma production and major histocompatibility complex class II expression in human gingival fibroblasts, *J Clin Periodontol.* 27 (2000) 733–737. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11034119>.
- [76] H.L. Zuckerbraun, H. Babich, R.J. May, M.C. Sinensky, Triclosan : cytotoxicity, mode of action, and induction of apoptosis in human gingival cells in vitro, *Eur. J. Oral Sci.* 106 (1998) 628–636.
- [77] H.N. Bhargava, P.A. Leonard, Triclosan: Applications and safety, *Am. J. Infect. Control.* 24 (1996) 209–218. doi:10.1016/S0196-6553(96)90017-6.
- [78] H.-X. Wu, L. Tan, Z.-W. Tang, M.-Y. Yang, J.-Y. Xiao, C.-J. Liu, Highly Efficient Antibacterial Surface Grafted with a Triclosan-Decorated Poly (N-Hydroxyethylacrylamide) Brush, *ACS Appl. Mater. Interfaces.* (2015) 150318105203000. doi:10.1021/acsami.5b01210.
- [79] B.D. Kalyon, U. Olgun, Antibacterial efficacy of triclosan-incorporated polymers,

- Am. J. Infect. Control. 29 (2001) 124–125. doi:10.1067/mic.2001.113229.
- [80] A. Popelka, I. Novák, M. Lehocký, I. Chodák, J. Sedliacik, M. Gajtanska, Antibacterial treatment of polyethylene by cold plasma for medical purposes, *Molecules*. 17 (2012) 762–785. doi:10.3390/molecules17010762.
- [81] A.J. Kugel, S.M. Ebert, S.J. Stafslie, I. Hevus, A. Kohut, A. Voronov, Synthesis and characterization of novel antimicrobial polymers containing pendent triclosan moieties, *React. Funct. Polym.* 72 (2012) 69–76. doi:10.1016/j.reactfunctpolym.2011.10.009.
- [82] A.J. Kugel, S.M. Ebert, S.J. Stafslie, I. Hevus, A. Kohut, A. Voronov, et al., Synthesis and characterization of novel antimicrobial polymers containing pendent triclosan moieties, *React. Funct. Polym.* 72 (2012) 69–76. doi:10.1016/j.reactfunctpolym.2011.10.009.
- [83] T. Loftsson, D. Duchêne, Cyclodextrins and their pharmaceutical applications, *Int. J. Pharm.* 329 (2007) 1–11. doi:10.1016/j.ijpharm.2006.10.044.
- [84] L. Qian, Y. Guan, H. Xiao, Preparation and characterization of inclusion complexes of a cationic ??-cyclodextrin polymer with butylparaben or triclosan, *Int. J. Pharm.* 357 (2008) 244–251. doi:10.1016/j.ijpharm.2008.01.018.
- [85] L. Cabrales, N. Abidi, A. Hammond, A. Hamood, Cotton fabric functionalization with cyclodextrins, *J. Mater. Environ. Sci.* 3 (2012) 561–574.
- [86] M. Wang, J.L. Coffey, K. Dorraj, P.S. Hartman, A. Loni, L.T. Canham, Sustained antibacterial activity from triclosan-loaded nanostructured mesoporous silicon, *Mol. Pharm.* 7 (2010) 2232–2239. doi:10.1021/mp100227m.
- [87] H. Cui, X. Wu, D. Zhang, J. Zhang, H. Xiao, Y. Chen, Thermotolerance and Antibacterial Properties of MgO-Triclosan Nanocomposites, *Procedia Eng.* 102 (2015) 82544919. doi:10.1016/j.proeng.2015.01.175.
- [88] V. Chaleix, P. Couleaud, V. Sol, R. Zerrouki, Microwave-assisted expeditious O-alkylation of meso-hydroxy phenylporphyrins, (2009) 888–892.
- [89] McCormick, C. L, D.K. Lichatowich, Homogeneous solution reactions of cellulose, chitin, and other polysaccharides to produce controlled-activity pesticide systems, *J. Polym. Sci.* 17 (1979) 479–484. doi:10.1021/bk-1980-0121.ch024.
- [90] T.R. Dawsey, C.L. McCormick, The Lithium Chloride/Dimethylacetamide solvent for cellulose: A literature review, *J. Macromol. Sci. Part C Polym. Rev.* 30 (1990) 405–440. doi:10.1080/07366579008050914.
- [91] A. Isogai, R.H. Atalla, F. Service, Dissolution of cellulose in aqueous NaOH solutions, *Solutions*. 5 (1998) 309–319. doi:10.1023/A:1009272632367.
- [92] Y. Xiong, Z. Zhang, X. Wang, B. Liu, J. Lin, Hydrolysis of cellulose in ionic liquids catalyzed by a magnetically-recoverable solid acid catalyst, *Chem. Eng. J.* 235 (2014) 349–355. doi:10.1016/j.cej.2013.09.031.
- [93] J. Wang, M. Zhou, Y. Yuan, Q. Zhang, X. Fang, S. Zang, Hydrolysis of cellulose catalyzed by quaternary ammonium perchlorates in 1-allyl-3-methylimidazolium chloride., *Bioresour. Technol.* 197 (2015) 42–7. doi:10.1016/j.biortech.2015.07.110.

- [94] M. Gericke, J. Schaller, T. Liebert, P. Fardim, F. Meister, T. Heinze, Studies on the tosylation of cellulose in mixtures of ionic liquids and a co-solvent., *Carbohydr. Polym.* 89 (2012) 526–36. doi:10.1016/j.carbpol.2012.03.040.
- [95] P.-H. Elchinger, P.-A. Faugeras, C. Zerrouki, D. Montplaisir, F. Brouillette, R. Zerrouki, Tosylcellulose synthesis in aqueous medium, *Green Chem.* 14 (2012) 3126. doi:10.1039/c2gc35592b.
- [96] T. Heinze, K. Rahn, M. Jaspers, H. Berghmans, *p*-Toluenesulfonyl esters in cellulose modifications: acylation of remaining hydroxyl groups, *Macromol. Chem. Phys.* 197 (1996) 4207–4224. <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/macp.1996.021971218/abstract>.
- [97] H. Awada, P. Elchinger, P. Faugeras, C. Zerrouki, D. Montplaisir, R. Zerrouki, Chemical Modification of Kraft Cellulose Fibres: Influence of Pretreatment on Paper Properties, 10 (2015) 2044–2056.
- [98] P.H. Elchinger, H. Awada, C. Zerrouki, D. Montplaisir, R. Zerrouki, Kraft pulp-starch covalent linking: A promising route to a new material, *Ind. Eng. Chem. Res.* 53 (2014) 7604–7610. doi:10.1021/ie500555g.
- [99] P. Faugeras, R. Zerrouki, F. Brouillette, Selective crosslinking of Kraft pulp fibres by click chemistry – Characterisation of the properties of reaction intermediates and final product, *Nord. Pulp Pap. Res. J.* 29 (2014) 673–678.
- [100] P.-A. Faugeras, F. Brouillette, R. Zerrouki, Crosslinked cellulose developed by CuAAC, a route to new materials, *Carbohydr. Res.* 356 (2012) 247–251. doi:10.1016/j.carres.2011.10.028.
- [101] M.G. Escalada, A.D. Russell, J.-Y. Maillard, D. Ochs, Triclosan-bacteria interactions: single or multiple target sites?, *Lett. Appl. Microbiol.* 41 (2005) 476–481. doi:10.1111/j.1472-765X.2005.01790.x.
- [102] M.G. Escalada, J.L. Harwood, J.-Y. Maillard, D. Ochs, Triclosan inhibition of fatty acid synthesis and its effect on growth of *Escherichia coli* and *Pseudomonas aeruginosa*., *J. Antimicrob. Chemother.* 55 (2005) 879–882. doi:10.1093/jac/dki123.
- [103] J. Villalaín, C.R. Mateo, F.J. Aranda, S. Shapiro, V. Micol, Membranotropic effects of the antibacterial agent Triclosan., *Arch. Biochem. Biophys.* 390 (2001) 128–136. doi:10.1006/abbi.2001.2356.
- [104] R. Chuanchuen, R.R. Karkhoff-Schweizer, H.P. Schweizer, High-level triclosan resistance in *Pseudomonas aeruginosa* is solely a result of efflux, *Am. J. Infect. Control.* 31 (2003) 124–127. doi:10.1067/mic.2003.11.
- [105] L. Zhu, J. Lin, J. Ma, J.E. Cronan, H. Wang, Triclosan resistance of *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 is due to FabV, a triclosan-resistant enoyl-acyl carrier protein reductase, *Antimicrob. Agents Chemother.* 54 (2010) 689–698. doi:10.1128/AAC.01152-09.
- [106] L. Bajema, M. Gouterman, B. Meyer, Spectra of porphyrins, *J. Mol. Spectrosc.* 27 (1968) 225–235. doi:10.1016/0022-2852(68)90032-5.
- [107] C.J. Medforth, NMR spectroscopy of diamagnetic porphyrins, *Porphyr. Handb.* 5

- (2000) 1–80. doi:10.1002/chin.200329298.
- [108] O. Raab, Über die Wirkung fluoresceinder Stoffe and Infusorien, *Zeit Für Biol.* 39 (1900) 524–546.
- [109] A. Jodlbauer, von T. H., Über die Beteiligung der Sauerstoffes bei der photodynamischem Wirkung fluorezierender Stoffe, *Münch. Med. Wochenschr.* 26 (1904) 1139–1141.
- [110] M. Wainwright, Photodynamic antimicrobial chemotherapy (PACT), *J. Antimicrob. Chemother.* 42 (1998) 13–28. doi:10.1093/jac/42.1.13.
- [111] M. Wainwright, K.B. Crossley, Photosensitising agents - Circumventing resistance and breaking down biofilms: A review, *Int. Biodeterior. Biodegrad.* 53 (2004) 119–126. doi:10.1016/j.ibiod.2003.11.006.
- [112] S. Noimark, C.W. Dunnill, I.P. Parkin, Shining light on materials - A self-sterilising revolution, *Adv. Drug Deliv. Rev.* 65 (2013) 570–580. doi:10.1016/j.addr.2012.07.003.
- [113] G. Jori, M. Camerin, M. Soncin, Antimicrobial Photodynamic Therapy: Basic Principles, *R. Soc. Chem.* (2011) 1–18. <http://pubs.rsc.org/en/content/chapter/bk9781849731447-00001/978-1-84973-144-7/unauth>.
- [114] T. Maisch, R. Szeimies, G. Jori, C. Abels, Antibacterial photodynamic therapy in dermatology, (2004) 907–917.
- [115] H. Nikaido, Preventing drug access to targets: cell surface permeability barriers and active efflux in bacteria., *Semin. Cell Dev. Biol.* 12 (2001) 215–223. doi:10.1006/scdb.2000.0247.
- [116] Z. Malik, J. Hanania, Y. Nitzan, New trends in photobiology bactericidal effects of photoactivated porphyrins — An alternative approach to antimicrobial drugs, *J. Photochem. Photobiol. B Biol.* 5 (1990) 281–293. doi:10.1016/1011-1344(90)85044-W.
- [117] R. Bonnett, D.G. Buckley, T. Burrow, A.B.B. Galia, B. Saville, S.P. Songca, Photobactericidal materials based on porphyrins and phthalocyanines, *J. Mater. Chem.* 3 (1993) 323. doi:10.1039/jm9930300323.
- [118] A. Felgenträger, T. Maisch, A. Späth, J. a. Schröder, W. Bäumlner, Singlet oxygen generation in porphyrin-doped polymeric surface coating enables antimicrobial effects on *Staphylococcus aureus*, *Phys. Chem. Chem. Phys.* 16 (2014) 20598–20607. doi:10.1039/C4CP02439G.
- [119] C. Xing, Q. Xu, H. Tang, L. Liu, S. Wang, S.P.N. Nanotechnol, Conjugated Polymer / Porphyrin Complexes for Efficient Energy Transfer and Improving Light-Activated Antibacterial Activity, (2009) 13117–13124.
- [120] C. Ringot, N. Saad, R. Granet, P. Bressollier, V. Sol, P. Krausz, -Functionalized Aminoporphyrins As Efficient Agents for Photo-Antibacterial Surfaces, *J. Porphyr. Phthalocyanines.* 14 (2010) 925–931. doi:10.1142/S1088424610002719.
- [121] C. Ringot, V. Sol, M. Barrière, N. Saad, P. Bressollier, R. Granet, Triazinyl porphyrin-based photoactive cotton fabrics: Preparation, characterization, and antibacterial

- activity, *Biomacromolecules*. 12 (2011) 1716–1723. doi:10.1021/bm200082d.
- [122] J.-P. Mbakidi, K. Herke, S. Alvès, V. Chaleix, R. Granet, P. Krausz, Synthesis and photobiocidal properties of cationic porphyrin-grafted paper., *Carbohydr. Polym.* 91 (2013) 333–8. doi:10.1016/j.carbpol.2012.08.013.
- [123] M. Krouit, R. Granet, P. Branland, B. Verneuil, P. Krausz, New photoantimicrobial films composed of porphyrinated lipophilic cellulose esters, *Bioorganic Med. Chem. Lett.* 16 (2006) 1651–1655. doi:10.1016/j.bmcl.2005.12.008.
- [124] B.L. Carpenter, E. Feese, H. Sadeghifar, D.S. Argyropoulos, R. a. Ghiladi, Porphyrin-cellulose nanocrystals: A photobactericidal material that exhibits broad spectrum antimicrobial activity, *Photochem. Photobiol.* 88 (2012) 527–536. doi:10.1111/j.1751-1097.2012.01117.x.
- [125] E. Feese, H. Sadeghifar, H.S. Gracz, D.S. Argyropoulos, R. a. Ghiladi, Photobactericidal porphyrin-cellulose nanocrystals: Synthesis, characterization, and antimicrobial properties, *Biomacromolecules*. 12 (2011) 3528–3539. doi:10.1021/bm200718s.
- [126] I. Banerjee, M.P. Douaisi, D. Mondal, R.S. Kane, Light-activated nanotube-porphyrin conjugates as effective antiviral agents, *Nanotechnology*. 23 (2012) 105101. doi:10.1088/0957-4484/23/10/105101.
- [127] B. Boëns, P.A. Faugeras, J. Vergnaud, R. Lucas, K. Teste, R. Zerrouki, Iodine-catalyzed one-pot synthesis of unsymmetrical meso-substituted porphyrins, *Tetrahedron*. 66 (2010) 1994–1996. doi:10.1016/j.tet.2010.01.055.
- [128] C. Ringot, *Élaboration de nouveaux matériaux celluloses photobactéricides*, Université de Limoges, 2010. <http://epublications.unilim.fr/theses/2010/ringot-cyril/ringot-cyril.pdf>.
- [129] J. Rochford, E. Galoppini, Zinc(II) Tetraarylporphyrins Anchored to TiO₂, ZnO, and ZrO₂ Nanoparticle Films through Rigid-Rod Linkers, *Langmuir*. (2008) 5366–5374. doi:10.1021/la703845u.
- [130] P.-A. Faugeras, P.-H. Elchinger, F. Brouillette, D. Montplaisir, R. Zerrouki, Advances in cellulose chemistry - microwave-assisted synthesis of propargylcellulose in aqueous medium, *Green Chem.* 14 (2012) 598. doi:10.1039/c2gc16300d.
- [131] G. Ohloff, Singlet Oxygen as a Reagent in Organic Synthesis, *Pure Appl. Chem.* 43 (1975) 481–502. doi:<http://www.iupac.org/publications/pac/1975/pdf/4303x0481.pdf>.
- [132] Y.J. Mange, A.M. Isloor, S. Malladi, S. Isloor, H.-K. Fun, Synthesis and antimicrobial activities of some novel 1,2,4-triazole derivatives, *Arab. J. Chem.* 6 (2013) 177–181. doi:10.1016/j.arabjc.2011.01.033.
- [133] V. Bercean, A. Alexa, F. Lenu, C. Dehelean, C. Trandafirescu, D. Muntean, Preparation and Antibacterial Properties of Substituted 1, 2, 4-Triazoles, *J. Chem.* 2015 (2015) 1–5.
- [134] S. Kamijo, T. Jin, Z. Huo, Y. Yamamoto, Regiospecific synthesis of 2-allyl-1,2,3-triazoles by palladium-catalyzed 1,3-dipolar cycloaddition, *Tetrahedron Lett.* 43 (2002) 9707–9710. doi:10.1016/S0040-4039(02)02206-2.

- [135] V.P. Krivopalov, O.P. Shkurko, 1,2,3-Triazole and its derivatives. Development of methods for the formation of the triazole ring, *Russ. Chem. Rev.* 74 (2005) 339–379. doi:10.1070/RC2005v074n04ABEH000893.
- [136] A. Preuß, L. Zeugner, S. Hackbarth, M.A.F. Faustino, M.G.P.M.S. Neves, J.A.S. Cavaleiro, Photoinactivation of *Escherichia coli* (SURE2) without intracellular uptake of the photosensitizer, *J. Appl. Microbiol.* 114 (2013) 36–43. doi:10.1111/jam.12018.
- [137] S.C. Afonso, R. Enríquez De Salamanca, A.M. Del, The photodynamic and non-photodynamic actions of porphyrins, *Brazilian J. Med. Biol. Res.* 32 (1999) 255–266. doi:10.1590/S0100-879X1999000300002.
- [138] Z. Malik, H. Ladan, Y. Nitzan, Photodynamic inactivation of Gram-negative bacteria: problems and possible solutions, *J. Photochem. Photobiol. B Biol.* 14 (1992) 262–6. <http://scholar.google.com/scholar?hl=en&btnG=Search&q=intitle:Photodynamic+inactivation+of+Gram-negative+bacteria+problems+and+possible+solutions#0>.
- [139] D.E. Chavez, D.A. Parrish, New heterocycles from tetrazines and oxadiazoles, *J. Heterocycl. Chem.* 46 (2009) 88–90. doi:10.1002/jhet.7.
- [140] S.H. Sumrã, Z.H. Chohan, Metal based new triazoles: their synthesis, characterization and antibacterial/antifungal activities., *Spectrochim. Acta. A Mol. Biomol. Spectrosc.* 98 (2012) 53–61. doi:10.1016/j.saa.2012.08.026.
- [141] R. Paprocka, M. Wiese, A. Eljaszewicz, A. Helmin-Basa, A. Gzella, B. Modzelewska-Banachiewicz, et al., Synthesis and anti-inflammatory activity of new 1,2,4-triazole derivatives., *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 25 (2015) 2664–7. doi:10.1016/j.bmcl.2015.04.079.
- [142] R. Konášová, J.J. Dyrťová, V. Kašička, Determination of acid dissociation constants of triazole fungicides by pressure assisted capillary electrophoresis., *J. Chromatogr. A.* 1408 (2015) 243–9. doi:10.1016/j.chroma.2015.07.005.
- [143] R.E. Avanzo, C. Anesini, M.L. Fascio, M.I. Errea, N.B. D'Accorso, 1,2,4-Triazole D-ribose derivatives: design, synthesis and antitumoral evaluation., *Eur. J. Med. Chem.* 47 (2012) 104–10. doi:10.1016/j.ejmech.2011.10.028.
- [144] J.J. Luszczki, T. Plech, M. Wujec, Effect of 4-(4-bromophenyl)-5-(3-chlorophenyl)-2,4-dihydro-3H-1,2,4-triazole-3-thione on the anticonvulsant action of different classical antiepileptic drugs in the mouse maximal electroshock-induced seizure model., *Eur. J. Pharmacol.* 690 (2012) 99–106. doi:10.1016/j.ejphar.2012.06.023.
- [145] T. Weide, S.A. Saldanha, D. Minond, T.P. Spicer, J.R. Fotsing, M. Spaargaren, NH-1,2,3-Triazole Inhibitors of the VIM-2 Metallo- β -Lactamase, *ACS Med. Chem. Lett.* 1 (2010) 150–154. doi:10.1021/ml900022q.
- [146] G.M. Brown, The Biosynthesis of Folic Acid: II. Inhibition by sulfonamides, *J. Biol. Chem.* 237 (1962) 536–540.
- [147] R. Huisgen, 1,3-Dipolar Cycloadditions. Past and Future, *Angew. Chemie Int. Ed. English.* 2 (1963) 565–598. doi:10.1002/anie.196305651.
- [148] Y. Zou, Q. Zhao, J. Liao, H. Hu, S. Yu, X. Chai, et al., New triazole derivatives as

- antifungal agents: Synthesis via click reaction, in vitro evaluation and molecular docking studies, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 22 (2012) 2959–2962. doi:10.1016/j.bmcl.2012.02.042.
- [149] K.T. Petrova, T.M. Potewar, P. Correia-da-Silva, M.T. Barros, R.C. Calhella, A. Ćiric, et al., Antimicrobial and cytotoxic activities of 1,2,3-triazole-sucrose derivatives., *Carbohydr. Res.* 417 (2015) 66–71. doi:10.1016/j.carres.2015.09.003.
- [150] D. Ashok, D. Mohan Gandhi, G. Srinivas, a. Vikas Kumar, Microwave-assisted synthesis of novel 1,2,3-triazole derivatives and their antimicrobial activity, *Med. Chem. Res.* 23 (2014) 3005–3018. doi:10.1007/s00044-013-0880-1.
- [151] D. Prasad, N. Aggarwal, R. Kumar, M. Nath, Synthesis of Novel Heteroarenes Based [1, 2, 3]-Triazoles via Click Chemistry and their Evaluation for Antibacterial Activity, *Indian J. Chem.* 51 (2012) 731–738.
- [152] J.-H. Jung, Y.-G. Lim, K.-H. Lee, B.T. Koo, Synthesis of glycidyl triazolyl polymers using click chemistry, *Tetrahedron Lett.* 48 (2007) 6442–6448. doi:10.1016/j.tetlet.2007.07.096.
- [153] G. Berrah, W.A. Konetzka, Selective and reversible inhibition of the synthesis of bacterial deoxyribonucleic acid by phenethyl alcohol, *J. Bacteriol.* 83 (1961) 738–744. doi:http://jb.asm.org/content/83/4/738.short.
- [154] P.B. Price, Ethyl alcohol as a germicide, *Arch Surg.* 38 (1939) 528–542. doi:doi:10.1001/archsurg.1939.01200090135010.



VII. ANNEXE-PUBLICATION SCIENTIFIQUE

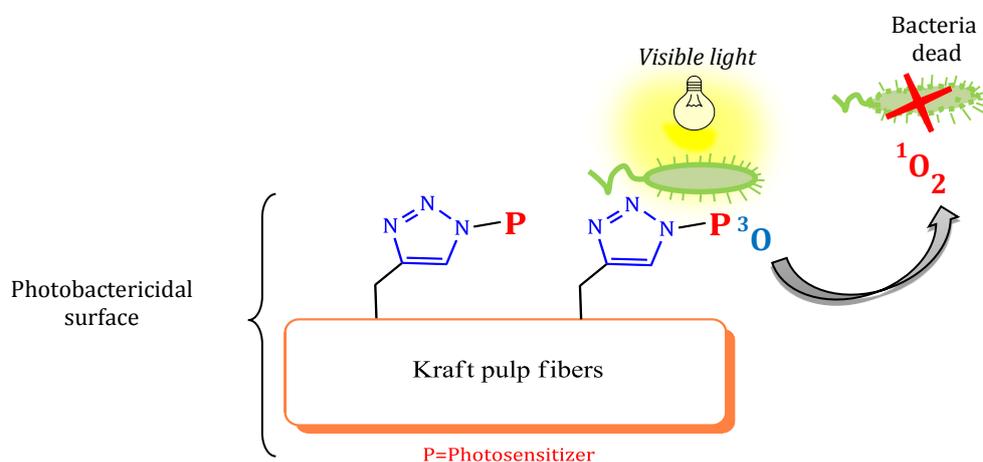
Le travail présenté dans cette thèse a donné lieu à 1 publication scientifique :

Synthesis and photobactericidal properties of a neutral porphyrin grafted onto lignocellulosic fibers

NZAMBE TA KEKI Jean Kerim, OUK Tan-Sothéa, ZERROUKI Rachida, FAUGERAS Pierre-Antoine, SOL Vincent, BROUILLETTE François,

Materials Science and Engineering: C, 62 (2016) 61-67

Photodynamic antimicrobial chemotherapy (PACT), as one of the promising alternative antimicrobial treatment, has received great attention in recent years. In this work, a new antimicrobial material has been elaborated by grafting a neutral porphyrin, the metallated 5-(4-azidophenyl)-10,15,20-triphenylporphyrin, onto lignocellulosic fibers by using the Copper (I)-Catalyzed Alkyne-Azide 1,3-dipolar Cycloaddition (CuAAC) reaction. The cross-linked porphyrin-Kraft pulp material was characterized by infrared and by XPS spectroscopy analyses, which proved the covalent linkage between the porphyrin and propargylated Kraft pulp fibers. Antimicrobial activity of this material was tested under visible light irradiation with a low light dose (9.5 J/cm^2) against *Staphylococcus aureus* and *Pseudomonas aeruginosa*. The two bacterial strains deposited on the resulting photosensitizing Kraft pulp are efficiently killed after illumination. Such materials could find applications in industrial, household and medical environments as an alternative to overcome the rampant microbial multiresistance to classical treatment.





Résumé:

Les contaminations des surfaces constituent un problème majeur de santé public rencontré dans plusieurs secteurs tels que les milieux hospitaliers et l'industrie alimentaire. Cette contamination consiste en l'adhésion de bactéries pathogènes ou opportunistes qui peuvent former des biofilms. Ces biofilms sont potentiellement des sources de développement et de prolifération des bactéries. Une voie efficace de lutte contre la contamination microbienne est l'élaboration de surfaces bactéricides visant à empêcher ou diminuer l'adhésion bactérienne. Basé sur le savoir-faire du laboratoire de Chimie des Substances Naturelles dans le domaine des polysaccharides, nous avons entrepris d'élaborer des supports antibactériens en fixant de manière covalente des molécules aux propriétés antibactériennes sur des fibres lignocellulosiques de pâte à papier (la pâte Kraft). Le lien triazole formé est stable vis-à-vis de l'hydrolyse acide ou basique, et subsiste dans des conditions oxydantes et réductrices. Nous avons choisi de nous intéresser dans un premier temps à la fixation de manière covalente d'un antibactérien commercial connu, le triclosan, sur des fibres lignocellulosiques de la pâte à papier ; puis dans une deuxième approche nous nous sommes orientés vers la fixation de porphyrines sur ces supports. Enfin dans une troisième approche, nous avons fixés des molécules aromatiques qui n'acquièrent leur potentiel antimicrobien qu'après greffage sur le support via le lien triazole. L'étude de l'effet antimicrobien des différents matériaux a montré pour une activité bactéricide du matériau Pâte Kraft-triclosan vis-à-vis notamment de trois souches fréquemment trouvées en milieu hospitalier: *Pseudomonas aeruginosa*, *Bacillus cereus* et *Escherichia coli* ; Dans le cas du greffage de photosensibilisateurs, seul le matériau pâte Kraft-Porphyrine neutre a permis une photoinactivation des souches après irradiation.

Mots clés: *Matériaux antimicrobiens ; Photochimiothérapie antimicrobienne ; pâte Kraft ; Click Chimistry*

Abstract:

Surface contamination by pathogens constitutes a major public health problem encountered in many areas such as hospitals, environment and food industry. This contamination consists in the adhesion of pathogenic or opportunistic bacteria that can attach to a biotic or abiotic surface and lead to the formation of biofilm. An effective way to fight against microbial contamination is the development of antibacterial surfaces, in order to prevent or reduce bacterial adhesion. Based on the expertise of the Laboratoire de Chimie des Substances Naturelles in the field of polysaccharides, we have undertaken the development of antibacterial materials by grafting through covalent bonds molecules presenting antibacterial properties onto lignocellulosic fibers (in this case Kraft pulp fibers). Triazoles are resistant to acid and basic hydrolysis, reductive and oxidative conditions. This moiety is also relatively resistant to metabolic degradation and is not posing particular toxicity problems. The study of the antibacterial effect has shown a bactericidal activity of the triclosan-Kraft pulp sheet against three strains frequently found in hospitals: *Pseudomonas aeruginosa*, *Bacillus cereus* and *Escherichia coli*. In the case of grafting photosensitizers, only the neutral porphyrin-Kraft pulp sheet material displayed a strong photobactericidal activity after irradiation.

Keywords: *Antimicrobials materials; Photodynamic antimicrobial chemotherapy; Kraft pulp; Click-Chemistry*

